



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 18 149 T2** 2005.06.09

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 119 578 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 18 149.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/22892**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 951 708.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/20431**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.04.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.08.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.06.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07H 21/00**

C07H 21/02, C07H 21/04

(30) Unionspriorität:

167165 06.10.1998 US

(73) Patentinhaber:

Isis Pharmaceutical, Inc., Carlsbad, Calif., US

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

SCOZZARI, Anthony, Vista, US

(54) Bezeichnung: **VERBESSETEREA VERFAHREN ZUR OLIGONUCLEOTID-SYNTHESE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Diese Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zum Koppeln eines Phosphoramidit-Nukleosids an ein an einen festen Träger gebundenes Nukleosid. Die vorliegende Erfindung ist nützlich für die Synthese von Oligonukleotiden. Diese Erfindung ist der Synthese von Oligonukleotiden im großen Maßstab unter Anwendung des Phosphoramidit-Verfahrens zugänglich.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Oligonukleotide und ihre Analoga werden routinemäßig in vielen diagnostischen und Forschungs-Anwendungen verwendet, als Sonden, Primer, Linker, Adaptoren und Antisense-Oligonukleotide. Antisense-Oligonukleotide sind routinemäßig in der Forschung verwendet worden, um die Funktionen von Genprodukten, d. h. Proteinen, durch Modulation ihrer Expression zu studieren. Diese Oligonukleotide sind gestaltet, um in einer spezifischen Weise an eine bestimmte mRNA-Sequenz durch Hybridisierung zu binden (d. h. Oligonukleotide, die spezifisch hybridisierbar sind mit einer Target-mRNA). Solche Oligonukleotide und Oligonukleotidanaloga sollen die Aktivität der ausgewählten mRNA durch irgendeinen einer Anzahl von Mechanismen hemmen, d. h. durch Interferieren mit Translationsreaktionen, durch welche durch die mRNA codierte Proteine hergestellt werden, oder durch Initiieren von RNase H-Abbau der mRNA. Die Hemmung der Bildung der spezifischen Proteine, die durch die mRNA-Sequenzen codiert werden, erlaubt das Studium der Funktionen bestimmter Gene.

[0003] Die Spezifität der Antisense-Oligonukleotide und ihrer Analoga legen nahe, daß sie therapeutische nützlich sein könnten. Ihr Wirkmechanismus sollte die Nebenwirkungen beschränken, während er die Spezifität erhöht. Gegenwärtig sind zahlreiche Antisense-Oligonukleotide in klinischen Studien gegen eine große Breite von Targets und Krankheiten, und kürzlich wurde das erste Antisense-Oligonukleotid von der FDA für die Vermarktung zugelassen.

[0004] Anwendungen von Oligonukleotiden und Oligonukleotidanaloga als Antisense-Mittel für therapeutische Zwecke, diagnostische Zwecke und als Forschungsreagenzien erfordern oft, daß die Oligonukleotide oder Oligonukleotidanaloga in großen Mengen synthetisiert werden. Dies gilt insbesondere für ihre Verwendung als kommerziell erhältliche Arzneimittel. Die Synthese im großen Maßstab von Oligonukleotiden in einem ökonomischen Maßstab stellt Herausforderungen, die von denen bei der Synthese kleiner Mengen für die Forschung verschieden sind.

[0005] Die Synthese von Oligonukleotiden kann unter Anwendung von sowohl Lösungsphasen- als auch Festphasen-Verfahren erreicht werden. Eine allgemeine Übersicht von Festphasen- versus Lösungsphasen-Oligonukleotid-Synthese wird im Hintergrund-Abschnitt von Urdea et al., US-Patent mit der Nr. 4,517,338 mit dem Titel "Multiple Reactor System And Method For Oligonucleotide Synthesis", gegeben. Oligonukleotid-Synthese über Lösungsphase kann mit einigen Kopplungsmechanismen erreicht werden.

[0006] Eine solche Lösungsphasen-Herstellung benutzt Phosphortriester. Yau, E. K. et al., Tetrahedron Letters, 1990, 31, 1953, berichten über die Verwendung von Phosphortriestern zur Herstellung von Thymidin-Dinukleosid- und Thymidin-Dinukleotid-Phosphordithioaten. Allerdings erfordert die Lösungsphasen-Chemie Reinigung nach jeder Internukleotid-Kopplung, was arbeitsintensiv und zeitraubend ist.

[0007] Weitere Details von Verfahren, die für die Herstellung von Oligonukleotiden nützlich sind, können bei Sekine, M. et al., J. Org. Chem., 1979, 44, 2325; Dahl, O., Sulfur Reports, 1991, 11, 167-192; Kresse, J. et al., Nucleic Acids Res., 1975, 2, 1-9; Eckstein, F., Ann. Rev. Biochem., 1985, 54, 367-402; und Yau, E. K., US-Patent mit der Nr. 5,210,264, gefunden werden.

[0008] Das gegenwärtige Verfahren der Wahl für die Herstellung von natürlich vorkommenden Oligonukleotiden sowie von Oligonukleotiden mit modifizierten Internukleotid-Verknüpfungen wie Phosphorthioat- und Phosphordithioat-Oligonukleotiden ist über Festphasensynthese. Die Festphasensynthese umfaßt die Bindung eines Nukleosids an einen festen Träger, wie einen Polymerträger, und die Addition eines zweiten Nukleotids an das trägergebundene Nukleotid. Weitere Nukleotide werden hinzugegeben, wobei ein Oligonukleotid gebildet wird, welches an einen festen Träger gebunden ist. Das Oligonukleotid kann dann von dem festen Träger abgespalten werden, wenn die Synthese der gewünschten Länge und Sequenz des Oligonukleotids erreicht ist.

[0009] Festphasensynthese beruht auf der sequentiellen Addition von Nukleotiden an ein Ende einer wachsenden Oligonukleotidkette. Typischerweise wird ein erstes Nukleosid mit Schutzgruppen an allen vorhandenen exocyclischen Aminfunktionalitäten an einen geeigneten festen Träger gebunden. Aktivierte Phosphorverbindungen, typischerweise Nukleotid-Phosphoramidite, die ebenfalls geeignete Schutzgruppen tragen, werden stufenweise hinzugegeben, um die wachsende Kette zu verlängern. Die aktivierten Phosphorverbindungen werden mit dem wachsenden Oligonukleotid unter Anwendung der "Fließbett"-Technologie umgesetzt, um die Reagenzien zu mischen.

[0010] Eine Anzahl von Festphasensynthesizern sind kommerziell erhältlich. Diese sind geeignet für das Herstellen vergleichsweise kleiner Mengen an Oligonukleotiden, d. h. von etwa dem mikromolaren (μmol) bis zum millimolaren (mmol) Bereich. Sie sind typischerweise aufgrund der hohen Kosten für die Reagenzien der Herstellung der größeren Mengen an Oligonukleotiden nicht zugänglich, die für biophysikalische Studien, präklinische und klinische Versuche und kommerzielle Herstellung notwendig sind.

[0011] Instrumente für Festphasensynthese im großen Maßstab von Oligonukleotiden sind ebenfalls kommerziell erhältlich, zum Beispiel Pharmacia OligoPilot II und Milligen/Biosearch 8800. Obwohl das von diesen Vorrichtungen verwendete Verfahren gut verstanden ist, erfordern sie die Verwendung teurer Reagenzien. Berücksichtigt man die großen Mengen an Oligonukleotidsynthesen, die für Forschungsanwendungen und die Herstellung im großen Maßstab für klinische Versuche ausgeführt werden, ist jede Verschwendung dieser teuren Reagenzien ein bedeutendes ökonomisches Problem.

[0012] Ein in großen Mengen verwendetes Reagenz ist Acetonitril, welches in zahlreichen Waschschritten, als ein Lösungsmittel für einen Aktivator während des Kopplungsschritts des Phosphoramidit-Verfahrens und als ein Lösungsmittel für Phosphoramidite, eine Abtrennlösung und ein Oxidationsreagenz verwendet wird. Es ist ein anerkanntes Dogma der Fachleute, daß Acetonitril mit "geringem Wassergehalt", d. h. mit einem Wassergehalt von weniger als 30 ppm, zwingend für die Oligonukleotidsynthese ist. Siehe im allgemeinen Gait, M. S., *Oligonucleotide Synthesis A Practical Approach*, IRL Press 1985, S. 18–19. Es wird geglaubt, daß die Verwendung von Acetonitril mit einem größeren Wassergehalt während irgendeinem der Syntheseschritte zu suboptimalen Ausbeuten führt. Es wird angenommen, daß die Anwesenheit von Wasser in dem System mit der Kopplungsreaktion interferiert. Konsequenterweise wird teures Acetonitril mit geringem Wassergehalt universell für die Oligonukleotidsynthese verwendet. "Reagenziengrad"-Acetonitril, Acetonitril mit einem Wassergehalt von mehr als 30 ppm, ist erhältlich, aber das Verfahren zum Entfernen von Wasser und anderen Verunreinigungen aus Acetonitril von solchem Reagenziengrad ist teuer und langwierig. Siehe US-Patent 5,440,068 für eine Übersicht über den Stand der Technik.

[0013] Somit besteht ein Bedarf für verbesserte und ökonomischere Verfahren für die Oligonukleotidsynthese fort.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft verbesserte Verfahren zum Binden eines Phosphoramidit-Nukleosids an ein an einen festen Träger gebundenes Nukleosid. Die vorliegende Erfindung umfaßt ferner die Synthese von Oligonukleotiden. Die Erfindung basiert auf dem Befund, daß die Oligonukleotidsyntheseeffizienz, gemessen durch Kopplungseffizienz und Prozent Gesamtlänge, sich nicht signifikant vermindern muß, wenn Acetonitril mit einem Wassergehalt von mehr als 30 ppm und weniger als 1250 ppm Acetonitril mit wenig Wasser substituiert in den Waschschritten des Syntheseverfahrens oder als ein Lösungsmittel für Abtrennreagenzien (Cap-Reagenzien) oder als ein Lösungsmittel für eine Anzahl von Oxidations/Schwefelungsreagenzien. Diese Erfindung verkörpert Verfahren der Festphasen-Oligonukleotidsynthese, umfassend Koppeln eines Phosphoramidit-Nukleosids mit einer reaktiven Hydroxylgruppe eines Nukleosids, das an einen Festphasenträger gebunden ist. Dies wird bevorzugt getan in Gegenwart eines aktivierenden Reagenzes, wobei eine Phosphorbindung zwischen den zwei Nukleosiden gebildet wird, Abtrennen jedes nicht gekoppelten, geschützten, trägergebundenen Nukleosids mit einem Abtrennreagenz und Oxidieren der Phosphor-Nukleosid-Bindung mit einem Oxidierungsreagenz. Der feste Träger wird mit Acetonitril vor oder nach mindestens einer der Kopplungs-, Abtrenn- und Oxidierungsreaktionen gewaschen, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt von mehr als 30 ppm und weniger als etwa 1250 ppm aufweist. Alternativ ist mindestens eines der Abtrennreagenzien oder der Oxidierungsreagenzien in einem Acetonitril-Lösungsmittel mit einem Wassergehalt von mehr als 30 ppm und weniger als etwa 1250 ppm. Die hier beschriebenen verbesserten Verfahren stellen Mittel für ökonomischere Synthesen von Oligonukleotiden bereit.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

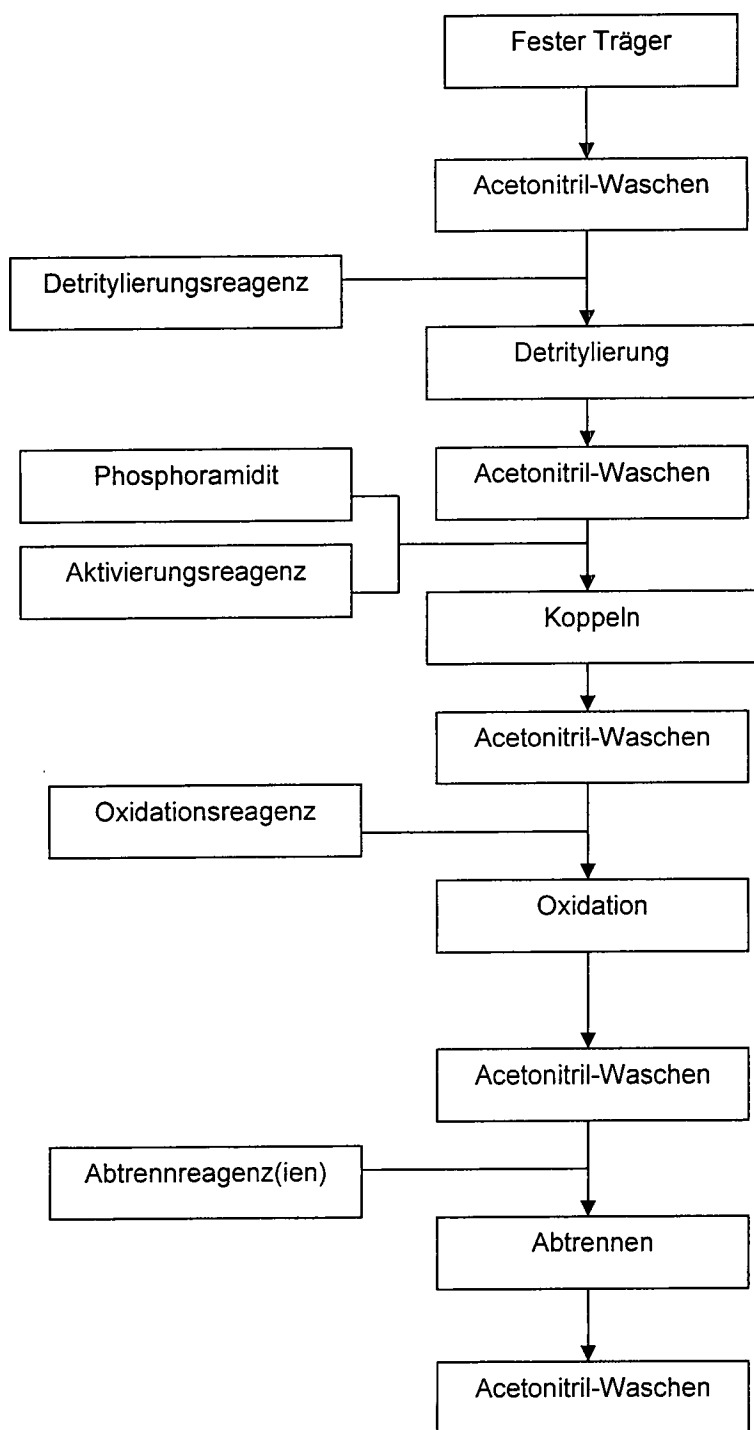
[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Binden eines Phosphoramidit-Nukleosids an ein an einen festen Träger gebundenes Nukleosid. Diese Verfahren umfassen das Binden eines ersten Nukleosids mit einer geschützten Hydroxylgruppe an einen festen Träger mittels einer kovalenten Bindung. Das erste Nukleosid kann an den festen Träger entweder direkt oder über einen Linker unter Anwendung von Standardverfahren und Vorschriften, die im Stand der Technik bekannt sind, gebunden werden. Siehe z. B. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Eckstein, F., Hrsg., IRL Press, N.Y., 1991, hiermit in seiner Gesamtheit durch Bezugnahme eingefügt. Ein Beispiel ist ein langkettiger Alkylamin-Linker, der eine Carbamat-Verknüpfung einschließt. Das gebundene geschützte Nukleosid wird dann mit einem Entschützungsreagenz entschützt und mit einem zweiten Phosphoramidit-Nukleosid gekoppelt, um eine Phosphor-Nukleosid-Bindung zwischen dem ersten Nukleosid und dem zweiten Nukleosid zu bilden. Diese Kopplung tritt an der Hydroxylgruppe des ersten Nukleosids auf, welche durch die Entschützung mit dem Entschützungsreagenz reaktiv wird. Nach diesem Kopplungsschritt wird das verbleibende entschützte aber nicht gekoppelte erste Nukleosid optional mit einem Abtrennreagenz abgetrennt. Die entstehende Phosphor-Nukleosid-Bindung wird als nächstes mit einem Oxidierungsmittel oxidiert. Gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung wird während des Verknüpfens eines Phosphoramidit-Nukleosids an ein Nukleosid, das an einen festen Träger gebunden ist, der feste Träger mit Acetonitril vor und nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrenn- oder Oxidierungsschritte gewaschen, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, oder ist mindestens eines der Kopplungs- oder Oxidierungsreagenzien in einem Acetonitril-Lösungsmittel mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm.

[0016] In einer bevorzugten Ausführungsform wird der feste Träger mit Acetonitril vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrenn- oder Oxidierungsschritte gewaschen, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, und ist mindestens eines der Abtrenn- oder Oxidierungsreagenzien in einem Acetonitril-Lösungsmittel mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm.

[0017] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird der feste Träger mit Acetonitril vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrenn- oder Oxidierungsschritte gewaschen, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, und sind die Abtrenn- und Oxidierungsreagenzien in einem Acetonitril-Lösungsmittel mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm.

[0018] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist der Wassergehalt des Acetonitrils zwischen 30 ppm und 400 ppm. Es ist weiter bevorzugt, daß der Wassergehalt zwischen 30 ppm und 200 ppm ist. In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Wassergehalt zwischen 200 und 400 ppm.

[0019] Verfahren zum Synthetisieren von Oligonukleotiden schließen die Umwandlung eines Nukleosids oder einer Nukleobase in eine aktivierte Phosphor-Verbindung, gefolgt von Lösungsphasen- oder Festphasenchemie zur Kopplung der aktivierten Phosphor-Verbindung an eine wachsende Oligonukleotidkette ein. Lösungs- und Festphasenchemie schließen typischerweise einen vielstufigen Reaktionszyklus ein, welcher für jede Addition der aktivierten Phosphor-Verbindung wiederholt wird. Repräsentative Lösungsphasentechniken werden in den US-Patenten mit den Nrn. 5,210,264 und 5,571,902, beide hiermit durch Bezugnahme eingefügt, beschrieben. Repräsentative Festphasentechniken sind solche, die typischerweise für DNA- und RNA-Synthese unter Nutzung der Standard-Phosphoramidit-Chemie eingesetzt werden. Siehe z. B. *Protocols For Oligonucleotides And Analogs*, Agrawal, S., Hrsg., Humana Press, Totowa, NJ, 1993. Ein typischer Festphasenreaktionszyklus unter Verwendung von Phosphoramiditen schließt die folgenden Schritte ein: Waschen des festen Trägers, Detritylieren, das den Zuckerrest entschützt, Waschen, Koppeln eines Phosphoramidit-Monomeren mit dem detritylierten Nukleosid, Waschen, Abtrennen des nicht umgesetzten/nicht gekoppelten, an den Träger gebundenen Phosphoramidit-Monomeren, Waschen, Oxidieren der Phosphor-Nukleosid-Bindung und Waschen. Siehe z. B. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Eckstein, F., Hrsg., IRL Press, N.Y., 1991. Oxidation kann dem Abtrennen folgen und wird in Schema 1 zusammen mit allen Waschschritten gezeigt.

SCHEMA 1
Synthesesyklus

[0020] Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren für die Synthese eines Oligonukleotids bereit, umfassend die Schritte des Bindens eines ersten geschützten Nukleosids an einen festen Träger mittels einer kovalenten Verknüpfung. Das erste Nukleosid kann an den festen Träger entweder direkt oder über einen Linker gebunden werden, unter Anwendung von Standardverfahren und Vorschriften, die im Stand der Technik bekannt sind. Siehe z. B. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Eckstein, F., Hrsg., IRL Press, N.Y., 1991, hiermit in seiner Gesamtheit durch Bezugnahme eingefügt. Der Bindungsschritt wird dann gefolgt vom Entschützen der Hydroxylgruppe, um eine reaktive Hydroxylgruppe freizulegen. Dies wird gefolgt von dem Koppeln eines zweiten Phosphoramidits mit der reaktiven Hydroxylgruppe des ersten Nukleosids zur Bildung einer Phosphor-Nukleosid-Bindung, Abtrennen jedes verbleibenden nicht gekoppelten aber ungeschützten ersten Nukleosids und Oxidieren der Phosphor-Nukleosid-Bindung mit einem Oxidierungsreagenz. Die Entschützungs-, Kopplungs-, Abtrenn- und Oxidierungsschritte werden iterativ wiederholt, bis ein Oligonukleotid der gewünschten Sequenz und Länge gebildet worden ist. Gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung

wird der feste Träger während der Synthese eines Oligonukleotids mit Acetonitril vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrenn- oder Oxidierungsschritte gewaschen, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, oder ist mindestens eines der Abtrenn- oder Oxidierungsreagenzien in einem Acetonitril-Lösungsmittel mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm.

[0021] In einer bevorzugten Ausführungsform wird der feste Träger mit Acetonitril vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrenn- oder Oxidierungsschritte gewaschen, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, und sind mindestens eines der Abtrenn- oder Oxidierungsreagenzien in einem Acetonitril-Lösungsmittel mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm.

[0022] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird der feste Träger mit Acetonitril vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrenn- oder Oxidierungsschritte gewaschen, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, und sind die Abtrenn- und Oxidierungsreagenzien in einem Acetonitril-Lösungsmittel mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm.

[0023] In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, daß der Wassergehalt des Acetonitrils zwischen 30 ppm und 400 ppm ist. Es ist ferner bevorzugt, daß der Wassergehalt zwischen 30 ppm und 200 ppm ist. In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Wassergehalt zwischen 200 ppm und 400 ppm.

[0024] Es ist universell geglaubt worden, daß Acetonitril mit geringem Wassergehalt im gesamten Oligonukleotidsyntheseverfahren verwendet muß. Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren zur Verwendung von Acetonitril mit einem Wassergehalt von mehr als 30 ppm, aber weniger als 1250 ppm während der Waschschrte der Oligonukleotidsynthese oder als ein Lösungsmittel für die Abtrennlösung oder als ein Lösungsmittel für ein Oxidations/Schwefelungsmittel bereit. Große Einsparungen in der Zeit und den Kosten werden dadurch erreicht.

[0025] In der Festphasensynthese wird das entschützte 5'-Hydroxyl des an den Träger gebundenen Nukleosids oder der wachsenden Oligonukleotidkette mit einem 5'-geschützten aktivierten Phosphoramidit-Nukleosid umgesetzt, um eine kovalente Verknüpfung zwischen dem an den Träger gebundenen Nukleosid und dem Phosphoramidit-Nukleosid herzustellen. Die aktivierte Phosphorverbindung ist eine, von der bekannt ist, daß sie eine Kopplungsreaktion mit dem geschützten 5'-Hydroxyl einer wachsenden oligomeren Kette nach den Standardsynthesemethoden, wie zum Beispiel den Phosphoramidit-, Phosphotriester- und N-Phosphonat-Syntheseverfahren, eingeht. Siehe z. B. Caruthers, US-Patente mit den Nrn. 4,415,732, 4,458,066, 4,500,707, 4,668,777, 4,973,679 und 5,132,418; Yau, E. K., US-Patent mit der Nr. 5,210,264, und Koster, US-Patente mit den Nrn. 4,725,677 und Re. 34,069; wobei die Offenbarungen jedes dieser Patente hiermit durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit eingefügt werden; Sekine, M. et al., J. Org. Chem., 1979, 44, 2325; Dahl, O., Sulfur Reports, 1991, 11, 167–192; Kresse, J. et al., Nucleic Acids Res., 1975, 2, 1–9; Eckstein, F., Ann. Rev. Biochem., 1985, 54, 367–402; und Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Eckstein, F., Hrsg., IRL Press, New York, 1991.

[0026] Jedes aktivierende Mittel, oder jeder Aktivator, das/der den Phosphor gegenüber nukleophilem Angriff aktivieren kann, ohne mit der wachsenden Nukleotidkette zu interagieren, kann für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sein. Solche Mittel sind im allgemeinen milde Säurekatalysatoren. Ein bevorzugtes aktivierendes Mittel ist Tetrazol. Einige allgemein verwendete, kommerziell erhältliche aktivierende Mittel sind Thiotetrazol, Nitrotetrazol und N,N-Diisopropylaminohydrotetrazolid. Andere geeignete aktivierende Mittel werden auch in den oben eingefügten Patenten sowie in dem US-Patent 4,725,677, hiermit durch Bezugnahme eingefügt, und in Berner, S. et al., Nucleic Acids Res. 1989, 17: 853, Dahl, B. H. et al., Nucleic Acids Res. 1987, 15: 1729, und Nielsen, J. et al., Chem Res., Synop. 1986, 1, 26–27, offenbart.

[0027] In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird eine Oxidation der Phosphitbindung zu einer Phosphodiesterbindung nach jedem Entschützens-Kopplungs-Schritt durchgeführt. Nützliche Oxidierungsmittel für die Herstellung von Phosphodiester-Oligonukleotiden schließen Iod und t-Butylhydroperoxid ein.

[0028] Alternativ wird Oxidation mit Schwefelungsmitteln eingesetzt, um Phosphorthioat-Verknüpfungen zu bilden. Diese schließen Beaucage-Reagenz (siehe z. B. Iyer, R. P. et al., J. Chem. Soc., 1990, 112, 1253–1254, und Iyer, R. P. et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 4693–4699), Tetraethylthiuramdisulfid (siehe z. B. Vu, H. und Hirschbein, B. L., Tetrahedron Lett., 1991, 32, 3005–3008), Dibenzoyltetrasulfid (siehe z. B. Rao, M. V. et al., Tetrahedron Lett., 1992, 33, 4839–4842), Di(phenylacetyl)disulfid (PADS) (siehe z. B. Karner, P. C. J., Tetrahedron Lett., 1989, 30, 6757–6760), 1,2,4-Dithiazolin-5-on (DtsNH) und 3-Ethoxy-1,2,4-dithiazolin-5-on

(EDITH) und (siehe Xu et al., Nucleic Acids Research, 1996, 24, 3643–3644, und Xu et al., Nucleic Acids Research, 1996, 24, 1602–1607), Thiophosphor-Verbindungen, wie solche, die in dem US-Patent mit der Nr. 5,292,875 für Stec et al., und in dem US-Patent mit der Nr. 5,151,510 für Stec et al. offenbart sind, insbesondere Bis(O,O-diisopropoxyphosphinothioyl)disulfid, Disulfide von Sulfonsäuren, wie solche, die in Efimov et al., Nucleic Acids Research, 1995, 23, 4029–4033, offenbart sind, Schwefel, Schwefel in Kombination mit Liganden wie Triaryl-, Trialkyl-, Triaralkyl- oder Trialkaryl-Phosphinen ein. Bevorzugte Oxidations/Schwefelungsmittel für diese Erfindung schließen Iod, t-Butylhydroperoxid und PADS ein.

[0029] Abtrennreagenzien (Cap-Bildungsreagenzien) schließen kommerziell erhältliche Lösungen ein, die für solche Zwecke bestimmt sind. Der Abtrennschritt schützt nicht umgesetztes, trägergebundenes Phosphoramidit-Monomer davor, in einem späteren Schritt zu reagieren. Ein üblicher Satz an Abtrennreagenzien ist Acetanhydridlösung in Acetonitril und eine 4-Methylaminopyridin-Lösung in Tetrahydrofuran (THF). Acetonitril kann auch anstelle von THF als ein Lösungsmittel für 4-Methylaminopyridin verwendet werden. Die meisten anderen verwendeten Abtrennreagenzien sind Derivate von Acetanhydrid. Beispielsweise wird, wenn Phenoxycetyl als Schutzgruppe für exocyclische Amine verwendet wird, Phenylessigsäureanhydrid als Abtrennreagenz verwendet.

[0030] Feste Träger, die in der Festphasen-Oligonukleotidsynthese verwendet werden, schließen Controlled Pore-Glass (CPG), Oxalyl-Controlled Pore-Glass (siehe z. B. Alul et al., Nucleic Acids Research 1991, 19, 1527), TentaGel Support – ein Aminopolyethylenglykol-derivatisierter Träger (siehe z. B. Wright et al., Tetrahedron Letters 1993, 34, 3373), Poros – ein Copolymer aus Polystyrol/Divinylbenzol oder PRIMER SUPPORT® HL, 30 – ein Träger auf Polystyrol-Basis (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) ein. Bevorzugte feste Träger, die dieser Erfindung zugänglich sind, schließen solche ein, die hydrophob sind. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung benutzen feste Träger auf Polystyrol-Basis. Viele andere feste Träger sind kommerziell erhältlich und der vorliegenden Erfindung zugänglich.

[0031] Es wird erkannt, daß die Äquivalente von Phosphoramidit variieren können. Äquivalente sind definiert als das Molverhältnis von Phosphoramiditen zur Beladung des festen Trägers. Es ist bekannt, daß Phosphoramidite als Trocknungsmittel wirken. Daher können bei der Verwendung von mehr Äquivalenten an Phosphoramiditen größere Mengen an Wasser im Acetonitril vorhanden sein, das in der Erfindung verwendet wird. Beispielsweise kann bei 2,5 Äquivalenten Acetonitril mit einem Wassergehalt von mehr als 30 ppm und weniger als 1250 ppm verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung von Acetonitril mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und 1000 ppm. Bei 2,5 Äquivalenten kann Acetonitril mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und 850 ppm verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung von Acetonitril mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und 600 ppm. Bei 1,75 Äquivalenten kann Acetonitril mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und 650 ppm verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung von Acetonitril mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und 400 ppm. Bei 1,5 Äquivalenten kann Acetonitril mit einem Wassergehalt von mehr als 30 ppm und weniger als 1250 ppm verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung von Acetonitril mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und 1000 ppm. Basierend auf dieser Information kann der mögliche Wassergehalt, der mit anderen Äquivalenten zu verwenden ist, bestimmt werden.

[0032] Die Verfahren der Erfindung sind den wohlbekannten Techniken der Festphasensynthese zugänglich. Die Ausstattung für eine solche Synthese wird von einigen Anbietern einschließlich Applied Biosystems, Pharmacia und Milligen verkauft. Sowohl die Applied Biosystems- als auch die Milligen-Systeme benutzen einen aufrechten Reaktionsbehälter zum Halten des festen Trägers. Lösungsmittel werden in den Behälter gepumpt und mit dem festen Träger gemischt. Ein Inertgas, typischerweise Argon, wird verwendet, um Lösungsmittel rasch zu entfernen. Solche Instrumente verwenden eine Fließbett-Technologie. Instrumente wie das OligoPilot II, verkauft von Pharmacia, verwenden einen Durchflußreaktor, ähnlich dem Konzept der Säulenchromatographie. Die Verwendung von Instrumenten, die einen Durchflußreaktor benutzen, ist bevorzugt. Alle anderen Mittel für eine solche Synthese können ebenfalls eingesetzt werden, die tatsächliche Synthese der Oligonukleotide ist gut im Bereich der Fähigkeiten eines erfahrenen Fachmanns.

[0033] Es ist wohlbekannt, ähnliche Techniken zu verwenden, um Oligonukleotide, die Phosphorthioat-Bindungen enthalten, und Oligonukleotide, die 2'-Alkoxy- oder 2'-Alkoxyalkoxy-Modifikationen enthalten, einschließlich 2'-O-Methoxyethyl (Martin, P., Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486), herzustellen. Es ist ebenfalls wohlbekannt, ähnliche Techniken und kommerziell erhältliche modifizierte Phosphoramidite wie Biotin-, Fluorescein-, Acridin- oder Psoralen-modifizierte Phosphoramidite (erhältlich von Glen Research, Sterling, VA) zu verwenden, um fluoreszenzmarkierte, biotinylierte oder andere konjugierte Oligonukleotide zu synthetisieren.

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird Acetonitril mit einem Wassergehalt von

mehr als 30 ppm und kleiner als 1250 ppm von kommerziellen Quellen gekauft und verwendet, wie es ist. Acetonitril solcher Qualität ist leicht erhältlich von vielen Anbietern, einschließlich J. T. Baker (Phillipsburg, NJ), und kann als HPLC-Qualität markiert sein. In anderen Ausführungsformen der Erfindung kann Acetonitril mit wenig Wasser nach der Verwendung rezykliert werden. Typischerweise wird das Acetonitril nach der Oligonukleotid-Synthese verworfen. Es wird geglaubt, daß das Acetonitril zuviel Wasser enthalten wird, um nützlich zu sein. Die hier offenbarte Erfindung unterstützt die Verwendung von rezykliertem Acetonitril, das einen Wassergehalt von mehr als 30 ppm enthält.

[0035] Im Zusammenhang dieser Erfindung bezieht sich der Ausdruck "Oligonukleotid" auf ein Oligomer oder Polymer von Ribonukleinsäure oder Desoxyribonukleinsäure. Dieser Ausdruck schließt Oligonukleotide ein, die aus natürlich vorkommenden Nukleobasen, Zuckern und kovalenten Zwischenzucker-(Rückgrat-)Verknüpfungen aufgebaut sind, sowie Oligonukleotide mit nicht natürlich vorkommenden Teilen, welche ähnlich wirken, ein. Solche modifizierten oder substituierten Oligonukleotide sind oft gegenüber nativen Formen bevorzugt wegen erwünschter Eigenschaften wie zum Beispiel erhöhte zelluläre Aufnahme, verstärkte Bindung an das Target und erhöhte Stabilität in Gegenwart von Nukleasen.

[0036] Spezifische Beispiele bevorzugter modifizierter Oligonukleotide schließen solche ein, die Phosphorthioate, Phosphotriester, Methylphosphonate, kurzkettige Alkyl- oder Cycloalkyl-Interzucker-Verknüpfungen oder kurzkettige Heteroatom- oder heterocyclische Interzucker-Verknüpfungen enthalten. Am meisten bevorzugt sind Oligonukleotide mit Phosphorthioaten (abgekürzt als P=S) und solche mit $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2\text{-}$ [bekannt als ein Methylen(methylimino)- oder MMI-Rückgrat], $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-}$ und $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ Rückgraten, wobei das native Phosphodiester-Rückgrat (abgekürzt als P=O) als O-P-O-CH_2 dargestellt wird. Ebenfalls bevorzugt sind Oligonukleotide mit Morpholino-Rückgrat-Strukturen (Summerton und Weller, US-Patent 5,034,506). Weiter bevorzugt sind Oligonukleotide mit $\text{NR-C(*)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-NR-C(*)-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NR-C(*)-}$, $\text{C(*)-NR-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ und $\text{CH}_2\text{-C(*)-NR-CH}_2\text{-}$ Rückgraten, wobei "*" O oder S darstellt (bekannt als Amid-Rückgrate, DeMesmaeker et al., WO 92/20823, veröffentlicht am 26. November 1992). In anderen bevorzugten Ausführungsformen wie dem Peptid-Nukleinsäure-(PNA)-Rückgrat ist das Phosphodiester-Rückgrat des Oligonukleotids durch ein Polyamid-Rückgrat ersetzt, wobei die Nukleobasen direkt oder indirekt an die Aza-Stickstoffatome des Polyamid-Rückgrats gebunden sind (Nielsen et al., Science 1991, 254, 1497; US-Patent mit der Nr. 5,539,082). Andere bevorzugte modifizierte Oligonukleotide können einen oder mehrere substituierte Zuckerreste enthalten, umfassend einen der folgenden in der 2'-Position: OH, SH, SCH_3 , F, OCN, OCH_3OCH_3 , $\text{OCH}_3\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ oder $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$, wobei n von 1 bis etwa 10 ist; O-R oder O-R-O-R, wobei R C_1 bis C_{10} Niederalkyl, substituiertes Niederalkyl, Alkaryl oder Aralkyl ist; O-substituiertes Niederalkyl, Cl; Br; CN; CF_3 ; OCF_3 ; O-, S- oder N-Alkyl; O-, S- oder N-Alkenyl; SOCH_3 ; SO_2CH_3 ; ONO_2 ; NO_2 ; N_3 ; NH_2 ; Heterocycloalkyl; Heterocycloalkaryl; Aminoalkylamino; Polyalkylamino; substituiertes Silyl; eine RNA-spaltende Gruppe; eine Reportergruppe; eine interkalierende Verbindung; eine Gruppe zum Verbessern der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Oligonukleotids; oder eine Gruppe zum Verbessern der pharmakodynamischen Eigenschaften eines Oligonukleotids und andere Substituenten mit ähnlichen Eigenschaften. Eine bevorzugte Modifikation schließt 2'-O-Methoxyethyl [welches als $2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ geschrieben werden kann und auch als 2'-O-(2-Methoxyethyl) oder 2'-Methoxyethoxy bekannt ist] (Martin et al., Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486) ein. Andere bevorzugte Modifikationen schließen 2'-Methoxy ($2'\text{-O-CH}_3$), 2'-Propoxy ($2'\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) und 2'-Fluor ($2'\text{-F}$) ein. Ähnliche Modifikationen können auch an anderen Positionen an dem Oligonukleotid gemacht werden, insbesondere an der 3'-Position des Zuckers am 3'-terminalen Nukleotid und an der 5'-Position am 5'-terminalen Nukleotid. Oligonukleotide können auch Zuckermimetika wie Cyclobutyle anstelle der Pentofuranosylgruppe aufweisen.

[0037] Die durch die Erfindung hergestellten Oligonukleotide können zusätzlich oder alternativ Nukleobasenmodifikationen oder -substitutionen aufweisen. Wie hier verwendet schließen "nicht modifizierte" oder "natürliche" Nukleobasen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T), Cytosin (C) und Uracil (U) ein. Modifizierte Nukleobasen schließen Nukleobasen ein, die nur selten oder vorübergehend in natürlichen Nukleinsäuren gefunden werden, z. B. Hypoxanthin, 6-Methyladenin und 5-Methylcytosin, sowie synthetische Nukleobasen, z. B. 5-Bromuracil, 5-Hydroxymethyluracil, 8-Azaguanin, 7-Deazaguanin, N^6 (6-Aminohexyl)adenin und 2,6-Diaminopurin (Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1974, S. 75–77; Gebeyehu, G. et al., Nucleic Acids Res. 1987, 15, 4513). 5-Methylcytosin (5-me-C) ist gegenwärtig eine bevorzugte Nukleobase, insbesondere in Kombination mit 2'-O-Methoxyethyl-Modifikationen.

[0038] Eine andere bevorzugte zusätzliche oder alternative Modifikation der Oligonukleotide, die gemäß den Verfahren der Erfindung hergestellt werden, schließt das chemische Verknüpfen mit dem Oligonukleotid von einem oder mehreren lipophilen Resten, welche die zelluläre Aufnahme des Oligonukleotids erhöhen, ein. Solche lipophilen Reste können mit einem Oligonukleotid an einigen verschiedenen Positionen an dem Oligonu-

kleotid verknüpft sein. Einige bevorzugte Positionen schließen die 3'-Position des Zuckers des 3'-terminalen Nukleotids, die 5'-Position des Zuckers des 5'-terminalen Nukleotids und die 2'-Position des Zuckers irgendeines Nukleotids ein. Die N⁶-Position einer Purin-Nukleobase kann auch benutzt werden, um einen lipophilen Rest an ein Oligonukleotid der Erfindung zu binden (Gebeyehu, G. et al., *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 4513). Solche lipophilen Reste schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf einen Cholesterylrest (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6553), Cholsäure (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994, 4, 1053), einen Thioether, z. B. Hexyl-S-tritylthiol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992, 660, 306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993, 3, 2765), ein Thiocholesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.* 1992, 20, 533), eine aliphatische Kette, z. B. Dodecandiol- oder Undecylreste (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.* 1991, 10, 111; Kabanov et al., *FEBS Lett.* 1990, 259, 327; Svinarchuk et al., *Biochimie* 1993, 75, 49), ein Phospholipid, z. B. Dihexadecyl-rac-glycerol oder Triethylammonium-1,2-di-O-hexadecyl-rac-glycero-3-H-phosphonat (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.* 1990, 18, 3777), eine Polyamin- oder eine Polyethylenglykolkette (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleosides* 1995, 14, 969) oder Adamantanessigsäure (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3651), einen Palmitylrest (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1264, 229) oder einen Octadecylamin- oder Hexylamino-carbonyloxycholesterol-Rest (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 277, 923). Oligonukleotide, die lipophile Reste umfassen, und Verfahren zum Herstellen solcher Oligonukleotide werden offenbart in den US-Patenten mit der Nr. 5,138,045, mit der Nr. 5,218,105 und mit der Nr. 5,459,255, deren Inhalte hiermit durch Bezugnahme eingefügt werden.

[0039] Oligonukleotide, welche chimärische Oligonukleotide sind, können auch gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung hergestellt werden. "Chimärische" Oligonukleotide oder "Chimären" sind im Zusammenhang dieser Erfindung Oligonukleotide, welche zwei oder mehrere chemisch unterschiedliche Regionen enthalten, wobei jede aus mindestens einem Nukleotid gebildet ist. Diese Oligonukleotide enthalten typischerweise mindestens eine Region, in der das Oligonukleotid modifiziert ist, so daß dem Oligonukleotid erhöhte Widerstandskraft gegenüber Nukleaseabbau, erhöhte zelluläre Aufnahme und/oder erhöhte Bindungsaffinität für die Target-Nukleinsäure verliehen wird. Eine zusätzliche Region des Oligonukleotids kann als ein Substrat für Enzyme dienen, die in der Lage sind, RNA:DNA- oder RNA:RNA-Hybride zu spalten. Beispielsweise ist RNase H eine zelluläre Endonuklease, welche den RNA-Strang eines RNA:DNA-Doppelstrangs abspaltet. Aktivierung von RNase H führt daher zur Spaltung des RNA-Targets, wodurch die Wirksamkeit der Antisense-Hemmung der Genexpression stark gesteigert wird. Spaltung des RNA-Targets kann routinemäßig durch Gelelektrophorese und, falls notwendig, durch assoziierte Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken detektiert werden.

[0040] Beispiele chimärischer Oligonukleotide schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf "Gapmere", in welchen drei unterschiedliche Regionen vorhanden sind, normalerweise mit einer zentralen Region, die von zwei Regionen flankiert wird, welche chemisch zueinander äquivalent, aber verschieden von dem Gap (Zwischenraum) sind. Ein bevorzugtes Beispiel eines Gapmeren ist ein Oligonukleotid, in welchem ein zentraler Teil (der "Gap") des Oligonukleotids als ein Substrat für RNase H dient und bevorzugt aus 2'-Desoxynukleotiden zusammengesetzt ist, während die flankierenden Teile (die 5'- und 3'-"Flügel") modifiziert sind, um eine größere Affinität für das Target-RNA-Molekül aufzuweisen, aber unfähig sind, Nukleaseaktivität zu unterstützen (z. B. 2'-Fluor- oder 2'-O-Methoxyethyl-substituiert). Andere Chimären schließen "Wingmere" ein, auch bekannt als "Hemimere", das sind Oligonukleotide mit zwei unterschiedlichen Regionen. In einem bevorzugten Beispiel eines Wingmeren dient der 5'-Teil des Oligonukleotids als ein Substrat für RNase H und ist bevorzugt aus 2'-Desoxynukleotiden zusammengesetzt, während der 3'-Teil in einer solchen Weise modifiziert ist, daß er eine größere Affinität für das Target-RNA-Molekül aufweist, aber unfähig ist, Nukleaseaktivität zu unterstützen (z. B. 2'-Fluor- oder 2'-O-Methoxyethyl-substituiert), oder umgekehrt. In einer Ausführungsform enthalten die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung eine 2'-O-Methoxyethyl-(2'-O-CH₂CH₂OCH₃-)Modifikation an dem Zuckerrest wenigstens eines Nukleotids. Es ist gezeigt worden, daß diese Modifikation sowohl die Affinität des Oligonukleotids für sein Target als auch Nukleaseresistenz des Oligonukleotids steigert. Erfindungsgemäß können eine, eine Vielzahl oder alle Nukleotid-Untereinheiten der Oligonukleotide der Erfindung eine 2'-O-Methoxyethyl-(2'-O-CH₂CH₂OCH₃-)Modifikation tragen. Oligonukleotide, umfassend eine Vielzahl von Nukleotid-Untereinheiten mit einer 2'-O-Methoxyethyl-Modifikation, können eine solche Modifikation an jedweder Nukleotid-Untereinheit in dem Oligonukleotid aufweisen und können chimärische Oligonukleotide sein. Abgesehen davon oder zusätzlich zu den 2'-O-Methoxyethyl-Modifikationen sind auch Oligonukleotide, die andere Modifikationen enthalten, welche die Antisense-Wirkungsstärke, -Wirksamkeit oder Target-Affinität steigern, bevorzugt. Chimärische Oligonukleotide, umfassend eine oder mehrere solcher Modifikationen, sind gegenwärtig bevorzugt. Oligonukleotide, die gemäß den Verfahren dieser Erfindung hergestellt werden, sind von 5 bis 50 Nukleotide lang. Im Zusammenhang dieser Erfindung wird verstanden, daß diese nicht natürlich vorkommende Oligomere, wie hier zuvor beschrieben, mit 5 bis 50 Monomeren umfaßt.

BEISPIELE

Beispiel 1: Herstellung von Acetonitril

[0041] Zu Acetonitril mit wenig Wasser wurden verschiedene Mengen destillierten Wassers hinzugegeben, berechnet, um Acetonitril mit Wassergehalten von 200, 400 und 1200 ppm zu ergeben. Der tatsächliche Wassergehalt wurde unter Anwendung des Karl-Fischer-Verfahrens gemessen. Acetonitril mit Wassergehalten von 243, 396 und 650 ppm wurde erhalten.

Beispiel 2: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 243 ppm-Acetonitril

[0042] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer unter Anwendung von Standardbedingungen in einem 175 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 243 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 243 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal, S., Hrsg., Humana Press, New Jersey 1993, 33–61).

Beispiel 3: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 396 ppm-Acetonitril

[0043] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 175 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 396 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 396 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 4: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 650 ppm-Acetonitril

[0044] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 175 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 650 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 650 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 5: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 243 ppm-Acetonitril

[0045] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 243 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 243 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit we-

nig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 6: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 396 ppm-Acetonitril

[0046] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 396 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 396 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 7: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 650 ppm-Acetonitril

[0047] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 650 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 650 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 8: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GCG-TTT-GCT-CTT-CTT-CTT-GCG)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 243 ppm-Acetonitril

[0048] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 243 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 243 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 9: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GCG-TTT-GCT-CTT-CTT-CTT-GCG)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 396 ppm-Acetonitril

[0049] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 396 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 396 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 10: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GCG-TTT-GCT-CTT-CTT-CTT-GCG)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 650 ppm-Acetonitril

[0050] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL,

30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 650 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 650 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 11: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GTT-CTC-GCT-GGT-GAG-TTT-CA)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 243 ppm-Acetonitril

[0051] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 243 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 243 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 12: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GTT-CTC-GCT-GGT-GAG-TTT-CA)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 396 ppm-Acetonitril

[0052] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 396 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 396 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 13: Synthese von vollmodifiziertem 5'-d(GTT-CTC-GCT-GGT-GAG-TTT-CA)-3'-Phosphorthioat-Oligonukleotid mit 650 ppm-Acetonitril

[0053] Die Synthese der obigen Sequenz wurde auf einem Pharmacia OligoPilot II-Synthesizer in einem 620 mmol-Maßstab unter Verwendung der Cyanoethylphosphoramidite und Pharmacias PRIMER SUPPORT® HL, 30, ausgeführt. Amiditlösungen wurden in Acetonitril mit wenig Wasser hergestellt. 1,75 Äquivalente Phosphoramidit wurden verwendet. Detritylierung wurde unter Verwendung von 3% Dichloressigsäure in Toluol (Volumen/Volumen) ausgeführt. Schwefeln wurde unter Verwendung einer 0,2 M Lösung von Phenylacetyldisulfid in 650 ppm-Acetonitril : 3-Picolin (1 : 1 Vol./Vol.) für 2 Minuten ausgeführt. Acetonitril enthaltend 650 ppm Wasser wurde für das Waschen und als ein Lösungsmittel für die Abtrennreagenzien verwendet. Acetonitril mit wenig Wasser wurde als ein Lösungsmittel für Tetrazol verwendet. Am Ende der Synthese wurde der Träger mit Acetonitril gewaschen, abgespalten, entschützt und in üblicher Weise gereinigt.

Beispiel 14: Effizienz der Oligonukleotidsynthese unter Verwendung von Acetonitril mit variierenden Wassergehaltmengen

[0054] Die Sequenz 5'-TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT-3' wurde wie in den Beispielen 2–4 beschrieben synthetisiert. Eine zusätzliche Synthese wurde im wesentlichen wie beschrieben ausgeführt unter Verwendung von Acetonitril mit wenig Wasser. Messungen der Qualität der Synthesen wurden wie in Tabelle 1 gezeigt erhalten. Alle durchgeführten Tests waren wie in Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal, S., Hrsg., Humana Press, New Jersey 1993, beschrieben. Der Gesamtlängengehalt wurde mittels Kapillargelelektrophorese analysiert. Das Verhältnis von Phosphorthioat zu Phosphodiester (P=S : P=O) wurde mittels ³¹P-NMR gemessen. Die Rohausbeute wurde mittels UV-Spektrophotometrie gemessen.

[0055] Es ist klar, daß die Verwendung von Acetonitril mit einem Wassergehalt zwischen 30 ppm und 400 ppm nicht zu einer verminderten Effizienz der Oligonukleotidsynthese führt. Die Verwendung von Acetonitril mit ei-

nem Wassergehalt von 650 ppm führte zu verminderten Rohausbeuten, aber andere Qualitätsmaße wurden nicht beeinflusst.

TABELLE 1

Synthese von TCCCGCCTGTGACATGCATT unter Verwendung von Acetonitril mit variierendem Wassergehalt

Wassergehalt des Acetonitrils	Rohausbeute (A260-Einheiten)/mmol Träger	Rohgesamtlänge (%)	Gereinigte Gesamtlänge (%)	Gereinigt n-1 (%)	P=S:P=O
30 ppm	123	72	89	2,1	99,3:0,7
243 ppm	119	73	89,1	2,4	99,5:0,5
396 ppm	124	73	90	2,1	99,3:0,7
650 ppm	104	64	92	2,1	99,3:0,7

Patentansprüche

1. Verfahren zum Binden eines Phosphoramidit-Nukleosids an ein Nukleosid, welches an einen festen Träger gebunden ist, umfassend die Schritte
 - (a) des Koppelns des Phosphoramidit-Nukleosids an eine reaktive Hydroxylgruppe des Nukleosids, welches an einen festen Träger gebunden ist, um dazwischen eine Phosphor-Nukleosid-Bindung zu bilden, und
 - (b) des Oxidierens der Phosphor-Nukleosid-Bindung mit einem Oxidierungsreagenz, wobei der feste Träger mit Acetonitril vor oder nach mindestens einem der Kopplungs- oder Oxidierungsschritte gewaschen wird, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist oder das Oxidierungsreagenz in einem Acetonitril-Lösungsmittel, das einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, vorliegt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiter vor dem Oxidierungsschritt einen Schritt des Abtrennens des Nukleosids, welches an einen festen Träger gebunden ist und welches ungekoppelt bleiben kann, mit einem Abtrennreagenz umfaßt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 400 ppm liegt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 200 ppm liegt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Wassergehalt zwischen etwa 200 ppm und etwa 400 ppm liegt.
6. Verfahren nach Anspruch 2, worin mindestens eines von dem Abtrennreagenz oder dem Oxidierungsreagenz in einem Acetonitril-Lösungsmittel, das einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, vorliegt.
7. Verfahren nach Anspruch 2, worin der feste Träger mit Acetonitril vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrennungs- oder Oxidierungsschritte gewaschen wird, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist und das Abtrennreagenz und das Oxidierungsreagenz in einem Acetonitril-Lösungsmittel, das einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, vorliegt.
8. Verfahren zur Synthese eines Oligonukleotids, umfassend die Schritte
 - (a) des Bindens eines ersten Nukleosids an einen festen Träger über eine kovalente Verknüpfung,
 - (b) des Koppelns eines Phosphoramidit-Nukleosids an eine reaktive Hydroxylgruppe des ersten Nukleosids, um dazwischen eine Phosphor-Nukleosid-Bindung zu bilden,
 - (c) des Abtrennens des ersten Nukleosids, welches ungekoppelt bleiben kann, mit einem Abtrennreagenz,
 - (d) des Oxidierens der Phosphor-Nukleosid-Bindung mit einem Oxidierungsreagenz und
 - (e) des Abspaltens des Oligonukleotids von dem festen Träger,
 wobei der feste Träger mit Acetonitril vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrennungs- oder Oxidierungsschritte gewaschen wird, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist oder mindestens eines von dem Abtrennreagenz oder dem Oxidierungsreagenz in einem Acetonitril-Lösungsmittel, das einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, vorliegt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, weiter umfassend den Schritt des iterativen Wiederholens der Schritte (b) bis (d) mit nachfolgenden Phosphoramidit-Nukleosiden, um ein Oligonukleotid zu bilden.
10. Verfahren nach Anspruch 8, worin der feste Träger vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrennungs- oder Oxidierungsschritte mit Acetonitril gewaschen wird, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist und mindestens eines von dem Abtrennreagenz oder dem Oxidierungsreagenz in einem Acetonitril-Lösungsmittel, das einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, vorliegt.
11. Verfahren nach Anspruch 8, worin der feste Träger vor oder nach mindestens einem der Kopplungs-, Abtrennungs- oder Oxidierungsschritte mit Acetonitril gewaschen wird, wobei das Acetonitril einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist und das Abtrennreagenz und das Oxidierungsreagenz in einem Acetonitril-Lösungsmittel, das einen Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 1250 ppm aufweist, vorliegen.
12. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 400 ppm liegt.

13. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Wassergehalt zwischen 30 ppm und etwa 200 ppm liegt.
14. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Wassergehalt zwischen etwa 200 ppm und etwa 400 ppm liegt.
15. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der feste Träger hydrophob ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der feste Träger auf Polystyrol basiert.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der feste Träger in eine Säule gepackt ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen