

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 100.691**

**REQUERENTE: LA JOLLA PHARMACEUTICAL COMPANY**

**EPÍGRAFE: "INTERMEDIARIOS DE FOSFORO MODIFICADOS PARA FORNECER GRUPOS FUNCIONAIS NA EXTREMIDADE 5' DOS OLIGONUCLEOTIDOS"**

**INVENTORES:** David S. Jones, John P. Hachmann, Michael J. Conrad, Stephen Coutts, e Douglas Alan Livingston, todos cientistas norte americanos, residentes em 11265 Florindo Road, San Diego, California 92127; em 12275 Carmel Vista Road, #128, San Diego, California 92130; em 11336 Penanova Street, San Diego, California 92129; em 6151 Rancho Diegueno Road, Rancho Santa Fe, California 92067; e em Fiore Terrace #115, San Diego, California 92122, Estados Unidos da América.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

15 de Julho de 1991, nos Estados Unidos da América, sob o N.º. 731.055.



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                |                      |                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|---------------------------------------|
| Modalidade e n.º (11)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | T D            | Data do pedido: (22) | Classificação Internacional (51)      |
| Requerente (71):<br>LA JOLLA PHARMACEUTICAL COMPANY, norte americana (Estado de Delaware), industrial e comercial, com sede em 6455 Nancy Ridge Drive, Suite 300, San Diego, California 92121, Estados Unidos da América.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                |                      |                                       |
| Inventores (72): David S. Jones, John P. Hochmann, Michael J. Conrad, Stephen coutts, e Douglas Alan Livingston, todos cientistas norte americanos, residentes em 11265 Flo-rindo Road, San Diego, California 92127; em 12275 Carmel Vista Road, #128, San Diego, California 92130; em 11336 Penanova Street, San Diego, California 92129; em 6151 Rancho Diegueno Road, Rancho Santa Fe, California 92067; e em 5260 Fiore Terrace #115, San Diego, California 92122, Estados Unidos da América.                                                                                                                                                                                                                                                     |                |                      |                                       |
| Reivindicação de prioridade(s) (30)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                |                      | Figura (para interpretação do resumo) |
| Data do pedido                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | País de Origem | N.º de pedido        |                                       |
| 15.Julho.1991                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | E.U.A.         | 731.055              |                                       |
| Epígrafe: (54)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                |                      |                                       |
| "INTERMEDIARIOS DE FOSFORO MODIFICADOS PARA FORNECER GRUPOS FUNCIONAIS NA EXTREMIDADE 5' DOS OLIGONUCLEOTIDOS"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                |                      |                                       |
| Resumo: (máx. 150 palavras) (57)<br>Esta invenção refere-se a fosforamidites da fórmula: <div style="text-align: center;"> <math display="block">\begin{array}{c} \text{R-O-P-O-G-Z} \\   \\ \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{R}^1 \quad \text{R}^2 \end{array}</math> </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                |                      |                                       |
| em que R é um grupo protector de base-lábil, R <sup>1</sup> e R <sup>2</sup> são, individualmente, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono, ou arilo de 6 a 20 átomos de carbono, ou são unidos para formar, com o átomo de nitrogénio, uma estrutura cíclica de 4-7 átomos de carbono e de 0 a 1 átomo de calcogénio de número atómico 8 a 16, G é um grupo hidrocarbílico de 1 a 20 átomos de carbono, e Z é um grupo diol vicinal hidroxi-protégido ligado a G por um dos átomos de carbono dióis vicinais, ou um grupo disulfureto, e estando ligado a G por um dos átomos de enxofre do grupo disulfureto, com a condição de G ter, pelo menos, 4 átomos de carbono quando Z é o referido grupo disulfureto. |                |                      |                                       |



42/374



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA  
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18356 INPI  
TELEFAX: 87 53 08

FOLHA DO RESUMO (Continuação)

| Modalidade e n.º (11)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | T D | Data do pedido (22) | Classificação Internacional (51) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------|----------------------------------|
| <p>Resumo (continuação) (57)</p> <p>Estas fosforamidites são usadas na síntese oligonucleotídica automatizada convencional para introduzir um grupo aldeído funcional ou um grupo tiol na extremidade 5' do oligonucleótido, para assim fornecer um local reactivo no oligonucleótido, o qual pode ser usado para conjugar o oligonucleótido com moléculas que contêm um grupo amino livre, ou um centro electrofilico, reactivo com um grupo tiol.</p> |     |                     |                                  |

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



Titular: LA JOLLA PHARMACEUTICAL COMPANY

Epigrafe: "INTERMEDIARIOS DE FOSFORO MODIFICADOS PARA FORNECER  
GRUPOS FUNCIONAIS NA EXTREMIDADE 5' DOS  
OLIGONUCLEOTIDOS"

M E M O R I A   D E S C R I T I V A

Campo do invento

O presente invento encontra-se no campo da química de fosfatos orgânicos e síntese de oligonucleótidos de estado sólido. Mais particularmente, diz respeito a intermediários de fósforo reactivos, que podem ser ligados de forma estável à extremidade 5' de um oligonucleótido, e que têm uma metade activável que, quando activada, fornece um aldeído ou grupo sulfidrilo funcional que pode ser usado para conjugar o oligonucleótido com qualquer molécula que possua um grupo amina livre.

Antecedentes do invento

E necessário fornecer oligonucleótidos com um grupo funcional livre, de modo a acoplar o oligonucleótido a marcadores, ligandos, superfícies sólidas, polímeros e outras moléculas ou superfícies.

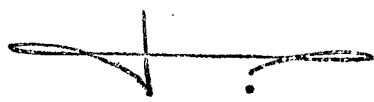
Uma técnica para fornecer oligonucleótidos com um grupo

funcional terminal envolve a síntese do oligonucleótido desejado através de procedimentos convencionais de síntese automatizada de estado-sólido, e a incorporação do grupo funcional na extremidade 5' do oligonucleótido via uma fosforamidite modificada.

Agrawal, S., et al., Nucl. Acids Res. (1986) 14:6227:6245, descrevem uma fosforamidite modificada que pode ser introduzida na extremidade 5' de um oligonucleótido que tenha um grupo activável, que possa ser activado por desprotecção, de modo a fornecer um grupo amina livre na extremidade terminal 5' do oligonucleótido. O "linker" (VIII na página 6236), O-(2-(9-fluorenilmetoxicarbonil) aminoetil)-O-(2-cianoetil)-N-N-diisopropil fosforamidite, é adicionado à extremidade do oligonucleótido desejado, num sintetizador automático de DNA, usando desoxinucleosido - 2 - cianoetil- N - N - diisopropil fosforamidites. O citado é desprotegido (o grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil é removido com amónia), de modo a fornecer um grupo amina livre.

Kremsky, J.N., et al., Nucl. Acids Res. (1987) 15:2891-2909, descrevem uma fosforamidite funcional (1 na página 2893) que é introduzida na extremidade 5' do oligonucleótido e depois modificada para fornecer um grupo 5' carboxi ou aldeído, que é usado para imobilizar o oligonucleótido.

Uma outra fosforamidite funcional, O-6-(4',4''-dimetoxitritenilmetiltio)hexil - O -(2-cianoetil)-N-N-diisopropil fosforamidite, está disponível comercialmente pela Clontech Laboratories. Esta molécula é incorporada em oligonucleótidos usando protocolos convencionais de fosforamidite. O grupo sulfidrílo protegido por dimetoxitritil pode ser desprotegido com



nitrato de prata de modo a conseguir um grupo sulfidriilo livre na extremidade 5' da cadeia do oligonucleótido.

Um principal objectivo do presente invento é fornecer um novo intermediário de fósforo modificado que possa ser empregue nos vários tipos de métodos de síntese de oligonucleótidos, e que possui grupos activáveis que podem ser convertidos em grupos aldeído ou sulfidriilo livres, uma vez que tenha sido adicionado à extremidade 5' de um oligonucleótido. O grupo aldeído/sulfidriilo livre é útil para acoplar ou conjugar o oligonucleótido a marcadores, ligandos, polímeros ou superfícies sólidas. Estes novos intermediários possuem as seguintes características: 1) o grupo activável é compatível com todas as etapas dos procedimentos convencionais de síntese de oligonucleótidos; 2) a activação é efectuada sob condições que não danificam o oligonucleótido; 3) a junção é efectuada sob condições que não danificam o oligonucleótido ou a metade à qual o oligonucleótido é acoplado.

#### Exposição do invento

Os novos compostos do invento contendo fósforo incluem intermediários que são úteis nos métodos H-fosfonato, fosfotriéster, fosforcloridite e fosforamidite de síntese de oligonucleótidos, bem como intermediários que resultam em modificações 5' que envolvem análogos de fosfodiéster como metilfosfonatos, metilfosfatos, fosforotioatos e fosforamidatos.

Estes compostos podem ser definidos genericamente pela seguinte fórmula:



em que X é:

(i) oxigénio quando  $X^1$  é  $O^-$  e  $X^2$  é hidrogénio ou  $RO^-$  quando R é um grupo protector;

(ii) não está presente quando

(a)  $X^1$  é cloro e  $X^2$  é metilo ou  $RO^-$ , ou quando

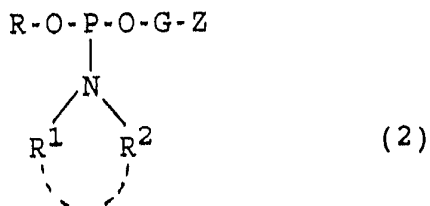
(b)  $X^2$  é  $RO^-$  e  $X^1$  é  $NR^1R^2$  em que  $R^1$  e  $R^2$  são individualmente alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono, ou arilo de 6 a 20 átomos de carbono, ou estão juntos de modo a formar com o átomo de nitrogénio uma estrutura cíclica de 4 a 7 átomos de carbono, e 0 a 1 átomos de calcogénio anulares de número atómico 8 a 16 inclusive (O ou S);

G é um grupo hidrocarbilenos com 1 a 20 átomos de carbono; e Z é um grupo diol vicinal hidroxiprottegido ligado a G por um dos átomos de carbono vicinais ou um grupo disulfureto ligado a G por um dos átomos de enxofre do grupo disulfureto, com a condição de que G tem pelo menos 4 átomos de carbono quando Z é o dito grupo disulfureto.

Os compostos acima em que X é oxigénio,  $X^1$  é  $O^-$ , e  $X^2$  é hidrogénio, são H-fosfonatos e são empregues no método do H-fosfonato de síntese de oligonucleótidos (Sinha e Cook, NAR (1988) 16:2659-2669). Os H-fosfonatos podem ser convertidos a diésteres de fosfito, fosforotioatos ou fosforoamidatos, uma vez incorporados na extremidade 5' de um oligonucleótido (Miller et al., NAR (1983) 11:5189-5204, Eckstein, Ann Rev Biochem (1985) 54:367-402, e Froehler e Matteucci, NAR (1988) 16:4831-4839). Correspondentemente, os compostos acima em que X é oxigénio,  $X^1$  é  $O^-$  e  $X^2$  é  $RO^-$  são usados na abordagem fosfotriéster para sintetizar oligonucleótidos (Garegg, et al., Chemica Scripta

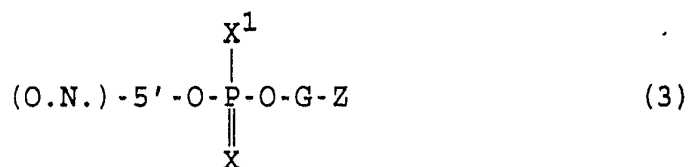
(1985) 26:5). Quando X não está presente e  $X^1$  é cloro e  $X^2$  é  $RO^-$ , o composto resultante é fosfocloridite e é usado na técnica de fosfocloridite para a síntese de oligonucleótidos (Wada et al., J Org. Chem. (1991) 56:1243-1250). São preferidas as fosforamidites com a fórmula acima.

As fosforamidites preferidas do invento podem ser representadas pela fórmula:



em que R é um grupo protector de base lábil,  $R^1$  e  $R^2$  são individualmente alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono, ou arilo de 6 a 20 átomos de carbono, ou estão juntos de modo a formar com o átomo de nitrogénio uma estrutura cíclica de 4 a 7 átomos de carbono e 0 a 1 átomos de calcogénio anulares de números atómico 8 a 16 inclusivé (O ou S), G é um grupo hidrocarbilenos com 1 a 20 átomos de carbono; e Z é um grupo diol vicinal hidroxi-protégido ligado a G por dois átomos de carbono vicinais ou um grupo disulfureto ligado a G por um dos átomos de enxofre do grupo disulfureto, com a condição de que G tem pelo menos 4 átomos de carbono quando Z é o dito grupo disulfureto.

Um outro aspecto do invento é um oligonucleótido modificado 5' de fórmula:



em que (O.N.) representa uma cadeia de oligonucleótido,



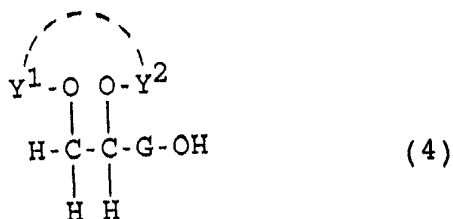
X é um átomo de calcogénio de número atómico de 8 a 16 inclusive (O ou S),  $X^1$  é  $O^-$ , metilo,  $-OCH_3$  ou  $NR^1R^2$  em que  $R^1$  e  $R^2$  são individualmente hidrogénio ou alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, G é um grupo hidrocarbilenos com 1 a 20 átomos de carbono; e Z é um grupo diol vicinal hidroxi-protetido ligado a G por um dos átomos de carbono vicinais ou um grupo dissulfureto ligado a G por um dos átomos de enxofre do grupo dissulfureto, com a condição de que G tem pelo menos 4 átomos de carbono quando Z é o dito grupo dissulfureto.

Um outro aspecto do invento é o oligonucleótido modificado acima descrito, em que os grupos hidroxi-protectores foram removidos para deixar livres grupos hidroxilo.

Ainda outro aspecto do invento é o oligonucleótido modificado 5' acima descrito no qual Z representa um grupo diol vicinal desprotegido que foi oxidado para formar um grupo aldeído terminal no oligonucleótido.

Um outro aspecto do invento é um conjugado do oligonucleótido acima citado, tendo um grupo aldeído terminal e uma molécula transportadora contendo um grupo amina livre, em que o conjugado é formado pela reacção entre o grupo aldeído e o grupo amina livre.

Ainda outro aspecto do invento é um triol parcialmente protegido com a fórmula:



em que  $Y^1$  e  $Y^2$  são individualmente grupos protectores hidroxilo ou estão juntos por uma ponte de um único átomo de

carbono para formar um grupo protector em anel de cinco membros, e G é descrito como acima. Preferencialmente G é um alquilenos com 4 a 20 átomos de carbono.

Um outro aspecto do invento é um disulfureto com a fórmula:



em que  $Y^3$  é um grupo protector hidroxilo e G é como descrito acima. Os dois grupos divalentes representados por G podem ser os mesmos ou diferentes. De preferência são os mesmos, formando um disulfureto simétrico. De preferência,  $Y^3$  é uma base estável. De preferência G é um alquilenos com 4 a 20 átomos de carbono.

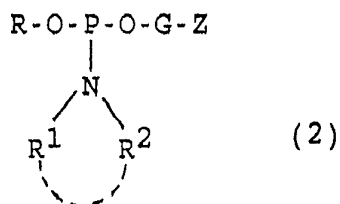
#### Breve Descrição dos Esquemas

As Figuras 1-3 são diagramas esquemáticos dos esquemas de síntese descritos nos Exemplos 1-3.

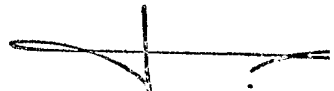
As Figuras 4 e 5 são autorradiogramas dos geles descritos nos Exemplos 5 e 6.

#### Modos de realização do invento

Como indicado acima, as fosforamidites do invento podem ser representadas pela fórmula:



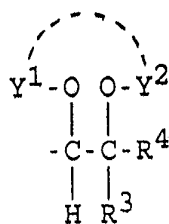
em que R é um grupo protector metilo ou de base lábil,  $R^1$  e  $R^2$  são individualmente alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono, ou arilo de 6 a 20 átomos de carbono, ou estão juntos de modo a formar com o átomo



de nitrogénio uma estrutura cíclica de 4 a 7 átomos de carbono e 0 a 1 átomos de calcogénio anulares de número atómico 8 a 16 inclusivé (O ou S), G é um grupo hidrocarbilenos com 1 a 20 átomos de carbono e Z é um grupo diol vicinal hidroxiprottegido ligado covalentemente a G por um dos átomos de carbono vicinais ou um grupo disulfureto, ligado a G covalentemente por um dos átomos de enxofre do grupo disulfureto, com a condição de que G tem pelo menos 4 átomos de carbono quando Z é o dito grupo disulfureto.

De preferência, R é  $\beta$ -cianoetil,  $R^1$  e  $R^2$  são ambos isopropil, e G é  $-(CH_2)_n-$  em que n é um inteiro de 4 a 6, inclusivé. Exemplos de outros grupos protectores representados por R são  $\beta$ -nitroetil, 2,2,2-tricloroetil, metil, 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetil, 2,2,2-tribromoetil, benzil, *o*-clorofenil, *p*-nitrofeniletil, 2-metilsulfoniletil, e 1,1-dimetil-2-cianoetil. Exemplos de outros grupos em que  $R^1$  e  $R^2$  podem representar, são outros grupos alquilo tal como butil, hexil, nonil, dodecil, e hexadecil, grupos cicloalquilo como ciclopropil, ciclobutil, ciclohexil e ciclooctil, grupos arilo como fenilo, tolil, benzil, xilil e naftil, e, quando juntos, grupos heterocíclicos tal como morfolino, piperidinil e tiomorfolino. Exemplos de outros radicais hidrocarbilenos que G pode representar são alquilenos ramificados, e grupos contendo cicloalquilenos (por exemplo, ciclohexileno) ou fenileno. De notar que G funciona primeiro como uma metade espaçadora inerte e depois pode ter substituintes e/ou heteroátomos (por exemplo, O, S, N) na sua estrutura, que não afectam a sua capacidade para agir como um espaçador inerte.

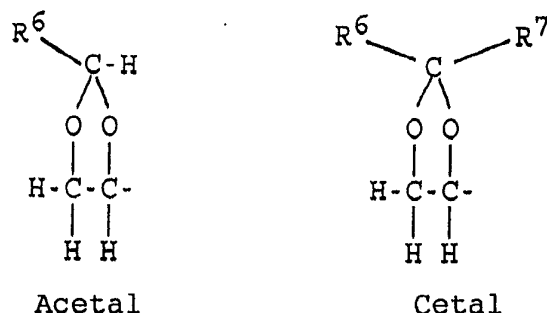
Grupos diol vicinais hidroxiprottegidos preferidos representados por Z, são os da seguinte fórmula:



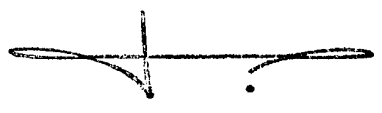
em que  $\text{R}^3$  e  $\text{R}^4$  são individualmente hidrogénio, alquilo de 1 a 20 átomos de carbono ou arilenos monocíclicos de 6 a 20 átomos de carbono, e  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  são individualmente grupos hidroxiprotetidos ou podem ser juntos (designados pela linha a tracejado) por uma ponte de um único átomo (C, S ou Si) para formar um grupo protector em anel de cinco membros.  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  são de uma natureza tal que são estáveis durante a adição da molécula à extremidade 5' da cadeia de um oligonucleótido durante a síntese química (por exemplo, síntese convencional automatizada de fosforamidite) e pode ser depois removido sem danificar a cadeia de oligonucleótido, além disso, como descrito a seguir, a estrutura do diol vicinal do grupo desprotegido permite que este seja "activado" por oxidação, convertendo-o de diol a um grupo funcional aldeído.  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  podem ser os mesmos ou diferentes e podem ser qualquer dos grupos hidroxiprotectores individuais que são compatíveis com a química convencional automatizada de estado sólido de oligonucleótidos, usando a química da fosforamidite. Exemplos de tais grupos bloqueadores são dimetoxitritil (DMT), tritil, pixil, benzoil, acetil, isobutiril, p-bromobenzoil, t-butildimetilsilil e pivaloil. Os grupos protectores podem ser removidos com os mesmos ou diferentes tratamentos. Tais grupos diol vicinais nos quais  $\text{R}^3$  e  $\text{R}^4$  são hidrogénio e  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  são benzoil ou DMT são particularmente preferidos.

Como indicado,  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  podem estar ligados por uma ponte de um átomo, formando assim um anel com cinco membros.

Átomos apropriados para a formação da ponte incluem sílica, enxofre e carbono. É preferível que uma ponte de um átomo seja uma ponte de carbono. Assim, o grupo diol é preferido para ser protegido como um acetal ou cetal, i.e.,



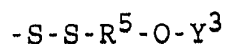
É importante que o átomo formador da ponte e os seus substituintes sejam estáveis para a subsequente reacção na sequência, usada para adicionar o "linker" ao oligonucleótido. O grupo protector diol tem também de ser capaz de ser removido sob condições brandas, que não degradam substancialmente o oligonucleótido. Por exemplo, condições muito acidicas conduzirão à depurinação do oligonucleótido. Grupos apropriados  $R^6$  e  $R^7$  incluem grupos arilo e arilo substituídos de 6 a 30 átomos de carbono, grupos alquilo  $C_1-C_{20}$ , e grupos alquilo aromáticos substituídos com menos de 30 átomos de carbono. Os preferidos são o fenil e fenil substituído com alquilo de  $C_1-C_8$ , alcoxi  $C_1-C_8$ ; 1 a 4 átomos de flúor, cloro, bromo, nitro ou fenil. De preferência são estruturas acetálicas em que  $R^6$  é fenil, p-butilfenil, p-metoxifenil, p-terbutilfenil e bifenil. Os especialistas no ramo saberão que a estabilidade do grupo protector pode ser ajustada para um uso particular através de uma escolha adequada do(s) substituinte(s).



Os acetais e cetais acima descritos são facilmente preparados directamente a partir dos correspondentes trióis em uma etapa. É um importante e inesperado aspecto desta configuração do presente invento que o diol vicinal é selectivamente protegido na presença de outro álcool livre na molécula. Assim, o triol em que  $Y^1$  e  $Y^2$  são H é simplesmente posto em contacto com o aldeído de forma a obter um acetal ou uma cetona para conseguir o cetol na presença de um ácido catalítico. É preferível que o contacto aconteça sob condições em que a água formada durante a reacção é removida durante a reacção, quer pela aplicação de vácuo ou por solventes azeotrópicos. Alternativamente, acetais ou cetais de alcoóis de baixo ponto de ebulição podem ser igualmente utilizados em lugar do aldeído ou cetona numa reacção de troca de acetal.

As fosforamidites dos acetais e cetais acima descritos são preparadas pelos métodos convencionais aqui descritos, e são acopladas ao oligonucleótido durante a síntese, como também é aqui descrito. A seguir à síntese e purificação de oligonucleótidos livres e acoplados, a hidrólise ácida fraca do grupo protector origina o diol que é o substrato para a reacção de oxidação que produz o aldeído usado para a reacção de conjugação. Condições típicas de hidrólise fraca são ácido acético 80%/água a 25°C durante 30 minutos, semelhante às condições usadas para remover o grupo dimetoxitritil na síntese convencional de oligonucleótidos.

Os grupos disulfureto preferidos representados têm a fórmula:





em que  $R^5$  é um grupo alquilenos com 1 a 20 átomos de carbono ou um grupo arileno monocíclico com 6 a 20 átomos de carbono, e  $Y^3$  é um grupo hidroxi-protector (como descrito acima).

De preferência,  $R^5$  é uma alquilenos de 4 a 6 átomos de carbono,  $-OY^3$  está ligado ao carbono w do grupo alquilenos e  $Y^3$  é tritil. Como descrito a seguir, a estrutura disulfureto do grupo permite que este seja "activado" por redução para quebrar a ponte disulfureto e produzir um grupo sulfidrílo livre.

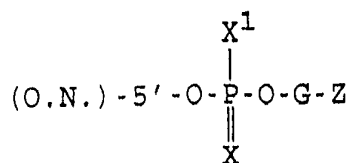
As fosforamidites em que Z representa um diol vicinal podem ser preparadas a partir de um álcool de fórmula  $HC=CH-G-OH$ . O grupo hidroxilo do álcool é protegido e a dupla ligação é oxidada para formar o grupo diol. Os hidroxilos do diol são depois protegidos com um grupo protector removível ortogonalmente ( $Y^2$  e  $Y^3$ ), i.e., o grupo protector no hidroxilo original pode ser removido sem remover os grupos protectores no diol vicinal. O grupo protector no hidroxilo original é depois removido e o resultante hidroxilo desprotegido reage com um agente fosforilador apropriado.

As fosforamidites em que Z representa um disulfureto podem ser preparadas a partir de disulfuretos simétricos ou assimétricos. O esquema geral da reacção utilizando disulfuretos simétricos está ilustrado na Figura 3 e exemplificado no Exemplo 3, a seguir. Disulfuretos assimétricos podem ser preparados como descrito por Mannervik, B., e Larson, K., Meth. in Enzym. (1981) 77:420-424, ou Mukuiyama, T., e Takahashi, K., Tet. Lett. (1968) 5907-5908. A título de exemplo, um disulfureto simétrico ( $HO-G-SS-G-OH$ ) é oxidado com peróxido de hidrogénio e ácido fórmico para fornecer o correspondente tiosulfinato. O tratamento do

tiosulfinato com mercaptano (por exemplo, HS-G'-OY<sup>3</sup>, em que Y<sup>3</sup> é como descrito acima e G' é um G diferente do que no disulfureto simétrico inicial), a um pH maior do que 3, consegue-se um dissulfureto assimétrico (HO-G-SS-G'-OY<sup>3</sup>). Este disulfureto pode reagir com um agente fosforilador de modo a obter um fosforamidato.

As fosforamidites do invento podem ser adicionadas à extremidade 5' de uma cadeia de oligonucleótido usando o método convencional automatizado da fosforamidite usado para preparar oligonucleótidos. Ver Matteucci, M.D., e Caruthers, M.H., Tet Lett (1980) 521:719, e a patente norte americana com o No 4.500.707. A própria cadeia de oligonucleótido pode ser produzida pelo mesmo método. O comprimento e sequência do oligonucleótido, ao qual a fosforamidite do invento é adicionada, dependerá da utilização do resultante oligonucleótido 5' funcional. por exemplo, se o oligonucleótido se destina a ser utilizado para os propósitos descritos na publicação EPA No 0438259 (i.e., tratamento de lúpus eritematoso sistêmico (LES)), então o oligonucleotido terá a capacidade de ligar anticorpos LES. Se o oligonucleótido se destina a ser usado como sonda marcada, então o seu comprimento e sequência serão tais que permitam a sua hibridização com a sequência de nucleótidos de interesse.

Como indicado acima, o resultante oligonucleótido modificado pode ser representado pela seguinte fórmula:



em que (O.N.) representa uma cadeia oligonucleotídica e





X,  $X^1$ , G e Z são definidos previamente. A designação 5' indica que o grupo modificado está ligado à extremidade 5' da cadeia oligonucleotídica. A cadeia terá tipicamente um comprimento de 10 a 200 nucleótidos, mais usualmente um comprimento de 20 a 60 nucleótidos.

Após a adição da fosforamidite à extremidade 5' de uma cadeia oligonucleotídica, os grupos protectores ( $Y^1$ ,  $Y^2$ ,  $Y^3$ ) podem ser removidos através de tratamentos apropriados (por exemplo, tratamento básico ou ácido) para conseguir grupos hidroxil livres. No caso de um diol vicinal, o grupo diol é oxidado com, por exemplo, periodato, para formar um grupo aldeído terminal. No caso de um grupo disulfureto, o disulfureto é reduzido com um agente redutor apropriado, por exemplo, mercaptano tal como o ditiotreitól ou 2-mercaptoetanol ou hidreto de boro, para quebrar as pontes disulfureto para formar um grupo sulfidrilo terminal.

O oligonucleótido 5' modificado resultante pode ser acoplado por via do grupo aldeído a marcadores, transportadores, ou outras moléculas possuindo grupos amina livres ou por via do grupo sulfidrilo a um centro electrofilico tal como maleimida ou grupos  $\alpha$ -haloacetil ou outros aceitadores de Michael apropriados, tal como acrilatos ou acrilamidas. Exemplos de tais transportadores são polímeros de aminoácidos tal como copolímeros de D-lisina e D-ácido glutâmico, ou imunoglobulina, ou outros polímeros que foram inerentemente derivatizados para incluir grupos como os descritos acima.

## Exemplos

Os seguintes exemplos destinam-se a ilustrar o invento um pouco melhor. Estes não pretendem limitar o invento em nenhum sentido. Nos exemplo, Et=etil, Ac=acetil e THF=tetrahidrofurano.

### Exemplo 1

Preparação de O-(5,6-(bis-O-benzoiloxi)-hexil)-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidite

A Figura descreve esquematicamente o esquema do invento utilizado para produzir esta fosforamidite. Os detalhes deste esquema são descritos a seguir.

O-(tert-butildimetilsilil)-5-hexenol, 5. A uma solução de 12,47 ml (10,4 g, 104 mmol), de 5-hexeno-1-ol em 104 ml de DMF, foram adicionados 15,66 g (230 mmol) de imidazole e 20,0 g (130 mmol) de cloreto de tert-butildimetil-silil (TBDMSCl). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 4 horas e dividida entre 200 ml de EtOAc e 100 ml de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. A camada de EtOAc foi lavada com 100 ml de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, 100 ml de solução saturada de NaCl, seca (MgSO<sub>4</sub>), filtrada e concentrada para um volume de aproximadamente 100 ml. A destilação em vácuo forneceu 70,07 g de 5: pb 130-143°C @ 100 mmHg; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 0,11 (s, 6H), 0,95 (s, 9H), 1,48 (m, 2H), 1,57 (m, 2H), 2,11 (dt, 2H), 3,66 (t, 2H), 5,03 (m, 2H), 5,86 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) -5,25; 18,40; 25,21; 26,01; 32,35; 33,60; 63,09; 114,40; 138,92.

1-O-(tert-butildimetilsilil)-1,5,6-hexaxotriol, 6. A uma solução de 9,86 g (46,0 mmol) de 5 em 92 ml de acetona foi



adicionada uma solução de 6,46 g (55,2 mmol) de óxido de N-metilmorfolina (NMMO) em 23 ml de H<sub>2</sub>O. A mistura foram adicionados 443 µl de uma solução 2,5% de OsO<sub>4</sub> em álcool tert-butil (360 mg de solução, 9,0 mg de OsO<sub>4</sub>, 35 µmol) e 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. A mistura foi agitada durante 16 horas e foi adicionada uma solução de 474 mg de ditionito de sódio em 14 ml de H<sub>2</sub>O. Após outra 0,5 hora a mistura foi filtrada através de celite. O filtrado foi seco com MgSO<sub>4</sub> e filtrado através de 1'' de sílica gel num funil de Buchner de 150 ml, usando porções de 250 ml de EtOAc para eluir. As frações contendo produto foram concentradas para fornecer 11,0 g de 6 como um óleo viscoso: TLC R<sub>f</sub> 0,2 (1:1 hexano/EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 0,05 (s, 6H), 0,89 (s, 9H), 1,25 (m, 4H), 1,55 (m, 2H), 3,41 (dd, 2H), 3,62 (t, 2H), 3,71 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> - 5,23; 18,42; 21,91; 26,02; 32,68; 32,81; 63,16; 66,74; 72,24.

5,6-(bis-O-benzoil)-1-O-(tert-butildimetilsilil)-1,5,6-hexanotriol, 7. A uma solução de 5,29 g (21,3 mmol) de 6, em 106 ml de piridina, foram adicionados 6,18 ml (7,48 g, 53,2 mmol) de cloreto de benzoil. A mistura foi agitada durante 18 horas e concentrada num evaporador rotativo. A mistura foi dividida entre 100 ml de HCl 1N gelado e 100 ml de EtOAc. O pH da camada aquosa foi verificado para garantir que era ácido. A camada de EtOAc foi lavada sucessivamente com 100 ml de H<sub>2</sub>O e 100 ml de NaCl saturado, seca (MgSO<sub>4</sub>), filtrada e concentrada, de modo a fornecer 10,33 g de 7 como um óleo viscoso amarelo; TLC R<sub>f</sub> 0,45 (1:4 EtOAc/hexanos); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 0,05 (s, 6H), 0,88 (s, 9H), 1,59 (m, 4H), 1,85 (m, 2H), 3,14 (t, 2H), 4,49 (dd, 1H), 4,59 (dd, 1H), 5,54 (m, 1H), 7,45 (m, 4H), 7,58 (m, 2H), 8,05 (m, 4H).



5,6-bis-O-benzoil)-1,5,6-hexanotriol, 8. A uma solução de 2,62 g (5,36 mmol) de 7 em 10,9 ml de THF foram adicionados 10,7 ml (10,7 mmol) de uma solução 1N de fluoreto de tetrabutílamônio (CTBAF) em THF. A mistura ficou em agitação durante 16 horas. A mistura foi dividida entre 25 ml de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e 3 x 25 ml de EtOAc. Os extratos combinados de EtOAc foram lavados com solução saturada de NaCl, secos (MgSO<sub>4</sub>), filtrados e concentrados até se obter um óleo viscoso que foi purificado por cromatografia em sílica gel (1:1 hexano/EtOAc), para fornecer 823 mg de 8 como um óleo viscoso; R<sub>f</sub> 0,14 (1:1 hexano/EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1,58 (m, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 3,68 (t, 2H), 4,52 (dd, 1H), 4,62 (dd, 1H), 5,56 (m, 1H), 7,46 (m, 4H), 7,58 (m, 2H), 8,05 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 22,08; 31,20; 31,30; 32,88; 62,92; 66,17; 72,63; 128,93; 130,19; 130,57; 133,62; 166,72; 166,86.

O-(5-6-(bis-O-benzoiloxi)-hexil)-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidite, 9. A uma solução de 1,02 g (2,98 mmol) de 8 e 255 mg (1,49 mmol) de diisopropilamônio tetrazólio (DIPAT, preparado pela mistura de soluções de acetonitrilo de diisopropilamina e tetrazólio, a uma razão molar de 1:1 e concentrado para um sólido branco), em 14,9 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, foi adicionada numa solução de 989 mg (3,28 mmol) de O-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidite em 2,0 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A mistura foi agitada durante 4 horas e dividida entre 25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 25 ml de uma solução de NaHCO<sub>3</sub> saturado fresco. A camada de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi lavada com solução de NaCl saturada, seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrada e concentrada. Purificação por filtração numa cavilha 2'' de alumina básica numa coluna de 25 mm, eluída com 9:1



EtOAc/Et<sub>3</sub>N fornecendo 1,5 g de 9 como um óleo viscoso: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1,19 (m, 12H), 1,62 (m, 2H), 1,73 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 2,62 (dd, 2H), 3,53-3,92 (m, 6H), 4,53 (dd, 1H), 4,62 (dd, 1H), 5,58 (m, 1H), 7,48 (m, 4H), 7,6(m, 2H), 8,09 (m, 4H); <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub> com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 15% normalizado internamente) 148,2; HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>), calculado para C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>P<sub>1</sub> 543,2624, encontrado 543,2619.

### Exemplo 2

#### Preparação de 6-O-(4',4''-dimetoxitritilhexil -O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidite

A Figura 2 descreve esquematicamente o esquema de reacção para produzir esta fosforamidite. Os detalhes do esquema estão descritos a seguir.

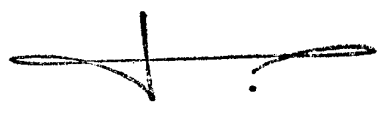
6 -O-(4',4'' -dimetoxitritenilmetil) -1-O-(tert-butildimetilsilil)-1,5,6-hexanotriol, 10. A uma solução de 1,11 g (4,47 mmol) de 6 e 891 µl (683 mg, 6,30 mmol) de Et<sub>3</sub>N em 22 ml de piridina foram adicionados 1,81 g (5,33 mmol) de cloreto de 4,4'-dimetoxitritenilmetil. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas, concentrada e purificada por cromatografia em sílica gel (29:70:1 EtOAc/hexano/Et<sub>3</sub>N) para fornecer 2,06 g de 10 como um óleo viscoso; R<sub>f</sub> da TLC 0,35 (39:60:1 EtOAc/hexano/Et<sub>3</sub>N).

5-O-benzoil-6-O-(4',4''-dimetoxitritenilmetil)-1-O-(tert-butildimetilsilil)-1,5,6-hexanotriol, 11. A uma solução de 2,06 g (3,8 mmol) de 10 em 19 ml de piridina foram adicionados 532 ml (644 mg, 4,58 mmol) de cloreto de benzoil, e a mistura foi agitada durante 20 horas e concentrada num evaporador rotativo para remover a maior parte de piridina, mantendo a temperatura do

banho abaixo dos 30 °C. A mistura foi dividida entre 50 ml de EtOAc e 50 ml de uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. A camada de EtOAc foi lavada com 50 ml de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, 25 ml de solução saturada de NaCl, seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrada e concentrada. Purificação por cromatografia em sílica gel (10:89:1 EtOAc/hexano/Et<sub>3</sub>N) forneceu 1,66 g de 11 como um óleo viscoso: R<sub>f</sub> de TLC 0,27 (1:9 EtOAc/hexano); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 0,5 (s, 6H), 0,87 (s, 9H), 1,40 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 3,28 (dd, 2H), 3,60 (t, 2H), 3,80 (s, 6H), 5,38 (m, 1H), 6,79 (m, 4H), 7,17-7,65 (m, 12H), 8,11 (d, 2H).

5-O-benzoil-6-O-(4',4''-dimetoxotrifetilmetil)-1,5,6-hexanotriol, 12. A uma solução de 1,66 g (2,56 mmol) de 11, em 5,2 ml de THF numa atmosfera de N<sub>2</sub>, foram adicionados 5,12 ml (5,12 mmol) de uma solução 1M de fluoreto de tetrabutilamônio em THF. A mistura foi agitada durante 3 horas à temperatura ambiente e concentrada num evaporador rotativo. Purificação por cromatografia em sílica gel (1:1 EtOAc/hexano) forneceu 1,18 g de 12 como óleo viscoso. Melhor purificação foi possível através de HPLC preparativa (12 ml/min, 9:1 MeOH/H<sub>2</sub>O, 22,4 mm C<sub>18</sub>): R<sub>f</sub> de TLC 0,14 (1:1 hexano/ EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1,37 (m, 2H), 1,57 (m, 2H), 1,79 (m, 2H), 3,29 (dd, 2H), 3,60 (t, 2H), 3,75 (s, 6H), 5,36 (m, 1H), 6,80 (m, 4H), 7,17-7,60 (m, 12 H), 8,12 (d, 2H).

O-5-benzoiloxi-6-O-(4',4''-dimetoxitrifetilmetil)hexil-O-(2'-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidite, 13. A uma solução de 681 mg (1,26 mmol) de 12 e 111 mg (0,65 mmol) de diisopropilamônio tetrazólio em 6,5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi adicionada uma solução de 417 mg (1,38 mmol) de O-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidite em 1,0 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A mistura foi



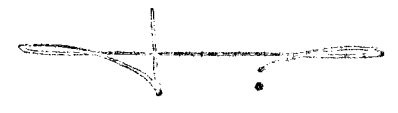
agitada durante 2 horas e dividida entre 25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 25 ml de solução saturada fresca de NaHCO<sub>3</sub>. A camada de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi lavada com solução saturada de NaCl, seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrada e concentrada. Purificação por filtração através de cavilha 2'' de alumina básica numa coluna de 25 mm, eluida com 9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N forneceu 798 mg de 13 como um óleo viscoso: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1,19 (m, 12H), 1,42 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 2,69 (m, 2H), 3,28 (dd, 2H), 3,57 (m, 4H), 3,78 (s, 6H), (subjacente a m, 2H), 5,40 (m, 1H), 6,79 (dd, 4H), 7,27-7,64 (m, 12H), 8,17 (d, 2H); <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 15% normalizado internamente) 148,0; HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>), calculado para C<sub>43</sub>H<sub>54</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>P<sub>1</sub> 741,3669, encontrado 741,3678.

### Exemplo 3

#### Preparação de O-(14-(4',4''-dimetoxitrifetilmetoxi)-7,8-ditiotetracecil)-O-(2-cianoetil)-N-N-diisopropilfosforamidite

A Figura 3 representa esquematicamente o esquema de reacção para esta fosforamidite. Os detalhes do esquema estão descritos a seguir.

Cloreto de S-(6-hidroxi-hexil)isotiuronio, 14. A uma solução de 16,6 ml (20,0 g, 146 mmol), de 6-clorohexanol em 49 ml de etanol, foram adicionados 11,1 g (146 mmol) de tioureia, e a mistura foi agitada em refluxo durante 24 horas. A mistura foi arrefecida a 0°C, e o produto foi cristalizado. Os cristais foram recolhidos por filtração em vácuo e secos de forma a originar 28,4 g de 14 como um sólido branco: pf 122-124°C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO) 1,40 (m, 4H), 1,65 (m, 2H), 3,21 (t, 2H), 3,41 (t, 2H), 9,27 e



9,33 (sobreposição dos singletos de fronteira, 4H).

6-Mercaptohexan-1-ol, 15. A uma solução de 17,8 mg (83,6 mmol) de 14 em 120 ml de H<sub>2</sub>O e 120 ml de EtOH foram adicionados 9,25 g de pellets de NaOH. A mistura foi agitada em refluxo durante 4 horas. A mistura foi cuidadosamente concentrada até aproximadamente 75 ml, e o concentrado foi purificado por destilação em vácuo para fornecer 7,4 g de 15: p.e. 95-105°C @ 5 mm Hg; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1,41 (m, 9H), 2,59 (dt, 2H), 3,69 (t com subjacente aos singletos de fronteira, 3H).

Bis-(6-hidroxihexil)disulfureto, 16. A uma solução de 4,26 g (31,7 mmol) de 15 em 10 ml de MeOH e 13,7 ml (9,97 g, 98,5 mmol) de Et<sub>3</sub>N, sobre uma atmosfera de N<sub>2</sub>, e arrefecido num banho de gelo, foi adicionada em gotas durante 10 minutos, uma solução de 4,02 g (15,8 mmol) de I<sub>2</sub> em 90 ml de MeOH. Foi retirado o banho de arrefecimento, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 4 horas. A mistura foi concentrada num evaporador rotativo e purificada por cromatografia em sílica gel (1:1 hexano/EtOAc) para fornecer 3,12 g de 16 como um sólido amarelo pálido: R<sub>f</sub> de TLC 0,18 (1:1 hexano/EtOAc); p.f. 38-48°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1,15.2,20 (m, 16 H), 2,73 (t, 4H), 3,70 (t, 4H).

Mono-O-(4',4''-dimetoxitrifetilmetil)-bis-(6-hidroxihexil)disulfureto, 17. A uma solução de 3,12 g (11,7 mmol) de 16 e 45 ml de piridina foram adicionados 3,97 g (11,7 mmol) de cloreto de 4,4'-dimetoxitrifetilmetil, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas. A maior parte da piridina foi removida num evaporador rotativo, e o resíduo foi dividido entre 100 ml de uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e 100 ml de EtOAc. A camada de EtOAc foi lavada com 50 ml de uma solução saturada de



NaCl, seca, (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e filtrada e concentrada para um óleo. Purificação por cromatografia em sílica gel (9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc) conseguindo-se 2,84 g de 17 como um óleo viscoso: R<sub>f</sub> de TLC 0,35 (9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1,41 (m, 8H), 1,65 (m, 8H), 2,70 (dois tripletes sobrepostos, 4H), 3,08 (t, 2H), 3,65 (t, 2H), 3,81 (s, 6H), 6,85 (d, 4H), 7,32 (m, 7H), 7,47 (d, 2H).

O - (14-(4',4'' - dimetoxitrifetilmetoxi) - 7,8 - ditiotetradecil)-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidite, 18.

A uma solução de 771 mg (1,36 mmol) de 17 e 116 mg (0,68 mmol) de diisopropilamônio tetrazólio em 6,8 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sob atmosfera N<sub>2</sub> foi adicionada uma solução de 458 mg (1,52 mmol) de O-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidite em 0,5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A mistura foi agitada durante 4 horas e dividida entre 25 ml de NaHCO<sub>3</sub> e 3x25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. As camadas combinadas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram lavadas com solução saturada de NaCl, secas (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), filtradas e concentradas para um óleo. Purificação por filtração através de uma cavilha 2'' de alumina básica numa coluna de 25 mm, eluída com 9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N fornecendo 831 mg de 18 como um óleo viscoso; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1,25 (m, 12 H), 1,45 (m, 8H), 1,70 (m, 8H), 2,72 (m, 6H), 3,09 (t, 2H), 3,65 (m, 4H), 3,87 (s, 6H), 3,91 (m, 2H), 6,89 (d, 4H), 7,35 (m, 7H), 7,49 (d, 2H); <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 15% normalizado internamente) 147,69; HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>) calculado para C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P<sub>1</sub>S<sub>2</sub> 769,3839, encontrado 769,3853.

#### Exemplo 4

##### Adição da Fosforamidite do Exemplo 1 ao Oligonucleótido

Um excesso molar de cinco vezes (760 mg) de fosforamidite do Exemplo 1 foi acoplado à extremidade 5' de um

oligonucleótido que estava ligado a 10 g (300  $\mu$ moles) de suporte CPG (vidro de poros controlados). Esta síntese foi realizada num sintetizador de DNA Milligen 8800 usando os protocolos de manufatura para a síntese de DNA.

Noutra circunstância, numa reacção à escala de 1  $\mu$ mol num sintetizador de DNA da Pharmacia Gene-Assembler, a eficiência de junção foi determinada para 96% por libertação de tritil. Para esta determinação foi usada a fosforamidite do Exemplo 3.

Após a reacção, o CPG foi suspenso em 100 ml de amónia concentrada e mantido a 55°C durante a noite. Após filtração, o oligonucleótido desprotegido foi purificado por um gradiente de cloreto de sódio e cromatografia de troca iónica.

As fracções foram analisadas por electroforese em gel de poliacrilamida e as fracções contendo produto foram armazenadas, ajustadas para NaCl 0,3 M com solução de NaCl 3M, e precipitadas pela adição de um volume igual de isopropanol gelado. O produto foi recolhido por centrifugação e seco em vácuo.

O pellet foi depois dissolvido em 40 ml de água e oxidado pelo tratamento com um excesso molar de cinco vezes de metaperiodato de sódio (83,6 mg para 2 g de oligonucleótido purificado, neste exemplo) a 0°C durante 30 minutos. A solução foi novamente ajustada para NaCl 0,3 M e precipitada como acima para remover o formaldeído formado nesta reacção. Após centrifugação e secagem, este material foi usado na etapa seguinte.



## Exemplo 5

### Conjugação do Oligonucleótido do Exemplo 4 com Polímero de D-ácido glutâmico, D-lisina (DEK)

100 mg de oligonucleótido oxidado (2,5  $\mu$ moles) foram dissolvidos em 1,33 ml de 100 mM de  $\text{NaBO}_3$ , pH 8,0. Depois, foram adicionadas 2,5 mg de DEK (0,25  $\mu$ moles, PM 10000, 60:40 em razão de peso de D-ácido glutâmico e D-lisina) e 0,79 mg de  $\text{NaCNBH}_3$  (12,5  $\mu$ moles). A mistura (2 ml) foi incubada a 37°C durante 3 dias. O produto da condensação foi purificado por cromatografia S-200 (Pharmacia, Upsala, Suécia).

As fracções foram marcadas com  $^{32}\text{P}$  ddATP alfa e transferase terminal para visualização num gel de poliacrilamida 8% de sequenciação de DNA standard.

As várias fracções marcadas radioactivamente foram visualizadas por electroforese e autoradiografia como apresentado na Figura 4. As bandas marcadas como "2" continham oligonucleótido no total comprimento não conjugado e a seta indica a posição de 50-mer. As bandas marcadas como "1" contêm conjugados de peso molecular decrescente. As fracções que contêm o substituto mais elevado (região A) conjugado oligo-DEK foram armazenadas para subsequente hibridação com a cadeia de oligonucleótido complementar para construir o conjugado DNA-DEK de dupla cadeia.

### Exemplo 6

#### Conjugação do Oligonucleótido do Exemplo 4 com Hemocianina do Orifício de Lapa (KLH)

100 mg de oligonucleótido oxidado em bruto (2,5  $\mu$ moles) foram dissolvidos em 1,33 ml de  $\text{NaBO}_3$  50 mM, pH 8,0. De seguida, foram adicionados 31,3 mg de KLH (0,208  $\mu$ moles) e 2,0 mg de  $\text{NaCNBH}_3$  (31,8  $\mu$ moles). A mistura (2,0 ml) foi incubada a 37°C durante 3 dias. O produto de condensação foi purificado por cromatografia S-200. As várias fracções foram marcadas radioactivamente usando o mesmo processo que o descrito acima para D-EK e foram depois visualizadas após electroforese e autoradiografia como apresentada na Figura 5. As bandas marcadas como "1" são conjugados de elevado peso molecular, as bandas marcadas como "2" contêm principalmente oligonucleótidos não conjugados e a seta indica a posição de 50-mer. Modificações dos modos de realização do invento acima descritos, que são óbvias para os especialistas no campo da química orgânica e particularmente na síntese de oligonucleótidos, e derivação entendem-se como dentro do espírito das reivindicações que se seguem. As fracções que contêm o conjugado oligo-KLH foram armazenadas para subsequente hibridação com cadeia oligonucleotídica complementar para construir o conjugado de dupla cadeia DNA-KLH.



### Exemplo 7

#### Preparação de acetal-protégido diol fosforamidite 4-(4-hidroxi-1-butil)-2-fenil-1,3 dioxolano.

Uma mistura de 1,2,6-trihidroxi-hexano (2,58 g) e benzaldeído dimetil acetal (3,18 g) é tratada com ácido sulfônico de tolueno hidratado (2,08 g). A mistura é agitada à temperatura ambiente durante 60 horas, e depois é dividida entre bicarbonato de sódio aquoso saturado (50 ml) e cloreto de metileno (20 ml). As camadas são separadas, a camada aquosa é novamente extraída com cloreto de metileno, as camadas orgânicas são secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas a um óleo (2,66 g), que é purificado por cromatografia e coluna (sílica gel, 1:1 acetato de etil/hexanos). O armazenamento e concentração das frações apropriadas origina o composto do título como um óleo (1,19 g):  $R_f$  do TLA = 0,18 (sílica, 1:1 acetato de etil/hexanos);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ , 1,62 (m, 6H), 3,67 (m, 3H), 3,25 (m, 2H), 6,37 (s, 0,6H), 6,50 (s, 0,4 H), 8,04 (s.fr., 5H).

De um modo semelhante, mas começando com benzaldeído em lugar de acetal dimetil benzaldeído, é também obtido o composto do título.

(4-(2-fenil-1,3-dioxol-4-il)butil-O-(2-cianoetil)-N-N-diisopropilfosforamidite. Uma solução do dioxolano acima (1,19 g), e diisopropilamina (2,0 ml), em cloreto de metileno (22 ml), é tratada com cianoetildiisopropilclorofosforamidite (0,92 ml) e agitada a 24°C durante 1,5 horas. A mistura é dividida entre bicarbonato de sódio aquoso saturado (25 ml) e cloreto de metileno (25 ml). As camadas são separadas, a camada aquosa é novamente extraída com cloreto de metileno, as camadas orgânicas



são secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas a um óleo (2,13 g), que é purificado por cromatografia e coluna (alumina básica, 1:1 cloreto de metileno/hexanos, trietilamina 1%). O armazenamento e concentração das fracções apropriadas origina o composto do título como um óleo (1,28 g): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ, 1,13 (12H), 1,5-1,9 (m, 8H), 2,58 (q, 2H), 3,5-3,8 (m, 8H); 4,0-4,3 (m, 2H), 5,8 (s, 0,6H), 5,92 (s, 0,4H), 7,3-7,5 (m, 5H).

De forma semelhante são preparadas as seguintes fosforamidites:

(4- (2-metoxifenil-1,3-dioxol-4-il) butil) -O- (2-cianoetil) -N-N- diisopropilfosforamidite;

(4-(2-p-butilfenil-1,3-dioxol-4-il)butil-O-(2-cianoetil -N-N-diisopropilfosforamidite;

(4-(2-bifenil-1,3-dioxol-4-il) butil-O-(2-cianoetil-N-N-diisopropilfosforamidite;

(4- (2-metil-2-fenil-1,3-dioxol-4-il) butil-O- (2-cianoetil -N-N-diisopropilfosforamidite;

#### Exemplo 8

##### Adição da Fosforamidite do Exemplo 7 a um Oligonucleótido

Pelo modo do Exemplo 4, a fosforamidite do Exemplo 7 é acoplada ao oligonucleótido. A seguir à purificação, o grupo protector acetal é removido com ácido acético 80%/água durante 40 minutos. O decorrer da reacção é visualizado por HPLC usando uma coluna Gen Pak Fax (Waters Associates), usando fosfato de sódio 0,5 M a pH 7,5, com um gradiente de cloreto de sódio 1,0 M/

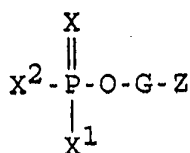


metanol 10%. O acetal inicial elui a 20,1 minutos, e o diol hidrolizado elui a 18,9 minutos.

Modificações dos modos de realização do invento acima descritos que são óbvios para os especialistas nos campos da química orgânica do fósforo, química nucleotídica, síntese oligonucleotídica, ou campos relacionados entendem-se como estando dentro do espírito das seguintes reivindicações.

## R E I V I N D I C A Ç O E S

1- Um composto da fórmula:



caracterizado pelo facto de X:

(i) ser oxigénio quando  $\text{X}^1$  é  $\text{O}^-$ , e  $\text{X}^2$  ser hidrogénio ou  $\text{RO}^-$  quando R é um grupo protector;

(ii) não estar presente quando:

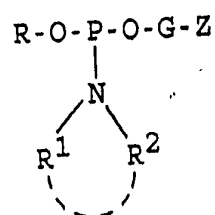
(a)  $\text{X}^1$  é cloro e  $\text{X}^2$  é metilo ou  $\text{RO}^-$ , ou

(b)  $\text{X}^2$  é  $\text{RO}^-$  e  $\text{X}^1$  é  $\text{NR}^1\text{R}^2$  quando  $\text{R}^1$  e  $\text{R}^2$  são, individualmente, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono, ou arilo de 6 a 20 átomos de carbono, ou estão unidos para formar, com o átomo de nitrogénio, uma estrutura cíclica de 4-7 átomos de carbono, e de 0 a 1 átomos calcogénios anulares com um número atómico de 8 a 16 inclusivé (O ou S);

G é um grupo hidrocarbilenos de 1 a 20 átomos de carbono; e

Z é um grupo diol vicinal hidroxil protegido, ligado a G por um dos átomos de carbono diois vicinais ou um grupo disulfureto, ligado a G por um dos átomos de enxofre do grupo disulfureto com a condição de G ter, pelo menos, 4 átomos de carbono quando Z é o referido grupo disulfureto.

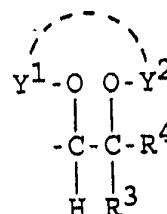
2- Uma fosforamidite com a fórmula:



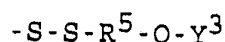


caracterizada pelo facto de R ser um grupo protector de base -lábil,  $R^1$  e  $R^2$  são, individualmente, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono, arilo de 6 a 20 átomos de carbono, ou estando unidos para formar, com o átomo de nitrogénio, uma estrutura cíclica de 4-7 átomos de carbono, e 0 a 1 átomos calcogénios anulares, com um número atómico de 8 a 16, inclusivé, sendo G um grupo hidrocarbilenos de 1 a 20 átomos de carbono, e sendo Z um grupo diol vicinal hidroxi-protégido ligado a G por um dos átomos de carbono diois vicinais, ou um grupo disulfureto e estando ligado a G por um dos átomos de enxofre do grupo disulfureto, com a condição de G ter, pelo menos, 4 átomos de carbono quando Z é o referido grupo disulfureto.

3- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizada pelo facto de Z ser



quando  $R^3$  e  $R^4$  são, individualmente, hidrogénio, alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, ou arilo monocíclico de 6 a 20 átomos de carbono, e  $Y^1$  e  $Y^2$  são grupos hidroxi-protectores individuais, ou estão unidos por uma ponte de átomo único para formar um grupo protector de anel de cinco membros, ou



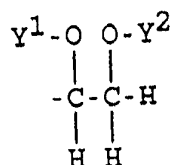
em que  $R^5$  é um grupo alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, ou um grupo arilo monocíclico de 6 a 20 átomos de carbono,  $Y^3$  é um

grupo protector hidroxí.

4- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 3, caracterizada pelo facto de  $R^1$  e  $R^2$  serem isopropilo.

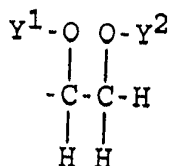
5- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 4, caracterizada pelo facto de  $R^3$  e  $R^4$  serem hidrogénio,  $R^5$  ser  $-(CH_2)_6$ , e  $Y^1$ ,  $Y^2$  e  $Y^3$  são benzoilo ou dimetoxitritilo.

6- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizada pelo facto de  $R^1$  e  $R^2$  serem isopropilo, G ser  $-(CH_2)_4$ , e Z ser



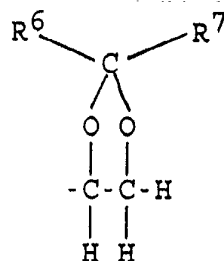
em que  $Y^1$  e  $Y^2$  são benzoilo.

7- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizada pelo facto de  $R^1$  e  $R^2$  serem isopropilo, G ser  $-(CH_2)_4$ , e Z ser



em que  $Y^1$  é benzoilo e  $Y^2$  é dimetoxitritilo.

8- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizada pelo facto de Z ser um grupo diol vicinal hidroxí protegido, da fórmula:

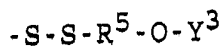


em que  $R^6$  e  $R^7$  são, individualmente, hidrogénio, arilo, ou arilo substituído de 6 a 30 átomos de carbono, alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, ou alquilo aromático-substituído com menos de 30 átomos de carbono, com a condição de  $R^6$  e  $R^7$  não serem hidrogénio.

9- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 8, caracterizada pelo facto de  $R^6$  e  $R^7$  serem, individualmente, hidrogénio ou um fenil facultativamente substituído com alquilo com 1 a 8 átomos de carbono, alcóxido com 1 a 8 átomos de carbono, 1 a 4 átomos de halogénio com um número atómico de 9 a 35, nitro ou fenil, com a condição de ambos,  $R^6$  e  $R^7$  não serem hidrogénio.

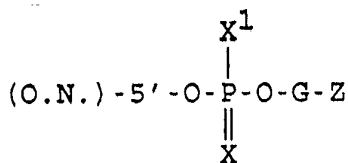
10- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 8, caracterizada pelo facto de  $R^6$  ser hidrogénio e  $R^7$  ser fenil, p-butilfenil, p-metoxi fenil, p-t-butilfenil ou bifenil.

11- Uma fosforamidite, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizada pelo facto de  $R^1$  e  $R^2$  serem isopropil, sendo  $G = (CH_2)_6$ , e sendo  $Z$



, em que  $R^5$  é  $-(CH_2)_6-$ , e  $Y^3$  é dimetoxitritil.

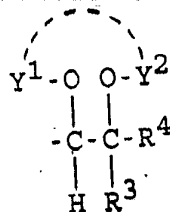
12- Um oligonucleótido 5' modificado com a fórmula:



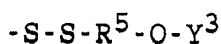
caracterizada pelo facto de (O.N.) representar uma cadeia

oligonucleotídica, sendo X um átomo calcogénio de número atómico de 8 a 16, inclusivé,  $X^1$  é  $O^-$ , metilo,  $-OCH_3$ , ou  $NR^1R^2$ , em que  $R^1$  e  $R^2$  são, individualmente, hidrogénio ou alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, G é um grupo hidrocarbilenos de 1 a 20 átomos de carbono, e Z é um grupo diol vicinal hidroxi-protegido, ligado a G por um dos átomos de carbono diois vicinais, ou um grupo disulfureto ligado a G por um dos átomos de enxofre do grupo disulfureto.

13- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 12, caracterizado pelo facto de Z ser

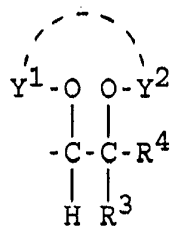


em que  $R^3$  e  $R^4$  são, individualmente, hidrogénio, alquilo de 4 a 20 átomos de carbono, ou arilo monocíclico de 6 a 20 átomos de carbono, e  $Y^1$  e  $Y^2$  são grupos hidroxi protectores individuais, ou estão unidos por uma ponte de átomo único para formar um grupo protector de anel de cinco membros, ou



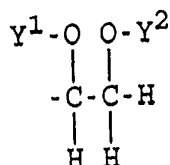
em que  $R^5$  é um grupo alquilo de 4 a 20 átomos de carbono, ou um grupo arilo monocíclico de 6 a 20 átomos de carbono, e  $Y^3$  é um grupo hidroxi protector.

14- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 13, caracterizado pelo facto de Z ser



e sendo  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  removidos para deixar grupos hidroxí livres.

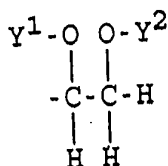
15- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 12, caracterizado pelo facto de G ser  $-(\text{CH}_2)_4-$ , e sendo Z



em que  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  são benzoílo.

16- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 15, caracterizado pelo facto de  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  serem removidos para deixar grupos hidroxilo livres.

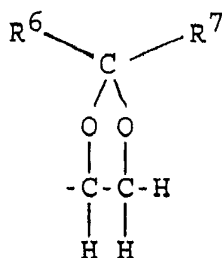
17- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 12, caracterizado pelo facto de G ser  $-(\text{CH}_2)_4-$ , e sendo Z



em que  $\text{Y}^1$  é benzoílo e  $\text{Y}^2$  é dimetoxitritilo.

18- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 14, caracterizado pelo de  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  serem removidos para deixar grupos hidroxilo livres.

19- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 12, caracterizado pelo facto de Z ser

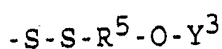


e sendo  $R^6$  e  $R^7$ , individualmente, hidrogénio, arilo ou arilo substituído de 6 a 30 átomos de carbono, alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, ou alquilo aromático substituído com menos do que 30 átomos de carbono, com a condição de ambos,  $R^6$  e  $R^7$  não serem hidrogénio.

20- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 19, caracterizado pelo facto de  $R^6$  e  $R^7$  serem, individualmente, hidrogénio ou fenil facultativamente substituído com alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcóxido de 1 a 8 átomos de carbono, 1 a 4 átomos de halogénio de número atómico de 9 a 35, nitro ou fenil, com a condição de ambos,  $R^6$  e  $R^7$  não serem hidrogénio.

21- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 19, caracterizado pelo facto de  $R^6$  ser hidrogénio e sendo  $R^7$  um fenil, p-butilfenil, p-metoxifenil, p-t-butilfenil ou bifenil.

22- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 12, caracterizado pelo facto de G ser  $-(CH_2)_6-$ , e sendo Z



em que  $R^5$  é  $-(CH_2)_6-$ , e  $Y^3$  é dimetoxitritilo.

23- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 14, caracterizado pelo facto de Z ser oxidado para formar um grupo aldeído terminal no oligonucleótido.

24- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 18, caracterizado pelo facto de Z ser oxidado para formar um grupo aldeído terminal no oligonucleótido.

25- Um oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 22, caracterizado pelo facto de Z ser reduzido para formar um grupo tiol terminal no oligonucleótido.

26- Um conjugado de uma molécula transportadora contendo um grupo amino e o oligonucleótido 5' modificado, conforme reivindicado na reivindicação 23, caracterizado pelo facto de o conjugado ser formado por reacção entre o referido grupo amino e o referido grupo aldeído terminal.

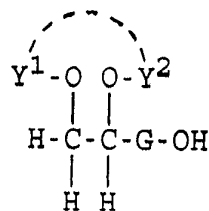
27- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 26, caracterizado pelo facto de a molécula transportadora ser um polímero.

28- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 27, caracterizado pelo facto de o polímero ser um polímero aminoacídico.

29- Um conjugado de uma molécula transportadora tendo um grupo funcional e o oligonucleótido 5' modificado da reivindicação 25, caracterizado pelo facto de o conjugado ser formado por reacção entre o referido grupo e o referido grupo tiol terminal.

30- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 29, caracterizado pelo facto de o transportador ser um polímero.

31- Um álcool parcialmente protegido, caracterizado pelo facto de ter a seguinte fórmula

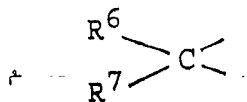


em que  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  são grupos protectores hidroxí individuais, ou estão unidos por uma ponte de átomo único para formar um grupo protector de anel de cinco membros, e sendo G um grupo hidrocarbílico de 1 a 20 átomos de carbono.

32- Um álcool, conforme reivindicado na reivindicação 31, caracterizado pelo facto de  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  serem benzoilo e sendo G butileno.

33- Um álcool, conforme reivindicado na reivindicação 31, caracterizado pelo facto de  $\text{Y}^1$  ser dimetoxitritilo, de  $\text{Y}^2$  ser benzoilo e de G ser butileno.

34- Um álcool, conforme reivindicado na reivindicação 31, caracterizado pelo facto de  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  representarem

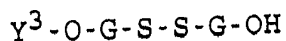


em que  $\text{R}^6$  e  $\text{R}^7$  são, individualmente, hidrogénio, arilo ou arilo substituído de 6 a 30 átomos de carbono, alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, ou alquilo aromático substituído com menos do que 30 átomos de carbono, com a condição de ambos,  $\text{R}^6$  e  $\text{R}^7$ , não



serem hidrogénio.

35- Um disulfureto, caracterizado pelo facto de ter a fórmula:



em que G é um grupo hidrocarbilenos de 4 a 20 átomos de carbono, e  $Y^3$  é um grupo hidroxilo protector.

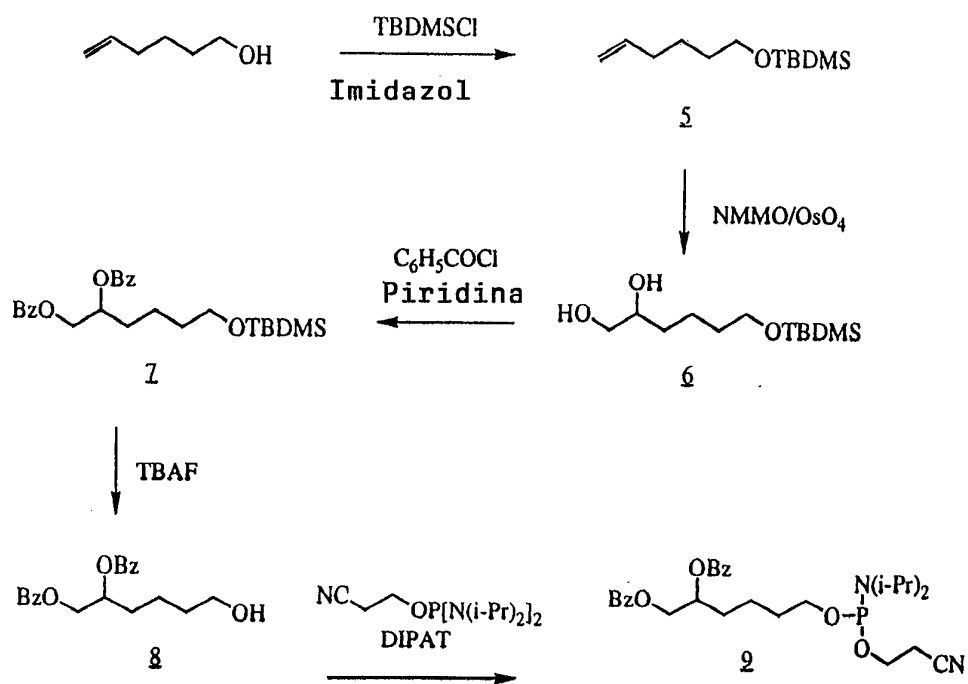
36- Um disulfureto, conforme reivindicado na reivindicação 35, caracterizado pelo facto de  $Y^3$  ser dimetoxitritilo e sendo G um hexileno.

Lisboa, 15 de Julho de 1992

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

O ADJUNTO



**FIG. 1**

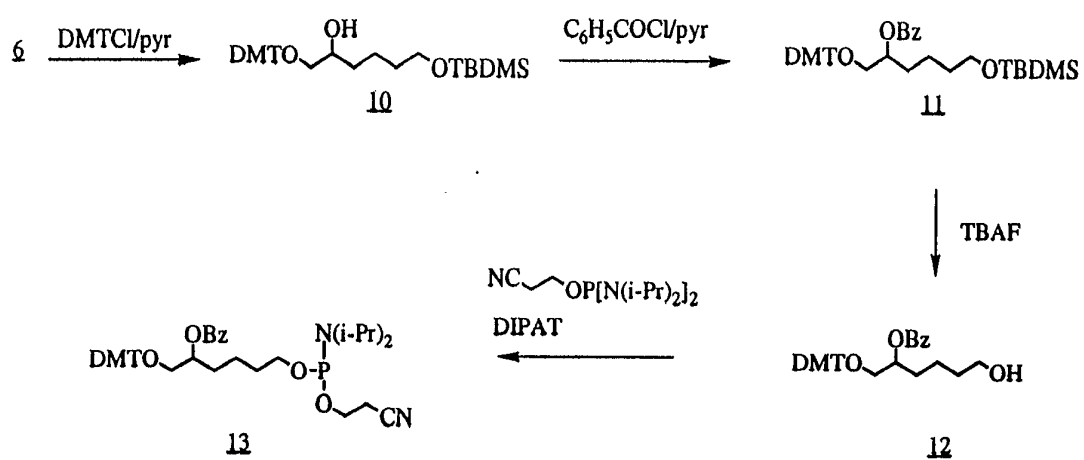
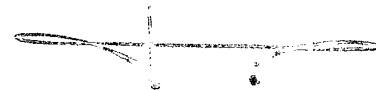


FIG. 2

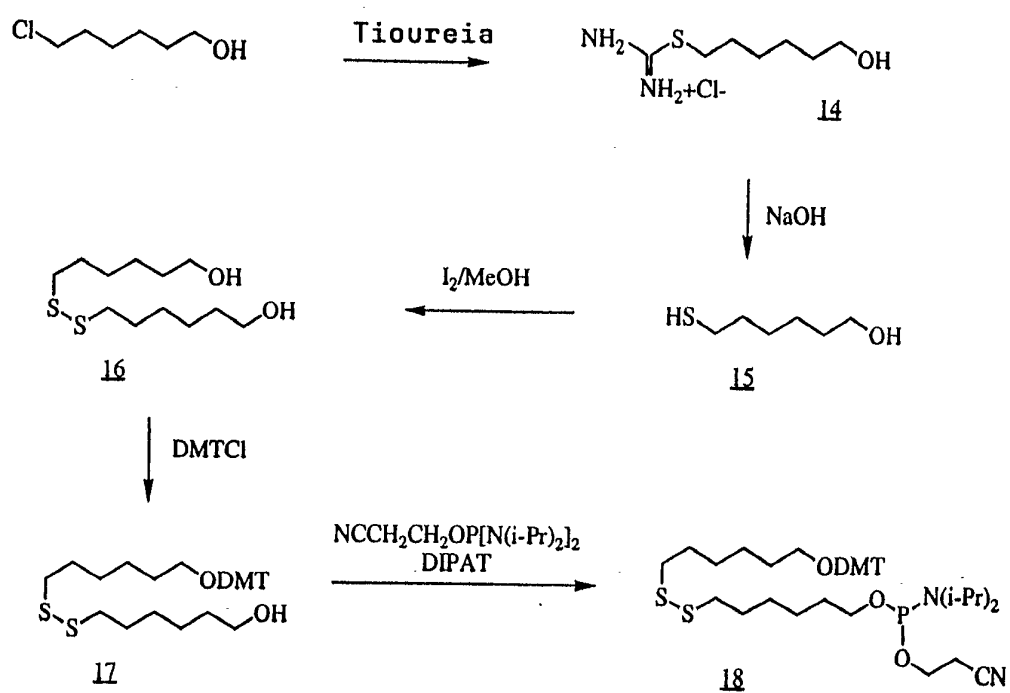


FIG. 3

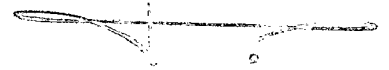


FIG. 4

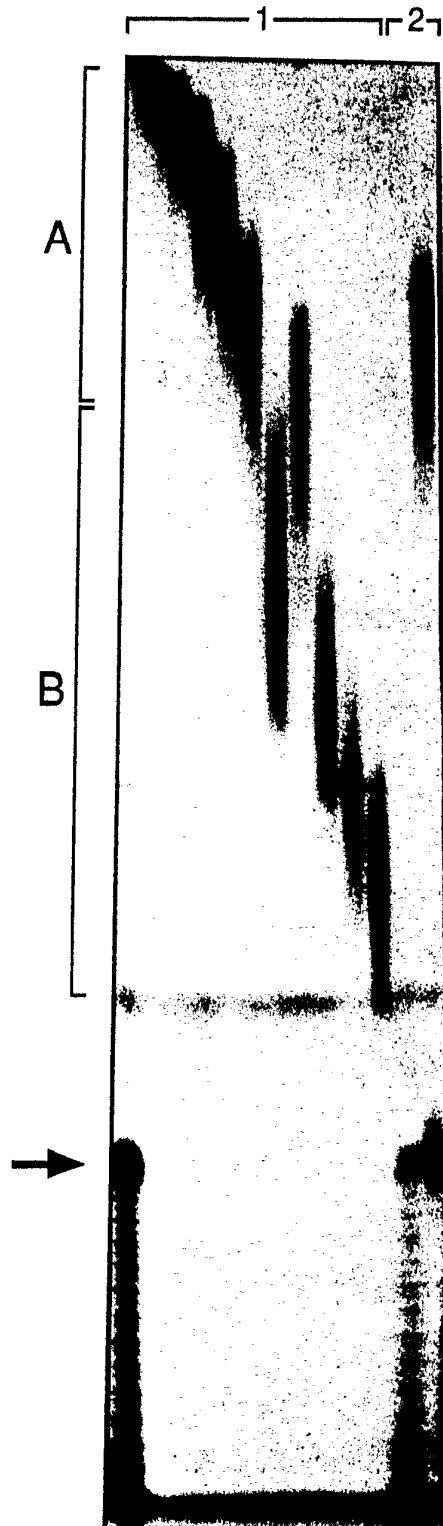


FIG. 5

