



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 914**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07C 19/045 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02706042 .5**

86 Fecha de presentación : **29.01.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1356115**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54 Título: **Procedimientos de detección de hidrato de cloral en ácido dicloroacético.**

30 Prioridad: **30.01.2001 US 264920 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

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

72 Inventor/es: **Wheeler, Patrick y**
Capaldi, Daniel, C.

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 276 914 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de detección de hidrato de cloral en ácido dicloroacético.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se relaciona generalmente con procedimientos novedosos que comprenden la síntesis de oligonucleótidos para detectar hidrato de cloral en ácido dicloroacético.

10 **Antecedentes de la invención**

Es bien sabido que las proteínas afectan la mayoría de los estados corporales en organismos multicelulares, incluyendo los estados de enfermedad. Tales proteínas, ya sea que actúen directamente o a través de sus funciones enzimáticas o de otras funciones, contribuyen en mayor proporción a muchos estados de enfermedad y funciones reguladoras en animales y en el hombre. Para estados de enfermedad, la terapéutica clásica se ha enfocado generalmente en las interacciones con tales proteínas, en un esfuerzo por moderar las causas de la enfermedad o las funciones potenciadoras de la enfermedad. Lo que se desea con los nuevos enfoques terapéuticos es la modulación de la producción real de proteínas. Interfiriendo con la producción de proteínas, el máximo efecto terapéutico puede ser obtenido con efectos secundarios mínimos. Por lo tanto es un objetivo general de tal enfoque terapéutico el interferir con ó, de otro modo, modular la expresión genética, que llevaría a una formación proteica no deseada.

Un método para inhibir una expresión genética específica es por medio del uso de oligonucleótidos, especialmente oligonucleótidos que son complementarios con un blanco específico de una secuencia de ARN mensajero, (mRNA). Se están llevando a cabo ensayos clínicos con varios oligonucleótidos para tales usos. Los oligonucleótidos también pueden servir como inhibidores competitivos de los factores de transcripción, los cuales interactúan con ADN de doble cadena durante la regulación de la transcripción, para modular su acción. Varios informes recientes describen tales interacciones (ver, por ejemplo, Bielinska, A., *et. al.*, *Science*, 250 (1990), 997-1000; y Wu, H., *et. al.*, *Gene*, 89, (1990), 203-209.

Además de tales usos como reguladores indirectos y directos de proteínas, los oligonucleótidos y sus análogos también han encontrado utilidad en pruebas de diagnóstico. Tales pruebas de diagnóstico pueden llevarse a cabo usando fluidos biológicos, tejidos, células intactas o componentes celulares aislados. Así como con la inhibición de la expresión genética, las aplicaciones diagnósticas utilizan la habilidad de los oligonucleótidos y sus análogos para hibridarse con una cadena complementaria de ácido nucleico.

Los oligonucleótidos y sus análogos son también ampliamente utilizados como reactivos de investigación. Son útiles para comprender la función de muchas otras moléculas biológicas, así como en la preparación de otras moléculas biológicas. Por ejemplo, el uso de oligonucleótidos y sus análogos como iniciadores en reacciones PCR le han dado auge a una industria comercial en expansión. La tecnología PCR se ha convertido en un punto de apoyo de los laboratorios comerciales y de investigación, y las aplicaciones de PCR se han multiplicado. Por ejemplo, la tecnología PCR ahora encuentra utilidad en los campos forenses, de la paleontología, de estudios evolutivos y consejería genética. La comercialización ha llevado al desarrollo de equipos que ayudan al personal, no entrenado en biología molecular, a aplicar PCR. Los oligonucleótidos y sus análogos, tanto los naturales como los sintéticos, son empleados como iniciadores en la tecnología PCR.

Los oligonucleótidos y sus análogos también son utilizados en otros procedimientos de laboratorio. Varios de estos usos están descritos en manuales de laboratorio comunes tales como *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (Clonación Molecular, Un Manual de Laboratorio), Second Ed., J. Sambrook, *et. al.*, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; y *Current Protocols In Molecular Biology*, (Protocolos actuales en Biología Molecular), F. M. Ausubel, *et. al.*, Eds., Current Publications, 1993. Tales usos incluyen sondeo de oligonucleótidos sintéticos, en el tamizaje de bibliotecas de expresión con anticuerpos y compuestos oligoméricos, secuenciación de ADN, amplificación *in vitro* de ADN por medio de la reacción en cadena de polimerasa y en mutagénesis directa *in situ* del ADN clonado.

Ver el libro 2 de *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, supra*. Ver también *DNA-protein interactions, (Interacciones ADN proteína)* y *The Polymerase Chain Reaction (La Reacción en Cadena de Polimerasa)* en el volumen 2 de *Current Protocols In Molecular Biology, supra*. Los oligonucleótidos y sus análogos también han sido desarrollados y utilizados en biología molecular en una variedad de procedimientos como sustancias de sondeo, iniciadores, conectores, adaptadores o fragmentos de genes.

El amplio uso de tales oligonucleótidos ha incrementado la demanda de procedimientos rápidos, baratos y eficientes para su modificación y síntesis. Los primeros enfoques en la síntesis de oligonucleótidos incluían la química del fosfodiéster y del fosfortriéster. Khorana *et. al.*, *J. Molec. Biol.* 72 (1972), 209; Reese, *Tetrahedron Lett.* 34 (1978), 3143-3179. Eventualmente estos enfoques dieron lugar a procedimientos modernos más eficientes, tales como el uso de la popular técnica de la fosforamidita, (ver, e.g., *Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach*, (Avances en la Síntesis de Oligonucleótidos por medio del enfoque de Fosforamidita), Beaucage, S. L.; Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 48 (1992) 2223-2311 y las referencias citadas en el mismo, donde un nucleósido u oligonucleótido que posee un grupo hidroxilo libre se hace reaccionar con un monómero protegido de cianoetil fosfo-

ramidita en presencia de un ácido débil, para formar una estructura enlazada al fosfito. La oxidación del enlace fosfito, seguida por hidrólisis del grupo cianoetilo produce el deseado enlace fosfodiéster o tiofosfato.

Las técnicas de fase sólida continúan jugando un papel importante en el enfoque sintético de oligonucleótidos. Típicamente, en la posición 3' la mayor parte del nucleósido es anclado a un soporte sólido el cual es funcionalizado con residuos hidroxilo o amino. Los nucleósidos adicionales son agregados subsecuentemente en una manera escalonada para formar los enlaces deseados entre el grupo funcional-3' del nucleósido entrante y el grupo hidroxilo-5' del nucleósido destinado para soporte. Implícito a este ensamblado escalonado está el uso de un grupo protector para suministrar el grupo hidroxilo 5' no reactivo del nucleósido entrante. A continuación del acoplamiento, el grupo hidroxilo-5' es removido a través de una selección juiciosa de un reactivo desprotector.

El ácido dicloroacético (DCA) es un reactivo usado comúnmente para desbloquear nucleótidos durante la síntesis de oligonucleótidos, (por ejemplo, ver US 5,969,099). Se conocen varios métodos para preparar ácido dicloroacético. DE 610317 revela un método para preparar ácido dicloroacético haciendo reaccionar pentacloroetano con ácido sulfúrico. DE 852997 revela un método para preparar ácido dicloroacético haciendo reaccionar ácido cloroacético con cloro. US 5,292,928 revela la preparación de ácido dicloroacético haciendo reaccionar dicloro acetil cloruro con agua. Korte & Fuchs (Chemische Berichte 1953, vol. 86, p. 114-116) revela la preparación de ácido dicloroacético usando hidrato de cloral como material inicial o base.

Debido a que la adición de nuevos nucleósidos involucra el uso repetido de ácido dicloroacético para desproteger el grupo hidroxilo-5', es importante que este reactivo esté tan libre de contaminantes como sea posible, pues los contaminantes pueden propagar impurezas y producir secuencias inadecuadas de los oligonucleótidos buscados. Por consiguiente se necesitan métodos para detectar tales impurezas en el ácido dicloroacético. La presente invención está dirigida a este, así como a otros importantes fines.

Sumario de la invención

Se ha descubierto que el hidrato de cloral es un contaminante común en el ácido dicloroacético preparado comercialmente. Se ha descubierto adicionalmente que el hidrato de cloral reacciona con el grupo hidroxilo-5' de los nucleósidos durante el curso de la síntesis de los oligonucleótidos para formar productos secundarios no deseados, los cuales son removidos, si del todo, solo con gran dificultad. También se ha descubierto que el hidrato de cloral en el ácido dicloroacético puede ser detectado y su concentración puede ser medida exactamente, comparando la integral del pico de resonancia magnética nuclear del protón CH del hidrato de cloral con una cantidad conocida de estándar interno.

Por consiguiente, es objetivo de la presente invención proveer procedimientos para preparar oligonucleótidos que estén libres de impureza causada por el hidrato de cloral presente en el ácido dicloroacético.

Otros objetivos importantes, se harán aparentes durante la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención provee un procedimiento de sintetizar oligonucleótidos, que comprende:

- (a) Calcular la concentración de hidrato de cloral en una muestra de ácido dicloroacético; y
- (b) Poner en contacto un oligonucleótido que porta por lo menos un grupo protector con dicho ácido dicloroacético.

En una primera realización, la presente investigación provee un procedimiento analítico que comprende determinar si un espectro de resonancia magnética nuclear tomado de una muestra de ácido dicloroacético incluye un pico de resonancia magnética nuclear asociado con un protón CH del hidrato de cloral. En ciertas realizaciones preferidas, el procedimiento comprende, más allá, comparar una integral de dicho pico de resonancia magnética nuclear asociado con dicho protón CH del hidrato de cloral con una integral de un pico de resonancia magnética nuclear asociado con, por lo menos, un protón de dicho ácido dicloroacético. En ciertas realizaciones preferidas, el procedimiento comprende, más allá, calcular una concentración de hidrato de cloral en dicho ácido dicloroacético basada sobre dicha comparación de integrales de picos de resonancia magnética nuclear. En ciertas realizaciones preferidas, la concentración calculada de hidrato de cloral es menor de 15 ppm. En ciertas realizaciones preferidas, la concentración calculada de hidrato de cloral es menor de 10 ppm. En ciertas realizaciones preferidas, la concentración calculada de hidrato de cloral es menor de 1 ppm.

El procedimiento de la invención puede comprender, además: agregar por lo menos un solvente orgánico a la muestra y comparar una integral de dicho pico de resonancia magnética nuclear asociado con un protón de hidrato de cloral con la integral del pico de resonancia magnética nuclear asociado con al menos un protón de por lo menos un solvente orgánico. En ciertas realizaciones preferidas, el solvente orgánico es tolueno. En ciertas realizaciones preferidas el procedimiento comprende posteriormente calcular una concentración de hidrato de cloral en dicho ácido dicloroacético, basado sobre dicha comparación de integrales de los picos de resonancia magnética nuclear. En ciertas realizaciones preferidas, la concentración calculada de hidrato de cloral es menor de 15 ppm. En ciertas realizaciones

preferidas, la concentración calculada de hidrato de cloral es menor de 10 ppm. En ciertas realizaciones preferidas, la concentración calculada de hidrato de cloral es menor de 1 ppm. En ciertas realizaciones preferidas el ácido dicloroacético es utilizado como agente desprotector en una síntesis de oligonucleótidos para preparar un oligonucleótido que tenga la fórmula:

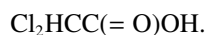


La presente invención proporciona un procedimiento que comprende determinar si un espectro de resonancia magnética nuclear, tomado de una muestra de ácido dicloroacético, incluye un pico de resonancia magnética nuclear asociado con un protón CH de hidrato de cloral, y además comprende poner en contacto un oligonucleótido, que porta por lo menos un grupo protector, con dicho ácido dicloroacético. En ciertas realizaciones, se busca contactar efectos de la remoción de por lo menos un grupo protector de dicho oligonucleótido. En ciertas realizaciones, dicho oligonucleótido, del cual dicho grupo protector ha sido removido, no incluye un grupo que tenga la fórmula 5'-O-CH(OH)(CCl₃). En ciertas realizaciones, dicho oligonucleótido, de donde dicho grupo protector ha sido removido, no incluye un grupo que tenga la fórmula 5'-O-CH(CCl₃)-O-.

Estos, así como otros objetos, son el resultado del descubrimiento de los inventores, que el hidrato de cloral es un contaminante común en ácido dicloroacético preparado comercialmente. Como es utilizado aquí, el término "hidrato de cloral" se pretende que signifique, un compuesto químico con la estructura:

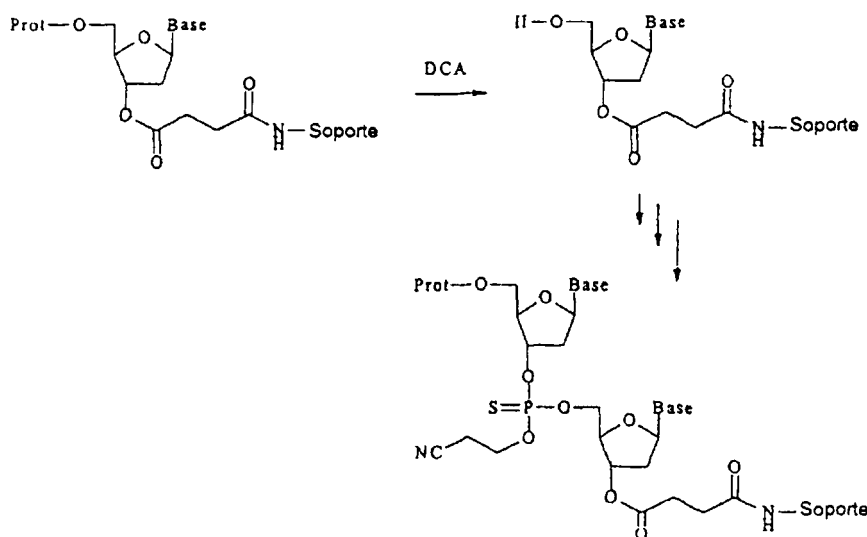


Como es utilizado aquí, el término "ácido dicloroacético" (DCA) se pretende que signifique, un compuesto químico con la estructura:



Es bien sabido que el ácido dicloroacético (DCA) es un reactivo comúnmente usado para desbloquear nucleótidos durante la síntesis de oligonucleótidos. Particularmente, la síntesis de oligonucleótidos involucra el uso repetido de ácido dicloroacético como un reactivo desprotector para desbloquear los grupos 5'-hidrox protectores (Prot) (Esquema 1):

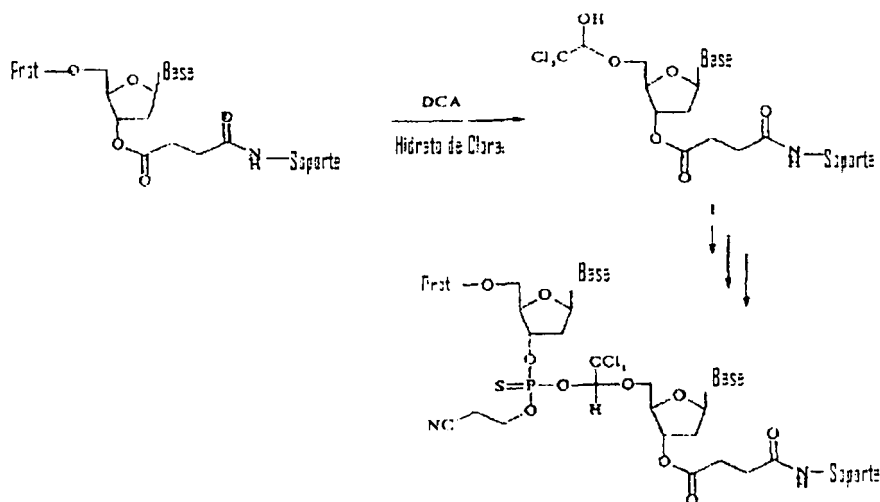
Esquema 1



Así, como es utilizado aquí, el término "grupo hidroxilo protector" (Prot) se pretende que signifique un grupo químico que es estable bajo ciertas condiciones, pero que puede ser removido bajo otras condiciones. En general los grupos protectores rinden grupos químicos funcionales inertes a condiciones específicas de reacción, y pueden ser añadidas a, o removidas de, tales grupos funcionales en una molécula sin dañar substancialmente el resto de la molécula. Los grupos hidroxilo protectores representativos son revelados por Beaucage, *et. al.*, *Tetrahedron* (1992), 48, 2223-2311, y también en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica), Capítulo 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991, cada uno de los cuales son incorporados por referencia en su totalidad. Los grupos protectores preferidos incluyen dimetoxitritil (DMT), monometoxitritil, 9-fenilxanteno-9-il (Pixil) y 9-(p-metoxifenil)xanteno-9-il (Mox).

Debido al uso repetitivo del DCA para la remoción de los grupos protectores del oligonucleótido, es crítico que el DCA esté libre de contaminantes que puedan propagar impurezas y producir secuencias impropias del oligonucleótido a alcanzar. Los inventores han descubierto que la impureza específica del hidrato de cloral, cuando está presente en el ácido dicloroacético, reacciona para formar productos secundarios, referidos aquí como aductos de tricloroetanol 1 y 2, mostrados a continuación (Esquema 2).

Esquema 2



Los aductos de tricloroetanol son extremadamente difíciles de remover una vez formados, y si no se controlan, se propagan a través de cada paso de la síntesis. Los inventores han descubierto que variados grados de hidrato de cloral pueden estar presentes en el ácido dicloroacético, dependiendo del proceso de manufactura usado en su preparación. Así, es deseable un procedimiento para detectar la presencia y la concentración de hidrato de cloral, previo a su utilización en la síntesis de oligonucleótidos. Entonces se puede establecer especificaciones para las concentraciones máximas de hidrato de cloral tolerables, en el proceso de manufactura de oligonucleótidos. En ciertas realizaciones la concentración de hidrato de cloral tolerada es menor de 15 ppm, preferentemente menor de 10 ppm, y más preferida aún, de menos de 1 ppm. Más preferible aún, es que la concentración de hidrato de cloral esté por debajo del límite de detección.

De acuerdo a esto, la presente invención está dirigida, en parte, a un procedimiento para analizar ácido dicloroacético que detecte la presencia de hidrato de cloral. El procedimiento comprende, preferentemente, tomar un espectro de resonancia magnética nuclear (RMN), de una muestra de ácido dicloroacético, previo a su utilización en un proceso de manufactura. Preferentemente, la muestra contiene una concentración predeterminada de un estándar interno. Como es utilizado aquí, el término "estándar interno" o "estándar" significa cualquier compuesto, preferentemente un solvente, conteniendo protones, cuyo pico de resonancia magnética nuclear pueda ser comparado a aquel del protón CH del hidrato de cloral, para determinar la concentración de hidrato de cloral presente. Es por lo tanto preferible que los protones del estándar interno resuenen en un sitio que es diferente, preferiblemente, arriba o abajo del campo del hidrato de cloral. Así, se podrá apreciar que en un aspecto, la presente invención contempla el usar la integral del pico asociado con el protón CH de ácido dicloroacético en sí mismo como estándar interno. Si el estándar interno es otro diferente al ácido dicloroacético, el estándar interno es seleccionado preferentemente de solventes líquidos apropiados. Tales solventes líquidos incluyen, aunque no están limitados a estos, solventes halogenados, solventes hidrocarbonados, solventes etéreos, solventes próticos o apróticos.

Los solventes halogenados apropiados incluyen, aunque no limitados a, bromodichlorometano, dibromoclorometano, bromoformo, cloroformo, bromoclorometano, dibromometano, cloruro de butilo, diclorometano, tricloroetileno, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1-dicloroetano, 2-cloropropano, 1,2,4-triclorobenceno, o-diclorobenceno, clorobenceno, fluorobenceno, diclorofluorometano, clorodifluorometano, y trifluorometano.

Solventes hidrocarbonados apropiados incluyen, aunque no limitados a, acetonitrilo, benceno, ciclohexano, pentano, hexano, tolueno, cicloheptano, metilciclohexano, heptano, etilbenceno, m-, o-, ó p-xileno, octano, indano y nonano.

Los solventes etéreos apropiados incluyen, aunque no limitados a, dimetoximetano, tetrahydrofurano, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, furano, dietiléter, etilenglicol, dimetil éter, etilenglicol dietil éter, dietilenglicol dimetil éter, dietilenglicol dietil éter, trietilenglicol diisopropil éter, anisol o t-butil metil éter. Los solventes polares próticos apropiados incluyen, aunque no limitados a, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluoroetanol, 2,2,2-trifluoroetanol, etilen glicol, 1-propanol,

ES 2 276 914 T3

2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, i-butil alcohol, t-butil alcohol, 2-etoxietanol, dietilen glicol, 1-, 2-, ó 3-pentanol, neopentil alcohol, t-pentil alcohol, ciclohexanol, benzil alcohol, fenol y glicerol.

Los solventes polares apróticos apropiados incluyen, aunque no limitados a, dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMAC), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro 2(1H)-pirimidinona (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), N-metilpirrolidinona (NMP), formamida, N-metilacetamida, N-metilformamida, acetonitrilo (ACN), dimetilsulfóxido, propionitrilo, etil formato, metil acetato, hexacloroacetona, acetona, etil metil cetona, etil acetato, isopropil acetato, t-butil acetato, sulfolano, N,N-dimetilpropionamida, nitrometano, nitrobenceno, hexametilfosforamida.

En realizaciones preferidas, el estándar interno será estable hacia el ácido. El estándar interno es también preferentemente un solvente relativamente no volátil, para así minimizar la posibilidad de cambio de concentración durante la preparación del estándar o en la obtención de la RMN. En otras realizaciones preferidas el estándar interno es un solvente aprótico. En otras realizaciones preferidas, el estándar interno tiene un espectro de RMN relativamente simple, preferiblemente, con menos de 4 señales. En realizaciones preferidas particularmente, el solvente es tolueno.

A manera de guía general, un volumen conocido ácido dicloroacético (DCA) puede ser disuelto en un volumen conocido de solvente deuterado de RMN. Si un compuesto adicional es utilizado como estándar interno, i.e., uno que es añadido al tubo de RMN con el propósito de comparar la integral del estándar con aquel del hidrato de cloral, puede ser agregado en una concentración de 40 ppm por ejemplo. La ^1H NMR (resonancia magnética nuclear del protón) puede entonces ser tomada usando cualquier espectrómetro de RMN capaz de proveer las condiciones apropiadas para obtener una señal de resonancia para cada componente. Una proporción de hidrato de cloral, en comparación con ácido dicloroacético, es obtenida preferiblemente comparando la integral (el área) del protón CH del hidrato de cloral, con aquella del estándar interno. Como será fácilmente entendido por un experto en la materia, la concentración de hidrato de cloral en el ácido dicloroacético puede ser calculada entonces usando la proporción obtenida por medio de la comparación de la integral, la concentración del ácido dicloroacético y la concentración de cualquier estándar interno utilizado adicionalmente. El ácido dicloroacético puede ser utilizado entonces.

Una vez es determinada la pureza del ácido dicloroacético por los procedimientos descritos aquí, este ácido puede ser utilizado subsecuentemente para virtualmente cualquier propósito. Particularmente, el ácido dicloroacético puede ser utilizado en una síntesis oligonucleótida para producir un oligonucleótido.

Como es utilizado aquí, “oligonucleótido” se refiere a compuestos que contienen una pluralidad de subunidades monoméricas que están unidas por enlaces conteniendo fósforo, tales como los enlaces fosfito, fosfodiéster, tiofosfato y/o enlaces ditiofosfato). Las subunidades monoméricas pueden contener ambas, ya sea porciones de procedencia natural (i.e. “natural”) o porciones sintéticas de procedencia no natural, por ejemplo, subunidades nucleosídicas conteniendo azúcar modificado y/o porciones de nucleobase. Así, el término oligonucleótido incluye oligonucleótidos, sus análogos y oligonucleótidos sintéticos. Tales oligonucleótidos análogos están típicamente diferenciados estructuralmente, de los oligonucleótidos naturales o de los oligonucleótidos sintéticos de tipo salvaje, pero pueden ser intercambiables funcionalmente con los anteriores. Así, los oligonucleótidos análogos incluyen todas aquellas estructuras, las cuales funcionan. efectivamente, para simular la estructura y/o función de una cadena deseada de ARN o ADN, por ejemplo, por hibridación a un sitio seleccionado. El término nucleósido sintético, para el propósito de la presente invención, se refiere a un nucleósido modificado. Las modificaciones representativas incluyen modificación de una porción de base heterocíclica de un nucleósido para dar una nucleobase de ocurrencia no natural, una porción de azúcar de un nucleósido, o ambas simultáneamente.

En ciertas realizaciones preferidas, el oligonucleótido preparado utilizando ácido dicloroacético como agente des-protector, que ha sido ensayado de acuerdo a los métodos de la presente invención tiene la fórmula:



en la que $\text{P} = \text{P}(\text{O})\text{S}^-\text{Na}^+$.

Como es utilizado aquí, “síntesis oligonucleótida” pretende tener el significado reconocido, donde un oligonucleótido es preparado utilizando métodos sintéticos bien conocidos por una persona experta en la materia. A manera de guía general, el 3' nucleósido principal puede ser anclado a un soporte sólido, el cual es funcionalizado con hidroxilo o residuos amino. Los nucleósidos adicionales pueden ser añadidos subsecuentemente en un forma escalonada para formar los enlaces deseados entre el grupo funcional -3' del nucleósido entrante y el grupo hidroxilo 5' del nucleósido destinado para soporte. En cualquier caso, la síntesis oligonucleótida seleccionada preferiblemente utiliza un grupo protector para formar ciertos grupos no reactivos, por ejemplo, el grupo hidroxilo-5' del nucleósido entrante. A continuación del acoplado, el grupo hidroxilo protector 5' puede ser removido entonces por adición de ácido dicloroacético, el cual ha sido analizado para contenido de hidrato de cloral.

La presente invención también está dirigida a producir oligonucleótidos que están libres de productos secundarios, causados por el uso de ácido dicloroacético contaminado con hidrato de cloral. Uno de estos productos secundarios es un aducto de tricloroetanol, el cual es el resultado de una reacción del hidrato de cloral con el grupo hidroxilo-5', (Esquema 2). Así, como es utilizado aquí, el término “aducto de tricloroetanol” busca significar un nucleósido donde el grupo hidroxilo-5' ha reaccionado con hidrato de cloral para producir una impureza que tiene la porción: HOCH

(CCl₃)-O-CH₂*, donde * indica el punto de acoplamiento a la posición 5' del nucleósido. Se podrá apreciar que en la reacción seguida con un nucleósido entrante para formar un oligonucleótido, el aducto de etanol tendrá la estructura P-O-CH(CCl₃)-O-CH₂* en un oligonucleótido, donde P es el átomo de fósforo del nucleósido entrante.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee un procedimiento para producir un oligonucleótido libre del aducto de tricloroetanol. Generalmente, el procedimiento comprende analizar el ácido dicloroacético para determinar la presencia de hidrato de cloral, previo a su utilización como agente desprotector. Si está presente el hidrato de cloral, la concentración puede ser determinada tomando una RMN y comparar la integral del pico de resonancia magnética nuclear del protón CH del hidrato de cloral, con la integral del pico de resonancia magnética nuclear de los protones de un estándar interno, para determinar la concentración del hidrato de cloral presente en el ácido dicloroacético y utilizar el ácido dicloroacético, si la concentración de hidrato de cloral está por debajo de una concentración de umbral aceptable. En ciertas realizaciones, la concentración aceptable de hidrato de cloral en el ácido dicloroacético es menor de 15 ppm, preferiblemente menor de 10 ppm, más aceptable aún si es de 5ppm, y mayor aún si es de 1 ppm. La concentración más aceptable de todas, es aquella donde el hidrato de cloral es menor a los niveles de detección.

Los oligonucleótidos descritos aquí pueden ser sintetizados por medio del uso de un soporte sólido. Los soportes sólidos son sustratos los cuáles son capaces de servir como fase sólida en los procedimientos de síntesis de fase sólida, tales como aquellas descritas en las patentes de Estados Unidos de América Nos. 4,415,732; 4,458,066; 4,500,707; 4,668,777; 4,973,679; y 5,132,418; y en las Patentes de Estados Unidos de América de Koster Nos. 4,725,677 y Re. 34,069. Los enlazantes son conocidos en la materia como moléculas cortas, que sirven para conectar un soporte sólido a grupos funcionales (e.g., grupos hidroxilo) de moléculas synthon iniciales en las técnicas de síntesis de fase sólida. Los enlazantes apropiados son revelados en, por ejemplo *Oligonucleotides And Analogues A Practica/Approach*, (*Oligonucleótidos y Análogos, Un enfoque práctico*). Ekstein, F. Ed., IRL Press, N.Y., 1991, Capítulo 1, páginas 1-23.

De acuerdo a la invención, los soportes sólidos incluyen aquellos generalmente conocidos en el campo de estudio, que son apropiados para el uso en metodologías de fase sólida, por ejemplo, vidrio de poro controlado (CPG), vidrio de poro oxalil-controlado (ver e.g., Alul et al., *Nucleic Acid Research, (Investigación de Ácidos Nucleicos)* (1991), 19, 1527), soporte TentaGel -un soporte derivado del aminopolietilenglicol (Ver e.g., Wright, et al., *Tetrahedron Lett*, (1993), 34, 3373) y Poros- un copolímero de poliestireno/divinilbenceno.

Siguiendo la reacción con un nucleósido entrante, el átomo de fósforo puede ser sulfurado. Los agentes sulfurizantes utilizados durante la oxidación para formar enlaces tiofosfato y ditiofosfato incluyen el reactivo de Beaucage (ver e.g. Iyer, R. P., et. al., *J. Chem. Soc.* (1990) 112, 1253-1254, and Iyer, R.P., et. al., *J. Org. Chem.* (1990) 55, 4693-4699); disulfuro de tetraetiltiurano (ver e.g., Vu, H, Hirschbein, B.L., *Tetrahedron Lett.* (1991) 32, 3005-3008); tetrasulfuro de dibenzoilo (ver e.g., Rao, M.V., et. al., *Tetrahedron Lett* (1992), 33, 4839-4842); di(fenilacetil)disulfuro (ver e.g., Kamer, P.C.J., *Tetrahedron Lett.*, (1989), 30, 6757-6760); Bis(O,O-diisopropoxi fosfotioil) disulfuro (ver Stec et. al., *Tetrahedron Lett.*, (1993), 34, 5317-5320); 3-etoxi-1,2,4-ditiazolina-5-ona (ver *Nucleic Acids Research, (Investigación de Ácidos Nucleicos)* (1996), 24, 1602-1607, y *Nucleic Acids Research, (Investigación de Ácidos Nucleicos)* (1996) 24, 3643-3644); Bis(p-clorobenzensulfonilo) disulfuro (ver *Nucleic Acids Research, (Investigación de Ácidos Nucleicos)* (1995) 23, 4029-4033); azufre, azufre en combinación con ligandos como triaril, trialkil, triaralkil, o trialkaril fosfinas.

Otros agentes oxidantes útiles usados para formar enlaces fosfodiéster o tiofosfato incluyen yodo/tetrahidrofurano/agua/piridina o peróxido de hidrógeno/agua o ter-butil hidroperóxido o cualquier perácido como el ácido m-cloroperbenzoico. En el caso de la sulfuración, la reacción se lleva a cabo bajo condiciones anhidras con la exclusión de aire, en particular del oxígeno, mientras que en el caso de oxidación la reacción puede ser desarrollada bajo condiciones acuosas.

Los oligonucleótidos o los oligonucleótidos análogos preparados usando ácido dicloroacético y ensayados de acuerdo a la presente invención pueden ser hibridizados hacia un punto específico y preferiblemente comprenden desde 5 hasta alrededor de 50 subunidades del monómero. Es preferible que tales compuestos comprendan desde alrededor de 10 hasta alrededor de 30 subunidades del monómero, siendo particularmente preferidas las que tienen de 15 o 25 subunidades del monómero. Cuando se usan como ladrillos de construcción para ensamblar compuestos oligoméricos más grandes, se prefieren compuestos oligoméricos más pequeños. Biblioteca de compuestos diméricos, triméricos, o de orden más elevado pueden ser preparados para su uso como synthons en los métodos de esta invención. El uso de pequeñas secuencias sintetizadas por medio de la química en fase de solución, en síntesis automatizada de oligonucleótidos más grandes resalta la eficiencia del acoplado y la pureza de los oligonucleótidos finales. Ver, para ejemplo: Miura, K, et al., *Chem. Pharm. Bull.* (1987), 35, 833-836; Kumar, G., and Poonian, M.S., *J. Org. Chem.* (1984) 49, 4905-4912; Bannwarth, W., *Helvetica Chimia Acta*, (1985) 68,1907-1913; Wolter, A., et. al., *nucleosides an nucleotides*, 1986, 5, 65-77.

Se debe reconocer reconocido que los oligonucleótidos preparados utilizando ácido dicloroacético ensayado de acuerdo con esta invención pueden ser usados como reactivos en diagnóstico, terapéutica, investigación y kits. Estos pueden ser usados en composiciones farmacéuticas al incluir un diluyente o vehículo apropiado, farmacéuticamente aceptable. La presente invención puede ser mejor entendida refiriéndose a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Detección de Hidrato de Cloral en Ácido Dicloroacético

Una muestra de ensayo de ácido dicloroacético (DCA, 0,15 mL) se disolvió en acetonitrilo deuterado (0,5 mL) conteniendo 40 ppm de tolueno. Se corrieron espectros ¹H RMN usando un espectrofotómetro Varian Unity 400 NMR bajo las siguientes condiciones: pulsaciones de 30 grados, ancho de barrida de 6997,9 Hz, 32k puntos complejos y un retraso de reciclado total de 45 segundos. Aproximadamente 1000 transitorios fueron corridos para cada muestra. Los datos fueron procesados con cero de relleno a 64k puntos complejos, con una línea de ancho exponencial de 0,3 Hz. Los dos primeros puntos fueron reproducidos a través de predicciones lineales hacia una línea base plana y más allá, aplanada después de FFT (transformada rápida de Fourier) en el plano de registro de la secuencia de los picos de resonancia magnética nuclear.

La concentración de hidrato de cloral fue medida comparando la integral del pico asociado con el protón CH en el hidrato de cloral, con el pico del grupo CH₃ de tolueno. El ácido dicloroacético fue usado entonces para preparar el 20 mer de acuerdo al procedimiento establecido en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2

Preparación de (d(TpCpCpGpTpCpApTpCpGpCpTpCpCpTpCpApGpGpGp)); donde P = P(O)S⁻Na⁺

Se empacó dentro de un vaso reactor de acero un soporte Primer HL 30, derivado de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-deoxiguanosina. Se agregó una solución de ácido dicloroacético en tolueno (10%, v/v), para desproteger el grupo hidroxil protegido y el producto fue lavado con acetonitrilo. Se agregó una solución de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-deoxyguanosina-3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita (0,2 M), se agregó también una solución de 1-H-tetrazol en acetonitrilo (0,45), y se dejó reaccionar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó además una solución de fenilacetil disulfuro en 3-picolin-acetonitrilo (0,2 M, 1:1, v/v) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 2 minutos. El producto fue lavado con acetonitrilo (1:4 v/v) y con N-metilimidazol-piridina-acetonitrilo (2:3:5, v/v/v). Después de 2 minutos la mezcla encapsulada fue removida lavando el producto con acetonitrilo.

Se agregó una solución de ácido dicloroacético en tolueno (3% v/v) para desproteger el grupo 5'hidroxil y el producto fue lavado con acetonitrilo. A continuación se agregaron una solución de 5'-O-DMT-N²-isobutiril-2'-deoxiguanosina-3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita (0,2 M) y una solución de 1-H-tetrazol en acetonitrilo (0,45 M) y se dejó reaccionar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó a continuación una solución de fenilacetil disulfuro en 3-picolin acetonitrilo (0,2 M, 1:1, v/v) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 2 minutos. El producto fue lavado con acetonitrilo seguido por una mezcla encapsulada (1:1, v/v) de anhídrido acético acetonitrilo (1:4,v/v) y N-metilimidazol-piridina-acetonitrilo (2:3:5, v/v/v). Después de 2 minutos la mezcla encapsulada fue removida lavando el producto con acetonitrilo.

El proceso de desproteger el grupo 5'hidroxil, agregando fosforamidita y un agente activante, sulfurizando y encapsulando, con la intervención de ciclos de lavado, fue repetida con 17 ciclos adicionales para preparar el 20 mer. El oligonucleótido destinado para soporte resultante fue tratado con hidróxido de amonio acuoso (30%) por 12 horas a 60°C y los productos fueron filtrados. El filtrado fue concentrado bajo presión reducida y una solución del residuo en agua fue purificada por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa. Las fracciones apropiadas fueron recolectadas, combinadas y concentradas *al vacío*. Una solución del residuo en agua fue tratada con solución acuosa de acetato de sodio (pH 3,5) por 45 minutos. El oligonucleótido del título 2'-deoxitiofosfato 20 mer fue recolectado después de la precipitación, por adición de etanol.

Como aquellos versados en la materia podrán apreciar, pueden ser hechos numerosos cambios y modificaciones a las realizaciones preferidas de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de síntesis de oligonucleótidos, que comprende:

- (a) calcular la concentración de hidrato de cloral en una muestra de ácido dicloroacético; y
- (b) poner en contacto un oligonucleótido que porte al menos un grupo protector, con dicho ácido dicloroacético, si la concentración calculada de hidrato de cloral es menor que la máxima concentración tolerable.

2. El procedimientos de la reivindicación 1, que comprende:

- (a) determinar si, el espectro de resonancia magnética nuclear tomado a partir de una muestra de ácido dicloroacético, incluye o no, un pico de resonancia magnética nuclear asociado con el protón CH del hidrato de cloral.
- (b) calcular la concentración de hidrato de cloral en dicho ácido dicloroacético; y
- (c) poner en contacto un oligonucleótido, que porte al menos un grupo protector, con dicho ácido dicloroacético.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha puesta en contacto lleva a cabo la remoción de por lo menos un grupo protector de dicho oligonucleótido.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho oligonucleótido, del cual dicho grupo protector ha sido removido, no incluye un grupo que tiene la fórmula $5'-O-CH(OH)(CCl_3)$.

5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho oligonucleótido, del cual dicho grupo protector ha sido removido, no incluye un grupo que tiene la fórmula $5'-O-CH(CCl_3)-O-$.

6. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho ácido dicloroacético es usado como agente desprotector en una síntesis de oligonucleótido.

7. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho grupo protector es un grupo protector hidroxilo.

8. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la concentración calculada de hidrato de cloral es menor de 15 ppm.

9. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la concentración calculada del hidrato de cloral es menor de 10 ppm.

10. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la concentración calculada del hidrato de cloral es menor a 1 ppm.

11. El procedimiento de la reivindicación 8, reivindicación 9 ó reivindicación 10, en el que dicho oligonucleótido tiene la fórmula:



en la que $P = P(O)S^- Na^+$.

12. El procedimiento de síntesis de oligonucleótidos de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, en el que los oligonucleótidos son sintetizados a través del uso de un soporte sólido.