



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 242 291**

⑤① Int. Cl.7: **C07H 21/00**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98942516 .0**

⑧⑥ Fecha de presentación : **14.09.1998**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1015469**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2000**

⑤④ Título: **Nucleótidos bi- y tricíclicos, análogos de nucleótidos y oligonucleótidos.**

③⑩ Prioridad: **12.09.1997 DK 105497**
19.12.1997 DK 149297
16.01.1998 DK 6198
03.03.1998 DK 28698
29.04.1998 DK 58598
05.06.1998 US 88309 P
08.06.1998 DK 75098
28.07.1998 DK 98298

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2005

⑦③ Titular/es: **Exiqon A/S**
Bygstubben, 9
2950 Vedbaek, DK

⑦② Inventor/es: **Wengel, Jesper y**
Nielsen, Poul

⑦④ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 242 291 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

Nucleótidos bi- y tricíclicos, análogos de nucleótidos y oligonucleótidos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los análogos de nucleósidos bi- y tricíclicos, y a la síntesis de tales análogos de nucleósidos, los cuales son útiles para la formación de oligonucleótidos sintéticos capaces de formar duplexes y triplexes de nucleobases específicos con ácidos nucleicos de hebra única y doble hebra. Estos complejos
10 presentan una mayor termoestabilidad que los correspondientes complejos formados con ácidos nucleicos normales. La invención también se refiere al campo de los análogos de nucleósidos bi- y tricíclicos, y a la síntesis de tales nucleósidos, los cuales podrían usarse como drogas terapéuticas, y los cuales podrían incorporarse en oligonucleótidos mediante polimerasas de ácido nucleico dependientes de la plantilla.

15 Antecedentes de la invención

Los oligonucleótidos sintéticos son compuestos ampliamente usados en campos dispares, tales como la biología molecular, y el diagnóstico y terapéutica basados en el ADN.

20 Terapéutica

En la terapéutica, los oligonucleótidos se han usado exitosamente, por ejemplo, para bloquear la traducción *in vivo* de ARNm específicos, previniendo de ese modo la síntesis de proteínas que son indeseables o peligrosas para la célula/organismo. Este concepto de bloqueo de la traducción mediado por oligonucleótidos se conoce en la técnica como estrategia de “antisentido”. Desde el punto de vista del mecanismo, se cree que el oligonucleótido que se hibrida causa su efecto, bien creando un bloqueo físico del proceso de traducción, o reclutando enzimas celulares que específicamente degradan la parte dúplex del ARNm (ARNasaH).
25

Más recientemente, los oligoribonucleótidos y oligodesoxiribonucleótidos, y los análogos de los mismos, que combinan la actividad catalítica ARNasa con la capacidad de interactuar específicamente con un ARN diana complementario (ribozimas) han atraído la atención, como sondas antisentido. Hasta ahora, se han descrito ribozimas que son efectivos en cultivos celulares contra ambos, dianas virales y oncogenes.
30

Para prevenir completamente la síntesis de una determinada proteína mediante la estrategia del antisentido, es necesario bloquear/destruir todos los ARNm que codifican esa proteína concreta, y, en muchos casos, el número de estos ARNm es bastante elevado. Típicamente, los ARNm que codifican una determinada proteína se transcriben a partir de un único o pocos genes. Por tanto, apuntando al gen (estrategia “antigen”) en vez de a sus productos de ARNm, debería ser posible, o bloquear la producción de sus proteínas parientes más eficientemente, o conseguir una reducción significativa en la cantidad de oligonucleótidos necesaria para causar el efecto deseado. Para bloquear la transcripción, el oligonucleótido debe ser capaz de hibridar, de forma específica para la secuencia, un ADN de doble hebra. En 1953, Watson y Crick mostraron que el ácido desoxiribonucleico (ADN) se compone de dos hebras (*Nature*, 171:737 (1953)), las cuales se mantienen juntas en una configuración helicoidal mediante enlaces formados entre dos nucleobases complementarias opuestas en las dos hebras. Las cuatro nucleobases halladas comúnmente en el ADN son la guanina (G), adenina (A), timidina (T) y citosina (C), de las cuales, la nucleobase G se empareja con la C, y la nucleobase A se empareja con la T. En el ARN, la nucleobase timidina es remplazada por la nucleobase uracilo (U), la cual, de forma similar a la nucleobase T, se empareja con la A. Los grupos químicos en los pares de nucleobases que participan en la formación del dúplex estándar constituyen la cara Watson-Crick. En 1959, Hoogsteen mostró que las nucleobases purínicas (G y A), además de su cara Watson-Crick, tienen una cara Hoogsteen que puede reconocerse desde el exterior de un dúplex, y usarse para unir oligonucleótidos pirimidínicos a través de puentes de hidrógeno, formando de ese modo una estructura de triple hélice. Aunque hacen conceptualmente factible la estrategia “antigen”, la utilidad práctica de los oligómeros formadores de triple hélice está actualmente limitada por varios factores, incluyendo la necesidad de motivos con secuencia homopurina en el gen diana y una necesidad no fisiológica de fuerza iónica elevada y pH bajo para estabilizar el complejo.
40
45
50

También se está investigando activamente el uso de oligonucleótidos conocidos como “aptámeros”. Esta nueva y prometedora clase de oligonucleótidos terapéuticos se selecciona *in vitro* para unirse específicamente a una determinada diana con elevada afinidad, tal como, por ejemplo, receptores de ligandos. Es probable que sus características de unión sean un reflejo de la capacidad de los oligonucleótidos para formar estructuras tridimensionales que se mantienen juntas mediante emparejamientos intramoleculares de nucleobases.
55
60

De igual forma, los nucleósidos y los análogos de nucleósidos se han probado efectivos en la quimioterapia de numerosas infecciones y cánceres.

También, se ha mostrado diferentes tipos de ARN de doble hebra que inhiben efectivamente el crecimiento de
65 varios tipos de cánceres.

Diagnóstico

En la biología molecular, los oligonucleótidos se usan rutinariamente para una variedad de propósitos, tales como, por ejemplo, (i) como sondas de hibridación en la captura, identificación y cuantificación de ácidos nucleicos diana, (ii) como sondas de afinidad en la purificación de ácidos nucleicos diana, (iii) como cebadores en las reacciones de secuenciación y en los procesos de amplificación de dianas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (iv) para clonar y mutar ácidos nucleicos, y (v) como bloques de construcción en el ensamblado de estructuras macromoleculares.

El diagnóstico utiliza muchas de las técnicas basadas en oligonucleótidos mencionadas más arriba, en particular aquellas que son apropiadas para un automatización fácil y que facilitan resultados reproducibles con elevada sensibilidad. El objetivo en este campo es usar técnicas basadas en oligonucleótidos como medios para, por ejemplo, (i) ensayar humanos, animales y alimentos en busca de la presencia de microorganismos patógenos, (ii) para ensayar la predisposición genética hacia un enfermedad, (iii) para identificar alteraciones genéticas heredadas y adquiridas, (iv) para relacionar restos biológicos con sospechosos en juicios por crímenes, y (v) para validar la presencia de microorganismos implicados en la producción de comidas y bebidas.

Consideraciones generales

Para ser útiles en el amplio rango de diferentes aplicaciones esbozado más arriba, los oligonucleótidos deben satisfacer un gran número de distintos requisitos. Por ejemplo, en la terapia "antisentido", un oligonucleótido útil debe ser capaz de penetrar la membrana celular, tener una buena resistencia a las nucleasas extra e intracelulares, y tener preferiblemente la capacidad de reclutar enzimas endógenos como la ARNasaH. En el diagnóstico basado en ADN y en la biología molecular son importantes otras propiedades tal como, por ejemplo, la capacidad de los oligonucleótidos para actuar como sustratos eficientes para un amplio rango de distintas enzimas que han evolucionado para actuar sobre ácidos nucleicos, tales como las polimerasas, quinasas, ligasas y fosfatasa. Sin embargo, la propiedad fundamental de los oligonucleótidos, la cual subyace todos sus usos, es su capacidad para reconocer e hibridarse, de forma específica para la secuencias, a ácidos nucleicos de hebra única, empleando los enlaces de hidrógenos de Watson-Crick (A-T y G-C) u otros esquemas de enlaces de hidrógeno, tales como el modo de Hoogsteen. Hay dos importantes términos afinidad y especificidad que se usan comúnmente para caracterizar las propiedades de hibridación de un determinado oligonucleótido. La afinidad es una medida de la fuerza de unión del oligonucleótido a su secuencia diana complementaria (expresada como la termoestabilidad (T_m) del dúplex). Cada par de nucleobases en el dúplex contribuye a la termoestabilidad y, por tanto, la afinidad incrementa a medida que incrementa el tamaño (nº de nucleobases) del oligonucleótido. La especificidad es una medida de la capacidad del oligonucleótido para discriminar entre una secuencia diana completamente complementaria y una desparejada. En otras palabras, la especificidad es una medida de la pérdida de afinidad asociada con los pares de nucleobases no emparejadas en la diana. Para un tamaño constante de oligonucleótido, la especificidad incrementa a medida que incrementa el número de desparejamientos entre el oligonucleótido y su diana (es decir, el porcentaje de desparejamientos incrementa). De forma opuesta, la especificidad disminuye cuando el tamaño del oligonucleótido incrementa para un número constante de desparejamientos (es decir, el porcentaje de desparejamientos disminuye). Expresado de otra forma, un incremento en la afinidad de un oligonucleótido ocurre a expensas de la especificidad, y viceversa.

Esta propiedad de los oligonucleótidos crea un cierto número de problemas para su uso práctico. Por ejemplo, en los procedimientos de diagnóstico de larga duración, el oligonucleótido debe tener ambas, una elevada afinidad para asegurar una sensibilidad adecuada del ensayo, y una elevada especificidad para evitar resultados falsos positivos. De igual forma, un oligonucleótido usado como sonda antisentido debe ambas, una elevada afinidad por su ARNm diana para perjudicar su traducción, y una elevada especificidad para evitar bloquear de forma no intencionada la expresión de otras proteínas. Con las reacciones enzimáticas, como, por ejemplo, la amplificación mediante PCR, la afinidad del cebador de oligonucleótidos debe ser lo suficientemente elevada como para que el dúplex cebador/diana sea estable en el rango de temperaturas en el que el enzima presenta actividad, y la especificidad de ser lo bastante elevada como para asegurar que sólo se amplifica la secuencia diana correcta.

Dadas las limitaciones de los oligonucleótidos naturales, serían altamente útiles nuevas estrategias para potenciar la especificidad y afinidad para las terapias y diagnósticos basados en ADN, y para la biología molecular en general.

Nucleósidos conformacionalmente restringidos

Se sabe que los oligonucleótidos experimentan una transición de conformación en el curso de la hibridación de la secuencia diana, desde la estructura de bucle relativamente aleatorio del estado de hebra única, hasta la estructura ordenada del estado dúplex.

Se han sintetizado un cierto número de oligonucleótidos conformacionalmente restringidos, incluyendo análogos de nucleósidos bicíclicos y tricíclicos (Figura 1A y 1B, en las que B = nucleobase), se han incorporado en oligonucleótidos y análogos de oligonucleótidos, y se ha ensayado su hibridación y otras propiedades.

Se han sintetizado biciclo[3.3.0]nucleósidos (bcADN) con un puente C-3',C-5'-etano adicional (A y B) con la totalidad de las cinco nucleobases (G, A, T, C y U), mientras que (C) se ha sintetizado sólo con las nucleobases T y A (M. Tarkoy, M. Bolli, B. Schweizer y C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 76:481 (1993); Tarkoy y C. Leumann, *Angew.*

Chem., *Int. Ed. Engl.*, 32:1432 (1993); M. Egli, P. Lubini, M. Dobler y C. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:5855 (1993); M. Tarkoy, M. Bolli y C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 77:716 (1994); M. Bolli y C. Leumann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 34:694 (1995); M. Bolli, P. Lubini y C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 78:2077 (1995); J. C. Litten, C. Epple y C. Leumann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5:1231 (1995); J. C. Litten y C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 79:1129 (1996); M. Bolli, J. C. Litten, R. Schultz y C. Leumann, *Chem. Biol.*, 3:197 (1996); M. Bolli, H. U. Trafelet y C. Leumann, *Nucleic Acids Res.*, 24:4660 (1996). Los oligonucleótidos de ADN que contienen unos pocos de, o que están completamente compuestos por, estos análogos son en la mayoría de los casos capaces de formar duplexes unidos de Waston-Crick con oligonucleótidos de ADN y ARN complementarios. La termoestabilidad de los duplexes resultantes es, no obstante, claramente inferior (C), moderadamente inferior (A) o comparable (B) a la estabilidad de sus contrapartidas de ADN y ARN naturales. Todos los oligómeros bcADN mostraron un incremento pronunciado en su sensibilidad a la fuerza iónica del medio de hibridación en comparación con sus contrapartidas naturales. El α -biciclo-ADN (B) es más estable frente a la 3'-exonucleasa fosfodiesterasa del veneno de serpiente que el β -biciclo-ADN (A), el cual es sólo moderadamente más estable que los oligonucleótidos no modificados.

Se han sintetizado bicarbociclo[3.1.0]nucleósidos con un puente C-1',C-6' - o C-6',C-4'-metano en un anillo ciclopentano (D y E, respectivamente) con la totalidad de las cinco nucleobases (T, A, G, C and U). No obstante, sólo se han incorporado en oligómeros los T-análogos. La incorporación de uno o diez monómeros D en un oligonucleótido de ADN de poli-pirimidina mixto resultó en una disminución sustancial de la afinidad hacia ambos, los oligonucleótidos de ADN y ARN en comparación con el oligonucleótido no modificado de referencia. La disminución fue más pronunciada con el ARNss que con el ARNs. La incorporación de un monómero E en dos oligonucleótidos de ADN de poli-pirimidina indujo incrementos modestos en las T_m de 0,8°C y 2,1°C para los duplexes hacia el ARNss en comparación con los duplexes de referencia no modificados. Cuando se incorporaron diez T-análogos en un oligonucleótido 15-mero que contenía exclusivamente enlaces fosforotioato internucleósidos, la T_m respecto el oligonucleótido de ARN complementario fue incrementó aproximadamente 1,3°C por modificación en comparación con la misma secuencia fosforotioato no modificada. Al contrario que la secuencia control el oligonucleótido que contenía el nucleósido bicíclico E no consiguió mediar el corte del ARNasaH. No se han descrito las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos que contienen los análogos de G, A, C y U de E. También, la química de este análogo no hace que se preste a intensas investigaciones adicionales sobre oligonucleótidos completamente modificados (K.-H. Altmann, R. Kesselring, E. Francotte y G. Rihs, *Tetrahedron Lett.*, 35:2331 (1994); K.-H. Altmann, R. Imwinkelried, R. Kesselring y G. Rihs, *Tetrahedron Lett.*, 35:7625 (1994); V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, A. Ezzitouni, P. Russ, J. Wang, R. W. Wagner y M. D. Matteucci, *J. Med. Chem.*, 39:3739 (1996); A. Ezzitouni y V. E. Marquez, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1:1073 (1997)).

Se ha sintetizado un biciclo[3.3.0]nucleósido, que contiene un anillo C-2',C-3'-dioxalano adicional, como un dímero con un nucleósido no modificado, en donde el anillo adicional es parte del enlace internucleósido que reemplaza un enlace fosfodiéster natural (F). Este análogo sólo se sintetizó, bien como bloques de timina-timina o timina-5-metilcitosina. Una secuencia 15-mérica de polipirimidina, que contenía siete de estos bloques diméricos y que tenían enlaces fosfodiéster y riboacetal alternados, presentó una disminución sustancial en la T_m contra un ARNss complementario en comparación con una secuencia control exclusivamente con enlaces internucleósidos fosfodiéster (R. J. Jones, S. Swaminathan, J. F. Millagan, S. Wadwani, B. S. Froehler y M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:9816 (1993)).

Los dos dímeros (G y H) con anillos C-2',C-3'-dioxano adicionales, formando sistemas bicíclicos[4.3.0] en enlaces internucleósidos del tipo acetal, se han sintetizado como dímeros T-T, y se han incorporado una vez en medio de oligonucleótidos 12-méricos de polipirimidina. Los oligonucleótidos que contenían bien G o H formaron ambos duplexes significativamente menos estables con el ARNss y ADNss complementarios en comparación el oligonucleótido control sin modificar (J. Wang y M. D. Matteucci, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7:229 (1997)).

Se han sintetizado dímeros que contienen un biciclo[3.1.0]nucleósido, con un puente C-2',C-3'-metano, como parte de enlaces internucleósidos del tipo amida y sulfonamida (I Y J), y se han incorporado en oligonucleótidos. Los oligonucleótidos que contienen uno o más de estos análogos mostraron una reducción significativa en la T_m en comparación con oligonucleótidos naturales no modificados de referencia (C. G. Yannopoulos, W. Q. Zhou, P. Nower, D. Peoch, Y. S. Sanghvi y G. Just, *Synlett*, 378 (1997)).

Se ha sintetizado un trímero con enlaces internucleósidos formacetales y un análogo de nucleósido derivado de biciclo[3.3.0]glucosa en medio (K), y se han conectado al extremo 3' de un oligonucleótido. La T_m respecto el ARNss complementario disminuyó en 4°C en comparación con una secuencia control, y en 1,5°C en comparación con una secuencia que contenía dos enlaces 2',5'-formacetal en el extremo 3' (C. G. Yannopoulos, W. Q. Zhou, P. Nower, D. Peoch, Y. S. Sanghvi y G. Just, *Synlett*, 378 (1997)).

Muy recientemente se han descrito oligómeros compuestos por análogos de nucleósidos tricíclicos (L) que muestran una estabilidad del dúplex incrementada en comparación con el ADN natural (R. Steffens y C. Leumann (Poster SB-B4), *Chimia*, 51:436 (1997)).

Se han sintetizado tres nucleósidos bicíclicos ([4.3.0] y [3.3.0]) con un anillo adicional de seis (M y N) o cinco (O) miembros conectado en C-2', C-3', como los análogos T. Las T_m respecto ADNss y ARNss complementario disminuyeron en 6-10°C por modificación, en comparación con secuencias control no modificadas. Los oligonucleótidos completamente modificados del análogo O presentaron una T_m incrementada de aproximadamente 1,0°C por

modificación frente al oligonucleótido de ARN complementario en comparación con el oligonucleótido de ADN de control. También, la secuencia completamente modificada fue sustancialmente más estable frente a la hidrólisis por la fosfodiesterasa del veneno de serpiente que la secuencia control no modificada. Sin embargo, los oligonucleótidos parcialmente modificados, en los cuales se incorporaron hasta cuatro análogos de O fueron menos termoestables que los correspondientes oligonucleótidos no modificados. Todos los oligonucleótidos que contenían el análogo O (tanto total como parcialmente modificados) mostraron una disminución sustancial en su termoestabilidad frente oligonucleótidos de ADN complementarios en comparación con los oligonucleótidos no modificados (P. Nielsen, H.M. Pfundheller, J. Wengel, *Chem. Commun.*, 826 (1997); P. Nielsen, H.M. Pfundheller, J. Wengel, XII International Roundtable: Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications, La Jolla, California, 15-19 de septiembre, 1996; póster PPI 43).

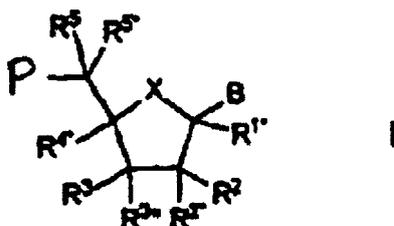
Un intento de construir el análogo de nucleósido de uridina bicíclico Q, planeado para incluir un anillo O-2', C-4' de cinco miembros, empezando a partir del nucleósido 4'-C-hidroximetil P, fracasó (K. D. Nielsen, *Specialerapport* (Universidad de Odense, Dinamarca), 1995).

Hasta la fecha, la persecución de nucleósidos conformacionalmente restringidos en la formación de oligonucleótidos sintéticos con características de hibridación significativamente mejoradas ha alcanzado poco éxito. En la mayoría de los casos, los oligonucleótidos conteniendo estos análogos forman duplexes menos estables con los ácidos nucleicos en comparación con los oligonucleótidos no modificados. En otros casos, en donde se observa una mejora moderada en la estabilidad del dúplex, esta se relaciona bien con un ADN o ARN diana, o se refiere a oligonucleótidos completamente, pero no parcialmente, modificados, o viceversa. Una evaluación de la mayoría de los análogos mencionados ésta adicionalmente complicada por la ausencia de datos sobre análogos con nucleobase G, A y C, y la ausencia de datos que indiquen la especificidad y modo de hibridación. En muchos casos, la síntesis de los análogos de monómero descritos es muy compleja, mientras que en otros casos, la síntesis de oligonucleótidos completamente modificados es incompatible con la ampliamente utilizada química estándar del fosforamidito.

Resumen de la invención

En vista de las limitaciones de los análogos de nucleósidos previamente conocidos, los presentes inventores proporcionan ahora nuevos análogos de nucleósidos (LNA) y oligonucleótidos que incluyen análogos de nucleósidos LNA. Los nuevos ácidos nucleicos se han proporcionado con todas las nucleobases comúnmente usadas, proporcionando de ese modo un completo conjunto de ácidos nucleicos para su incorporación en oligonucleótidos. Tal como será evidente a partir de lo que sigue, los ácidos nucleicos LNA y los oligonucleótidos modificados con LNA proporcionan un amplio rango de mejoras para los oligonucleótidos usados en los campos de diagnóstico y terapia. Más aún, los ácidos nucleicos LNA y los oligonucleótidos modificados con LNA también proporcionan nuevas perspectivas a los diagnósticos y terapias basados en nucleósidos y oligonucleótidos.

Por tanto, la presente invención se refiere a oligómeros que comprenden al menos un ácido nucleico (a partir de ahora denominado "LNA") con la Formula 1 general,



en donde

X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R^{N*})-, -C(R⁶R^{6*})-, -O-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-O-, -S-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-S-, -N(R^{N*})-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-N(R^{N*})-, y -C(R⁶R^{6*})-C(R⁷R^{7*})-;

B se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C₁₋₄-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₄-alquilo opcionalmente sustituido, C₁₋₄-aciloxi opcionalmente sustituido, nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos;

P designa la posición del radical para un enlace internucleósidos a un monómero sucesivo, o a un grupo 5'-terminal, tal enlace internucleósidos o grupo 5'-terminal podría incluir opcionalmente el sustituyente R⁵;

uno de los sustituyentes R², R^{2*}, R³, y R^{3*} es un grupo P*, el cual designa un enlace internucleósidos a un monómero precedente, o a un grupo 3'-terminal;

los sustituyentes R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de -O-, -S-, -N(R*)-, -(CR*R*)_{r+s+1}-, -(CR*R*)_r-S-(CR*R*)_s-, -(CR*R*)_r-N(R*)-(CR*R*)_s-, -O-(CR*R*)_{r+s}-O-, -S-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-

ES 2 242 291 T3

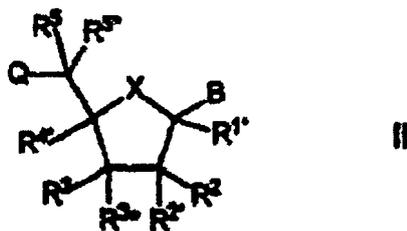
O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -S-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-S-, y -S-C(R*R*)_{r+s}-N(R*)-;

en donde R* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di (C₁₋₆-alquil) amino, C₁₋₆-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y/o dos R* adyacentes (no geminales) podrían juntos designar un doble enlace, y cada uno de r y s es 0-3 a condición de que la suma r+s sea 1-4;

cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R^{2*}, R³, R^{4*}, R⁵, R^{5*}, R⁶ y R^{6*}, R⁷ y R^{7*}, los cuales están presentes y no implicados en P, P* o los biradicales, se selecciona independientemente de entre hidrógeno, C₁₋₁₂-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₁₂-alquenoilino opcionalmente sustituido, C₂₋₁₂-alquinoilino opcionalmente sustituido, hidroxilo, C₁₋₁₂-alcoxi, C₂₋₁₂-alquenoiloxi, carboxilo, C₁₋₁₂-alcoxicarbonilo, C₁₋₁₂-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di (C₁₋₆-alquil) amino, carbamilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)-amino-carbonilo, amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, mono- y di (C₁₋₆-alquil) amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, C₁₋₆-alquil-carbonilamino, carbamido, C₁₋₆-alcanoiloxi, sulfono, C₁₋₆-alquilsulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, en donde arilos y heteroarilos podrían estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales podrían designar juntos oxo, tioxo, imino, o metileno opcionalmente sustituido, o juntos podrían formar un biradical spiro consistente en una cadena de alquilenos de 1-5 átomos de carbono, la cual está opcionalmente interrumpida y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR^N)-, en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alquilo, y en donde dos sustituyentes adyacentes (no geminales) podrían designar un enlace adicional que resulta en un doble enlace; y R^{N*}, cuando está presente y no implicado en un biradical, se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alquilo;

y sales básicas y sales por adición de ácido de los mismos.

La presente invención se refiere además a ácidos nucleicos (a partir de ahora LNA) con la Fórmula II general,



en donde el sustituyente B se selecciona de entre nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos;

X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R^{N*})-, y -C(R⁶R^{6*})-;

uno de los sustituyentes R², R^{2*}, R³ y R^{3*} es un grupo Q*;

cada uno de Q y Q* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, C₁₋₆-alquiltio, amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono- o di(C₁₋₆-alquil)amino, C₁₋₆-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquenoilino opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquenoiloxi opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinoilino opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinoiloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, Act-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-, Act-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es grupo de protección respectivamente para -OH, -SH, y -NH(R^H), Act es un grupo de activación respectivamente para -OH, -SH, y -NH(R^H), y R^H se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₆-alquilo;

R^{2*} y R^{4*} conjuntamente designan un biradical seleccionado de entre -O-, -S-, -N(R*)-, -(CR*R*)_{r+s+1}-, -(CR*R*)_r-S-(CR*R*)_s-, -(CR*R*)_r-N(R*)-(CR*R*)_s-, -O-(CR*R*)_{r+s}-O-, -S-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -S-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-S-, y -S-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-;

en donde cada R* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di (C₁₋₆-alquil) amino, C₁₋₆-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y dos R* adyacentes (no geminales) podrían designar conjuntamente un doble enlaces,

y cada uno de r y s es 0-3 a condición de que la suma r+s sea 1-4;

ES 2 242 291 T3

5 cada uno de los sustituyentes R^{1*} , R^2 , R^{2*} , R^3 , R^{4*} , R^5 , y R^{5*} , que no están implicados en Q, Q* o el biradical, se selecciona independientemente de entre hidrógeno, C_{1-12} -alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-12} -alqueno opcionalmente sustituido, C_{2-12} -alquino opcionalmente sustituido, hidroxilo, C_{1-12} -alcoxi, C_{2-12} -alquenoiloxi, carboxilo, C_{1-12} -alcoxicarbonilo, C_{1-12} -alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroarilo-
10 xi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C_{1-6} -alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C_{1-6} -alquil)-amino-carbonilo, amino- C_{1-6} -alquil-aminocarbonilo, mono- y di(C_{1-6} -alquil)amino- C_{1-6} -alquil-aminocarbonilo, C_{1-6} -alquil-carbonilamino, carbamido, C_{1-6} -alcanoiloxi, sulfono, C_{1-6} -alquilsulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, C_{1-6} -alquiltio, halógeno, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, en donde arilos y heteroarilos podrían estar opcionalmente
15 sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales juntos podrían designar un oxo, tioxo, imino, o un metileno opcionalmente sustituido, o juntos podrían formar un biradical spiro consistente en una cadena de alqueno de 1-5 átomos de carbono, la cual está opcionalmente interrumpida y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR^N)-, en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y C_{1-4} -alquilo, y en donde dos sustituyentes adyacentes (no geminales) podrían designar un enlace adicional que resulta en un doble enlace; y R^{N*}, cuando está presente y no implicado en un biradical, se selecciona de entre hidrógeno y C_{1-4} -alquilo;

y sales básicas y sales por adición de ácido de los mismos;

20 y a condición de que cualquier grupo químico (incluyendo cualquier nucleobase) que sea reactivo en las condiciones que predominan en la síntesis de oligonucleótidos, está opcionalmente protegido en su grupo funcional.

La presente invención también se refiere al uso de los análogos de nucleósidos (LNA) para la preparación de oligómeros, y al uso de los oligómeros así como de los ácidos nucleicos en diagnóstico, investigación en biología molecular, y en terapia.

25 **Breve descripción de las figuras**

Las Figuras 1A y 1B ilustran los nucleótidos conformacionalmente restringidos conocidos.

30 La Figura 2 ilustra los análogos de nucleótido/nucleósido de la invención.

La Figura 3 ilustra el rendimiento de los oligonucleótidos modificados con LNA en la captura específica para secuencia de amplicones de PCR.

35 Las Figuras 4A y 4B ilustran que los oligonucleótidos modificados con LNA son capaces de capturar su amplicón de PCR relacionado mediante invasión de la hebra.

40 La Figura 5 ilustra que los oligonucleótidos modificados con LNA, inmovilizados sobre una superficie sólida, funcionan eficientemente en la captura específica para secuencia de un amplicón de PCR.

La Figura 6 ilustra que los oligonucleótidos modificados con LNA pueden actuar como sustratos de la quinasa de polinucleótidos de T4.

45 La Figura 7 ilustra que los oligonucleótidos modificados con LNA pueden funcionar como cebadores para las polimerasas de ácido nucleico.

La Figura 8 ilustra que los oligonucleótidos modificados con LNA pueden funcionar como cebadores en los procesos de amplificación de la diana.

50 La Figura 9 ilustra que los oligonucleótidos modificados con LNA portadores de una antraquinona en 5' pueden inmovilizarse covalentemente sobre un soporte sólido mediante irradiación, y que el oligómero inmovilizado es eficiente en la captura de un oligo de ADN complementario.

55 La Figura 10 ilustra que la LNA-timidina-5'-trifosfato (LNA-TTP) puede actuar como un sustrato de la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT).

La Figura 11 ilustra la hibridación y detección de una matriz con diferentes 8-meros marcados con Cy3 y modificados con LNA.

60 Las Figuras 12 y 13 ilustran la hibridación y detección de desemparejamientos finales sobre una matriz con 8-meros marcados con Cy3 y modificados con LNA.

La Figura 14 ilustra el bloqueo mediante LNA de la antinocicepción inducida por [D-Ala2]deltorfina y el ensayo de retirada de la cola en agua templada con ratas conscientes.

65 Las Figuras 15A, 15B, y 15C ilustran la hibridación y detección de desemparejamientos finales en una matriz con AT y todos los 8-meros marcados con Cy3 y modificados con LNA.

Las Figuras 16 y 17 ilustran que puede suministrarse LNA a células de cáncer de mama MCF-7 humanas vivas.

Las Figuras 18 y 19 ilustran el uso de [$\alpha^{33}\text{P}$]ddNTP y polimerasa de ADN ThermoSequenase™ a plantillas de secuencias de ADN que contienen monómeros de LNA-T.

Las Figuras 20 y 21 ilustran que el fragmento Klenow de la polimerasa I de ADN, carente de exonucleasa, puede incorporar 5'-trifosfatos de LNA-adenosina, citosina, guanosina y uracilo en una hebra de ADN.

La Figura 22 ilustra la capacidad de la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) de añadir oligonucleótidos modificados con LNA.

Las Figuras 23A y 23B ilustran que los monómeros de LNA completamente mezclados pueden usarse para incrementar significativamente las prestaciones de oligos de ADN biotinilados en la captura de amplicones específica para secuencia.

Las Figuras 24 a 41 ilustran posibles rutas sintéticas hacia los monómeros de LNA de la invención.

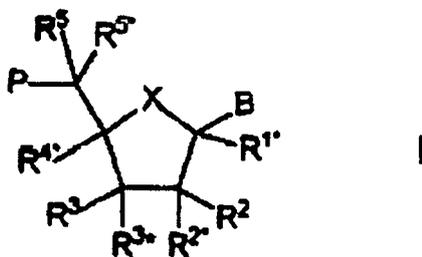
Descripción detallada de la invención

Cuando se usa en ésta, el término “LNA” (Análogo de Nucleósidos Bloqueados, “Locked Nucleoside Analogues”) se refiere a los ácidos nucleicos bi- y tricíclicos de la invención, tanto incorporados en el oligómero de la invención (Fórmula II general) o como especies químicas discretas (Fórmula II general). El término “LNA monomérico” se refiere específicamente a éste último caso.

Análogos de oligómeros y nucleósidos

Tal como se ha mencionado más arriba, la presente invención *i.a.* se refiere a nuevos oligómeros (oligonucleótidos) que comprenden uno o más ácidos nucleicos bi-, tri- o policíclicos (a partir de ahora denominados “LNA”). Se ha hallado que la incorporación de tales LNA en lugar de, o como un suplemento a, por ejemplo, nucleósidos conocidos, confiere propiedades interesantes y altamente útiles a un oligonucleótido. Los LNA bi- y tricíclicos, específicamente los bicíclicos, parecen ser especialmente interesantes en el ámbito de la presente invención.

Cada uno de los posibles LNA incorporados en un oligómero (oligonucleótido) tiene la Formula I general,



en donde, X se selecciona de entre -O- (la estructura furanosa), -S-, -N(R^{N*})-, -C(R⁶R^{6*})-, -O-C (R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-O-, -S-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-S-, -N(R^{N*})-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-N(R^{N*})-, y -C(R⁶R^{6*})-C(R⁷R^{7*})-, en donde R⁶, R^{6*}, R⁷, R^{7*} y R^{N*} son tal como se han definido más arriba. Por tanto, los LNA incorporados en el oligómero podrían comprender un anillo de 5 o 6 miembros como una parte esencial de la estructura bi-, tri- o policíclica. Se cree que los anillos de 5 miembros (X = -O-, -S-, -N(R^{N*})-, -C(R⁶R^{6*})-) son especialmente interesantes ya que son capaces de ocupar esencialmente las mismas conformaciones (aunque bloqueadas por la introducción de uno o más biradicales (ver más abajo)) que el anillo de furanosa nativo de un nucleósido que exista de forma natural. Entre los posibles anillos de 5 miembros, las situaciones en las que X designa -O-, -S-, y -N(R^{N*})- parecen especialmente interesantes, y la situación en la que X es -O- parece ser particularmente interesante.

El sustituyente B podría designar un grupo que, cuando el oligómero está complejado con ADN o ARN, es capaz de interactuar (por ejemplo, mediante puentes de hidrógeno o enlaces covalentes o interacción electrónica) con el ADN o ARN, especialmente con las nucleobases del ADN o ARN. Alternativamente, el sustituyente B podría designar un grupo que actúa como una marca o un informador, o el sustituyente B podría designar un grupo (por ejemplo, el hidrógeno) que se espera que tenga poca o ninguna interacción con el ADN o ARN. Por tanto, el sustituyente B se selecciona preferiblemente de entre hidrógeno, hidroxilo, C₁₋₄-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₄-alquilo opcionalmente sustituido, C₁₋₄-aciloxi opcionalmente sustituido, nucleobases, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos.

En el presente contexto, el término “nucleobase” incluye las nucleobases que existen de forma natural, así como las nucleobases que no existen de forma natural. Debería estar claro para la persona especialista en la técnica que varias nucleobases que previamente se habían considerado como “no existentes de forma natural” se han hallado subsiguientemente.

temente en la naturaleza. Por tanto, “nucleobase” incluyen no sólo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también los análogos heterocíclicos y los tautómeros de los mismos. Son ejemplos ilustrativos de las nucleobases, la adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N⁶-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N⁴,N⁴-etanocitosina, N⁶,N⁶-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C³-C⁶)-alquinilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las nucleobases que “no existen de forma natural” descritas en Benner *et al.*, patente estadounidense n° 5.432.272. El término “nucleobase” se pretende que abarque cada uno de estos ejemplos, así como los análogos y tautómeros de los mismos. Son nucleobases especialmente interesantes la adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, las cuales se consideran como las nucleobases que ocurren de forma natural, en relación a las aplicaciones terapéuticas y diagnósticas en humanos.

Cuando se usa en ésta, el término “intercalador del ADN” significa un grupo que puede intercalarse en una hélice, dúplex o tríplex de ADN o ARN. Son ejemplos de partes funcionales de intercaladores del ADN las acridinas, antracenos, quinonas, tales como la antraquinona, indol, quinolina, isoquinolina, dihidroquinonas, antraciclina, tetraciclina, azul de metileno, antraciclina, psoralenos, coumarinos, haluros de etidio, dinemicina, complejos de metales, tales como el 1,10-fenantrolina-cobre, tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio-cobalto-enodínicos tales como la calcheamicina, porfirinas, distamicina, netropcina, viologeno, daunomicina. Son ejemplos especialmente interesantes las acridinas, quinona tales como la antraquinona, el azul de metileno, los psoralenos, los coumarinos, y los haluros de etidio.

En el presente contexto, el término “grupos fotoquímicamente activos” abarca los compuestos que son capaces de experimentar reacciones químicas a partir de su irradiación con luz. Son ejemplos ilustrativos de grupos funcionales en ésta las quinonas, especialmente la 6-metil-1,4-naftoquinona, antraquinonas, naftoquinonas, y la 1,4-dimetil-antraquinona, diazirinas, azidas aromáticas, benzofenones, psoralenos, los compuestos diazo, y los compuestos diazirino.

En el presente contexto, “grupo termoquímicamente activo” se define como un grupo funcional que es capaz de experimentar la formación inducida termoquímicamente de enlace covalente con otros grupos. Son ejemplos ilustrativos de grupos reactivos químicamente de partes funcionales de los ácidos carboxílicos, los ésteres de ácidos carboxílicos tales como los ésteres activados, los haluros de ácidos carboxílicos, tales como el fluoruro de ácidos, los cloruros de ácidos, los bromuros de ácidos, y los yoduros de ácidos, las azidas de ácidos carboxílicos, las hidrazidas de ácidos carboxílicos, los ácidos sulfónicos, los ésteres de ácidos sulfónicos, los haluros de ácidos sulfónicos, las semicarbazidas, la tiosemicarbazidas, los aldehídos, las cetonas, los alcoholes primarios, los alcoholes secundarios, los alcoholes terciarios, los fenoles, los haluros de alquilo, los tioles, los disulfuros, las aminas primarias, las aminas secundarias, las aminas terciarias, las hidrazinas, los epóxidos, las maleimidas, y los derivados del ácido borónico.

En el presente contexto, el término “grupo quelante” significa una molécula que contiene más de un sitio de unión y que frecuentemente se une a otra molécula, átomo o ion a través de más de un sitio de unión al mismo tiempo. Son ejemplos de grupos quelantes de partes funcionales el ácido iminodiacético, el ácido nitrilotriacético, el ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), el ácido aminofosfónico, etc.

En el presente contexto, el término “grupo informador” significa un grupo que es detectable bien por sí mismo o como parte de una serie de detección. Son ejemplos de partes funcionales de grupos informadores la biotina, digoxigenina, los grupos fluorescentes (grupos que son capaces de absorber radiación electromagnética, por ejemplo, luz o rayos X, de una determinada longitud de onda, y subsiguientemente reemitir la energía absorbida como radiación de mayor longitud de onda; son ejemplos ilustrativos el dansil (5-dimetilamino)-1-naftalensulfonilo), DOXYL (N-oxil-4,4-dimetiloxazolidina), PROXYL (N-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina), TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), dinitrofenilo, acridinas, coumarinos, Cy3 y Cy5 (marcas registradas de Biological Detection Systems, Inc.), eritrosina, ácido coumárico, umbeliferona, el rojo de texas, la rodamina, la tetrametilrodamina, Rox, 7-nitrobenzo-2-oxa-1-diazol (NBD), pireno, la fluoresceína, el europio, el rutenio, el samario, y otros metales de tierras raras, las marcas radioisotópicas, las marcas quimioluminiscentes (marcas que son detectables a través de la emisión de luz durante una reacción química), las marcas de espín (un radical libre, por ejemplo, los nitróxidos orgánicos sustituidos) u otras sondas paramagnéticas (por ejemplo Cu²⁺, Mg²⁺) unidas a una molécula biológica que son detectables mediante el uso la espectroscopia de resonancia de espín electrónico), enzimas (tales como las peroxidasas, las fosfatasas alcalinas, las β -galactosidasas y las oxidasas de glicol), los antígenos, anticuerpos, haptenos (grupos que son capaces de combinarse con un anticuerpo, pero que no pueden iniciar una respuesta inmune por sí mismos, tales como las hormonas de péptidos y esteroides, sistemas portadores para la penetración de la membrana celular tales como: residuos de ácidos grasos, porciones esteroideas (colesteril), vitamina A, vitamina D, vitamina E, péptidos del ácido fólico para receptores específicos, grupos para mediar en la endocitosis, el factor de crecimiento epitelial (EGF), braquidina, y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Son ejemplos especialmente interesantes la biotina, la fluoresceína, el rojo de Texas, la rodamina, el dinitrofenil digoxigenina, el rutenio, el europio, Cy5, Cy3, etc.

En el presente contexto, “ligando” significa algo que une. Los ligandos pueden comprender grupos funcionales tales como: grupos aromáticos (tales como benceno, piridina, naftaleno, antraceno, y fenantreno), grupos heteroaromáticos (tales como el tiofeno, furano, tetrahidrofurano, piridina, dioxano y pirimidina), los ácidos carboxílicos, los ésteres de ácidos carboxílicos, los haluros de ácidos carboxílicos, las azidas de ácidos carboxílicos, las hidrazidas de ácidos carboxílicos, los ácidos sulfónicos, los ésteres de ácidos sulfónicos, los haluros de ácidos sulfónicos, las semicarbazidas, las tiosemicarbazidas, los aldehídos, las cetonas, los alcoholes primarios, los alcoholes secundarios, los alcoholes terciarios, los fenoles, los haluros de alquilo, los tioles, los disulfuros, las aminas primarias, las aminas se-

cundarias, las aminas terciarias, las hidrazinas, los epóxidos, las maleimidias, los grupos C₁-C₂₀-alquilo opcionalmente interrumpidos o terminados con uno o más heteroátomos, tales como los átomos de oxígeno, los átomos de nitrógeno, y/o los átomos de azufre, que opcionalmente contienen hidrocarburos aromáticos o mono/poliinsaturados, polioxietilenos tales como el polietilenglicol, las oligo/poliamidas, tales como la poli-β-alanina, poliglicina, polilisina, péptidos, oligo/polisacáridos, oligo/fosfatos, toxinas, antibióticos, veneno de células, y esteroides, y también “ligandos de afinidad”, es decir, grupos funcionales o biomoléculas que tienen una afinidad específica por sitios sobre determinadas proteínas, anticuerpos, poli- y oligosacáridos, y otras biomoléculas.

Para la persona especialista en la técnica estará claro que los ejemplos específicos antes mencionados como intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupo informadores, y ligandos, corresponden a la parte “activa/funcional” de los grupos en cuestión. Para la persona formada en la técnica, está adicionalmente claro que los intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupo informadores, y ligandos, se representan típicamente en la forma M-K-, en donde M es la parte “activa/funcional” del grupo en cuestión, y en donde K es un espaciador a través del cual se une la parte “activa/funcional” al anillo de 5 o 6 miembros. Por tanto, debería entenderse que el grupo B, en los casos en que B se selecciona respectivamente de entre los intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, tiene la forma M-K-, en donde M es la parte “funcional/activa” del intercaladores del ADN, grupo fotoquímicamente activo, grupo termoquímicamente activo, grupo quelante, grupos informadores, y ligando, y en donde K es un espaciador opcional que comprende 1-50 átomos, preferiblemente 1-30 átomos, en particular 1-15 átomos, entre el anillo de 5 ó 6 miembros y la parte “activa/funcional”.

En el presente contexto, el término “espaciador” significa un grupo que crea una distancia y no es termoquímica y fotoquímicamente activo, y que se usa para unir dos o más porciones diferentes de los tipos definidos más arriba. Los espaciadores se seleccionan en base a un variedad de características, incluyendo su hidrofobicidad, hidrofiliidad, flexibilidad molecular y longitud (por ejemplo, ver Hermanson *et. al.*, “Immobilized Affinity Ligand Techniques”, Academic Press, San Diego, California (1992), pp. 137-ff). Generalmente, la longitud de los espaciadores es inferior a 100 angstroms, en algunas aplicaciones preferiblemente menos de 100 angstroms. Por tanto, el espaciador comprende una cadena de átomos de carbono, opcionalmente interrumpida o terminada con uno o más heteroátomos, tales como los átomos del oxígeno, átomos del nitrógeno, y/o átomos de azufre. Por tanto, el espaciador K podría comprender una o más funcionalidades amida, éster, amino, éter, y/o tioéter, y opcionalmente hidrocarburos aromáticos o mono/poliinsaturados, polioxietilenos tales como el polietilenglicol, oligo/poliamidas tales como la poli-β-alanina, poliglicina, polilisina, y péptidos en general, oligosacáridos, oligo/fosfatos. Más aún, el espaciador podría consistir en unidades del mismo combinadas. La longitud del espaciador podría variar, tomando en consideración la ubicación y orientación espacial deseadas o necesarias de la parte “activa/funcional” del grupo en cuestión en relación al anillo de 5 ó 6 miembros. En realizaciones particularmente interesantes, el espaciador incluye un grupo cortable químicamente. Los ejemplos de tales grupos químicamente cortables incluyen los grupos disulfuro, que pueden cortarse químicamente en condiciones reductoras, los fragmentos de péptidos cortables mediante peptidasas, etc.

En una realización de la presente invención, K designa un enlace sencillo, de forma que la parte “funcional/activa” del grupo en cuestión está unida directamente al anillo de 5 o 6 miembros.

En una realización preferida, el sustituyente B es las Formulas I y II generales se selecciona preferiblemente de entre las nucleobases, en particular, de entre adenina, guanina, timina, citosina y uracilo.

En los oligómeros de la presente invención (Fórmula I), P designa la posición del radical para un enlace internucleósido con un monómero sucesivo, o un grupo 5'-terminal. La primera posibilidad se aplica cuando el LNA en cuestión no es el “monómero” 5'-terminal, mientras que la última posibilidad se aplica cuando el LNA en cuestión es el monómero 5'-terminal. Debería entenderse (lo que también estará claro a partir de la definición más adelante de enlace internucleósidos y grupo 5'-terminal) que un enlace internucleósidos o grupo 5'-terminal debería incluir el sustituyente R⁵ (o, igualmente aplicable: el sustituyente R^{5*}) formando de ese modo un doble enlace con el grupo P. (5'-terminal se refiere a la posición correspondiente al átomo de carbono 5' de un grupo ribosa en un nucleósido).

Por otra parte, un enlace internucleósido con un monómero precedente o un grupo 3'-terminal (P*) podría originarse a partir de las posiciones definidas por uno de los sustituyentes R², R^{2*}, R³, y R^{3*}, preferiblemente a partir de las posiciones definidas por uno de los sustituyentes R³ y R^{3*}. Análogamente, la primera posibilidad se aplica cuando el LNA en cuestión no es el “monómero” 3'-terminal, mientras que la última posibilidad se aplica cuando el LNA en cuestión es el “monómero” 3'-terminal. (3'-terminal se refiere a la posición correspondiente al átomo de carbono 3' de un grupo ribosa en un nucleósido).

En el presente contexto, el término “monómero” se refiere a nucleósidos que ocurren de forma natural, a nucleósidos que no ocurren de forma natural, PNA, etc., así como a LNA. Por tanto, el término “monómero sucesivo” se refiere al monómero vecino en la dirección 5'-terminal y el “monómero precedente” se refiere al monómero vecino en la dirección 3'-terminal. Tales monómeros sucesivos y precedentes, vistos desde la posición de un monómero LNA; podrían ser nucleósidos que ocurren de forma natural o nucleósido que no ocurren de forma natural, o incluso monómeros de LNA adicionales.

ES 2 242 291 T3

En consecuencia, en el presente contexto (como puede derivarse de las definiciones anteriores), el término oligómero significa un oligonucleótido modificado por la incorporación de uno o más LNA.

La parte crucial de la presente invención es la presencia de uno o más anillos fusionados al anillo de 5 ó 6 miembros ilustrado con la Fórmula I general definida por los sustituyentes R^{2*} y R^{4*} tal como se establece en la reivindicación 1.

Los LNA incorporados en los oligómeros comprenden sólo un biradical constituido por un par de (dos) sustituyentes no geminales formados entre R^{2*} y R^{4*} .

En el presente contexto, es decir, en la presente descripción y reivindicaciones, la orientación de los biradicales es tal que el lado izquierdo representa el sustituyente con el número más bajo y el lado derecho representa el sustituyente con el número más elevado, por tanto, cuando R^3 y R^5 juntos designan un biradical “-O-CH₂-”, se entiende que el átomo de oxígeno representa R^3 , por tanto, el átomo de oxígeno está, por ejemplo, unido a la posición de R^3 , y el grupo metileno representa R^5 .

Son oligómeros particularmente interesantes aquéllos en los que se aplica uno de los siguientes criterios para al menos un LNA en un oligómero: R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de entre -O-, -S-, -N(R^*)-, -(CR* R^*)_{r+s+1}-, -(CR* R^*)_r-S-(CR* R^*)_s-, -(CR* R^*)_r-N(R^*)-(CR* R^*)_s-, -O-(CR* R^*)_{r+s}-O-, -S-(CR* R^*)_{r+s}-O-, -O-(CR* R^*)_{r+s}-S-, -N(R^*)-(CR* R^*)_{r+s}-O-, -O-(CR* R^*)_{r+s}-N(R^*)-, -S-(CR* R^*)_{r+s}-S-, -N(R^*)-(CR* R^*)_{r+s}-N(R^*)-, -N(R^*)-(CR* R^*)_{r+s}-S-, y -S-(CR* R^*)_{r+s}-N(R^*)-; en donde cada uno de r y s es 0-3 a condición de que la suma $r+s$ es 1-4, y en donde R^H designa hidrógeno o C₁₋₄-alquilo.

Se prefiere aún más que un R^* se seleccione de entre hidrógeno, hidroxilo, C₁₋₆-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y cualquier sustituyentes R^* restante es hidrógeno.

En una realización preferida, un grupo R^* en el biradical de al menos un LNA se selecciona de entre los intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos (en donde los últimos grupos podrían incluir un espaciador tal como se definió para el sustituyente B).

Con respecto a los sustituyentes R^{1*} , R^2 , R^{2*} , R^3 , R^{3*} , R^{4*} , R^5 , R^{5*} , R^6 y R^{6*} , R^7 y R^{7*} , que están presentes pero no implicados en el(los) biradical(es), estos se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, C₁₋₁₂-alquilo opcionalmente sustituido, C₁₋₁₂-alquenilo opcionalmente sustituido, C₁₋₁₂-alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, C₁₋₁₂-alcoxi, C₁₋₁₂-alqueniloxi, carboxilo, C₁₋₁₂-alcoxicarbonilo, C₁₋₁₂-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)-amino-carbonilo, amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, C₁₋₆-alquil-carbonilamino, carbamido, C₁₋₆-alcanoiloxi, sulfono, C₁₋₆-alquilsulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos (en donde los últimos grupos podrían incluir un espaciador tal como se definió para el sustituyente B), en donde arilos y heteroarilos podrían estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales juntos podrían designar oxo, tioxo, imino, o metileno opcionalmente sustituido, o juntos podrían formar un biradical spiro consistente en una cadena alquilenos de 1-5 átomos de carbono, la cual está opcionalmente interrumpida y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR^N)- en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alquilo, y en donde dos sustituyentes adyacentes (no geminales) podrían designar un enlace adicional que resultara en un doble enlace; y R^{N*} , cuando está presente y no implicado en un biradical, se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alquilo.

Preferiblemente, cada uno de los sustituyentes R^{1*} , R^2 , R^{2*} , R^3 , R^{3*} , R^{4*} , R^5 , R^{5*} , R^6 , R^{6*} , R^7 , y R^{7*} de los LNA, que están presentes y no implicados en P, P* o el(los) biradical(es), se selecciona independientemente de entre hidrógeno, C₁₋₆-alkyl opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquenilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, C₁₋₆-alcoxi, C₂₋₆-alqueniloxi, carboxilo, C₁₋₆-alcoxicarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, formilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alkyl)amino, carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alkyl)-amino-carbonilo, C₁₋₆-alquil-carbonilamino, carbamido, azido, C₁₋₆-alcanoiloxi, sulfono, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y halógenos, en donde dos sustituyentes geminales juntos podrían designar oxo, y en donde R^{N*} , cuando está presente y no implicado en un biradical, se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alkyl.

En una realización preferida de la presente invención, X se selecciona de entre -O-, -S-, y -NR^{N*}-, en particular -O-, y cada uno de los sustituyentes R^{1*} , R^2 , R^{2*} , R^3 , R^{3*} , R^{4*} , R^5 , R^{5*} , R^6 , R^{6*} , R^7 , y R^{7*} de los LNA, que están presentes y no implicados en P, P* o el(los) biradical(es), designa hidrógeno.

En una realización de la presente invención aún más preferida, R^{2*} y R^{4*} de un LNA incorporado en un oligómero designan juntos un biradical. Preferiblemente, X es O, R^2 se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, y C₁₋₆-alcoxi y opcionalmente sustituido, y R^{1*} , R^3 , R^5 , y R^{5*} designan hidrógeno, y, más específicamente, el biradical se selecciona de entre -O-, -(CH₂)₀₋₁-(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₀₋₁-S-(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₀₋₁-N(R^N)-(CH₂)₁₋₃-, y -(CH₂)₂₋₄-, en particular de entre -O-CH₂-, -S-CH₂-, y -NR^H-CH₂-. Generalmente, con el debido respeto a los resultados obtenidos hasta la fecha, se

ES 2 242 291 T3

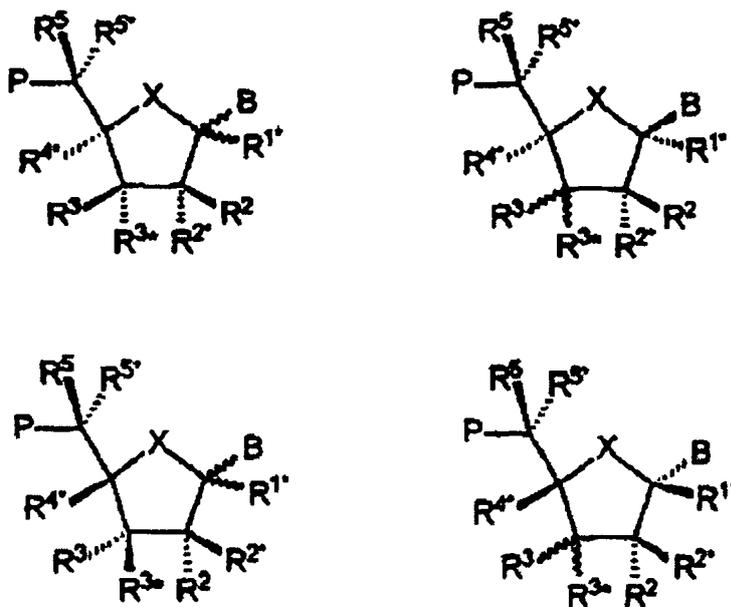
prefiere que el biradical que constituyen R^{2*} y R^{4*} forme un puente de dos átomos de carbono, es decir, que el biradical forme un anillo de cinco miembros con el anillo de furanosa ($X=O$).

En estas realizaciones, es aún más preferido que al menos un LNA incorporado en un oligómero incluya una nucleobase (sustituyente B) seleccionado de entre adenina y guanina. En particular, se prefiere que un oligómero que tenga un LNA incorporado en sí, incluya tanto al menos una nucleobase seleccionada de entre timina, uracilo y citosina, y al menos una nucleobase seleccionada de entre adenina y guanina. Para los monómeros de LNA, es especialmente preferido que la nucleobase se seleccione de entre adenina y guanina.

Para estas interesantes realizaciones, también se prefiere que el(los) LNA(s) tengan la Fórmula Ia general (ver más abajo).

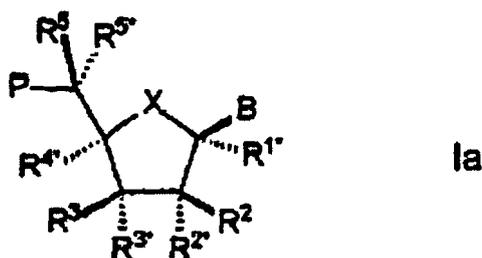
Dentro de una variante de estas interesantes realizaciones, todos los monómeros de un oligonucleótido son monómeros de LNA.

Tal como será evidente a partir de la Fórmula I general (los LNA en un oligómero) (y la Fórmula II general (LNA monomérico), ver más abajo) y de las definiciones asociadas con las mismas, podría haber uno o varios átomos de carbono asimétricos presentes en los oligómeros (y en los LNA monoméricos) dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes y de los biradicales posibles, ver más abajo. Los oligómeros preparados de acuerdo con el procedimiento de la invención, así como los oligómeros por sí mismos, se pretende que incluyan todos los estereoisómeros que surgen de la presencia de cualquiera y todos los isómeros de los fragmentos de monómero individual, así como de las mezclas de los mismos, incluyendo las mezclas racémicas. Sin embargo, cuando se considera el anillo de 5 ó 6 miembros, se cree que ciertas configuraciones estereoquímicas podrían ser especialmente interesantes, por ejemplo, las siguientes,



en donde las líneas onduladas representan la posibilidad de que ambos diastereoisómeros surjan a partir del intercambio de los dos sustituyentes en cuestión.

Una representación estereoisomérica especialmente interesante es el caso en donde los LNA tienen la siguiente Fórmula Ia,



ES 2 242 291 T3

Es también interesante, como un aspecto separado de la presente invención, es la variante de la Fórmula Ia en donde B está en la “configuración- α ”.

En estos casos, así como generalmente, R^{3*} preferiblemente designa P*.

5

Los oligómeros acordes con la invención típicamente comprenden 1-10000 LNA de la Fórmula I general (o de la más detallada Fórmula Ia general) y 0-10000 nucleósidos seleccionados de entre nucleósidos que ocurren naturalmente y análogos de nucleósidos. La suma del número de nucleósidos y del número de LNA es al menos 2, preferiblemente al menos 3, en particular al menos 5, especialmente al menos 7, tal como en el rango de 2-15000, preferiblemente en el rango de 2-100, tal como 3-100, en particular en el rango de 2-50, tal como 3-50 ó 5-50 ó 7-50.

10

Preferiblemente, al menos un LNA comprende una nucleobase como el sustituyente B.

15

En el presente contexto, el término “nucleósido” indica un glicósido de una base heterocíclica. El término “nucleósido” se usa ampliamente, para incluir los nucleósidos que ocurren de forma no natural, los nucleósidos que ocurren naturalmente, así como otros análogos de nucleósidos. Son ejemplos ilustrativos de nucleósidos los ribonucleósidos que comprenden un grupo ribosa así como los desoxiribonucleósidos que comprenden un grupo desoxiribosa. En relación a las bases de tales nucleósidos, debería entenderse que ésta podría ser cualquiera de las bases que ocurren naturalmente, por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina y uracilo, así como cualquier variante modificada de las mismas o cualesquiera bases no naturales posibles.

20

Cuando se consideran las definiciones y los nucleósidos conocidos (que ocurren naturalmente y ocurren no naturalmente) y los análogos de nucleósidos (incluyendo los análogos bi- y tricíclicos conocidos), está claro que un oligómero podría comprender uno o más LNA (los cuales podrían ser idénticos o diferentes, tanto con respecto a la selección de sustituyente como con respecto a la selección de biradical), y uno o más nucleósidos y/o análogos nucleósidos. En el presente contexto “oligonucleótido” significa una cadena sucesiva de nucleósidos conectados con enlaces internucleósidos, no obstante, debería entenderse que una nucleobase en una o más unidades de nucleótido (monómeros) en un oligómero (oligonucleótido) podría haberse modificado con un sustituyente B tal como se definió más arriba.

25

Los oligómeros podrían ser lineales, ramificados o cíclicos. En el caso de un oligómero ramificado, los puntos de ramificación podrían estar ubicados en un nucleósido, en un enlace internucleósido o, en una realización intrigante, en un LNA. Se cree que en el último caso, los sustituyentes R², R^{2*}, R³, y R^{3*} podrían designar dos grupos P*, designando cada uno un enlace internucleósido a un monómero precedente, en particular, uno de R² y R^{2*} designa P*, y uno de R³ y R^{3*} designa un P* adicional.

30

Tal como se ha mencionado más arriba, los LNA de un oligómero están conectados con otros monómeros a través de un enlace internucleósido. En el presente contexto, el término “enlace internucleósido” significa un enlace consistente de 2 a 4, preferiblemente 3, grupos/átomos seleccionados de entre -CH₂-, -O-, -S-, -NR^H-, >C=O, >C=NR^H, >C=S, -Si(R^H)₂-, -SO-, -S(O)₂-, -P(O)₂-, -PO(BH₃)-, -P(O,S)-, -P(S)₂-, -PO(R^H)-, -PO(OCH₃)-, y -PO(NHR^H)-, en donde R^H se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alkyl, y R^H se selecciona de entre C₁₋₆-alkyl y phenyl. Son ejemplos ilustrativos de tales enlaces internucleósidos -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CO-CH₂-, -CH₂-CHOH-CH₂-, -O-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH= (incluyendo R⁵ cuando se usa como un enlace a un monómero sucesivo), -CH₂-CH₂-O-, -NR^H-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NR^H-, -CH₂-NR^H-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -NR^H-CS-NR^H-, -NR^H-C(=NR^H)-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-CH₂-O-, -O-CH₂-CO-O-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CH=N-O-, -CH₂-NR^H-O-, -CH₂-O-N= (incluyendo R⁵ cuando se usa como enlace a un monómero sucesivo), -CH₂-O-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-O-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-NR^H-CH₂-, -O-NR^H-, -O-CH₂-S-, -S-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-S-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH= (incluyendo R⁵ cuando se usa como enlace a un monómero sucesivo), -S-CH₂-CH₂-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-S-CH₂-, -CH₂-SO-CH₂-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -O-SO-O-, -O-S(O)₂-O-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-NR^H-, -NR^H-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -O-P(S)₂-S-, -S-P(O)₂-S-, -S-P(O,S)-S-, -S-P(S)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, -O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(OCH₂CH₃)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^N)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -CH₂-P(O)₂-O-, -O-P(O)₂-CH₂-, y -O-Si(R^H)₂-O-; entre los cuales -CH₂-CO-NR^H-, -CH₂-NR^H-O-, -S-CH₂-O-, -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -O-PO(R^H)-O-, -O-PO(CH₃)-O-, y -O-PO(NHR^N)-O-, en donde R^H se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alkyl, y R^H se selecciona de entre C₁₋₆-alkyl y phenyl, son especialmente preferidos. En Mesmaeker *et. al.*, *Current Opinion in Structural Biology* 5:343-355 (1995) se proporcionan ejemplos ilustrativos adicionales. El lado izquierdo del enlace internucleósido está unido al anillo de 5 ó 6 miembros como sustituyente P*, mientras que el lado derecho está unido a la posición 5' de un monómero precedente.

35

A partir de lo anterior está también claro que el grupo P podría designar también un grupo 5'-terminal en el caso en que el LNA en cuestión es el monómero 5'-terminal. Son ejemplos de tales grupos 5'-terminales el hidrógeno, hydroxy, C₁₋₆-alkyl opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilcarboniloxi opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, y -W-A', en donde W se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R^H)- en donde R^H se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₆-alkyl, y en donde A' se selecciona de entre los queladores del ADN, los grupos fotoquímicamente activos, los grupos termoquímicamente activos, los grupos quelantes, los grupos informadores, y los ligandos (en donde los últimos grupos podrían incluir un espaciador tal como se definió para el sustituyente B).

40

45

50

55

60

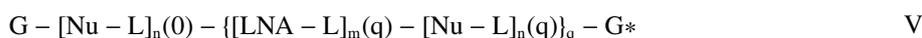
ES 2 242 291 T3

En la presente descripción y reivindicaciones, los términos “monofosfato”, “difosfato” y “trifosfato” significan grupos con la fórmula: $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}^-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}^-$, y $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}^-$, respectivamente.

En una realización particularmente interesante, el grupo P designa grupos 5'-terminales seleccionados de entre monofosfato, difosfato y trifosfato. Especialmente, la variante trifosfato es interesante como sustrato.

Análogamente, el grupo P* podría designar un grupo 3'-terminal en el caso en que el LNA en cuestión es el monómero 3'-terminal. Son ejemplos de tales grupos 3'-terminales el hidrógeno, hidroxilo, C_{1-6} -alcoxi opcionalmente sustituido, C_{1-6} -alquilcarboniloxi opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, y -W-A', en donde W se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R^H)- en donde R^H se selecciona de entre hidrógeno y C_{1-6} -alkyl, y en donde A' se selecciona de entre los intercaladores del ADN, los grupos fotoquímicamente activos, los grupos termoquímicamente activos, los grupos quelantes, los grupos informadores, y los ligandos (en donde los últimos grupos podrían incluir un espaciador tal como se definió para el sustituyente B).

En una realización preferida de la presente invención, el oligómero tiene la siguiente Fórmula V:



en donde,

q es 1-50;

cada uno de n(0), ..., n(q) es independientemente 0-10000;

cada uno de m(1), ..., m(q) es independientemente 1-10000;

a condición de que la suma de n(0), ..., n(q) y m(1), ..., m(q) sea 2-15000;

G designa un grupo 5'-terminal;

cada Nu designa independientemente un nucleósido seleccionado de entre los nucleósidos que ocurren naturalmente y los análogos de nucleósido;

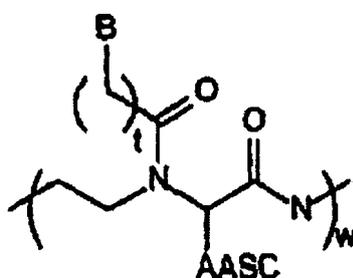
cada LNA designa independientemente un análogo de nucleósido;

cada L designa independientemente un enlace internucleósido entre dos grupos seleccionados de entre Nu y LNA, o L junto con G* designa un grupo 3'-terminal; y

cada LNA-L designa independientemente un análogo de nucleósido con la Fórmula I general tal como se definió más arriba, o preferiblemente con la Fórmula Ia general tal como se definió más arriba.

Dentro de esta realización, así como de forma general, la presente invención proporciona la intrigante posibilidad de incluir LNA con diferentes nucleobases, en particular, tanto nucleobases seleccionadas de entre timina, citosina y uracilo, y nucleobases seleccionadas de entre adenina y guanina.

En otra realización de la presente invención, el oligómero comprende además un PNA monómero o segmento de oligómero con la fórmula,



en donde B es tal como se definió más arriba para la Fórmula I, AASC designa hidrógeno o una cadena lateral de aminoácido, t es 1-5, y w es 1-50.

En el presente contexto, el término “cadena lateral de aminoácido” significa un grupo unido al átomo α de un α -aminoácido, es decir, correspondiente al α -aminoácido en cuestión sin la porción glicina, preferiblemente un α -aminoácido que ocurre naturalmente o puede conseguirse fácilmente. Son ejemplos ilustrativos, el hidrógeno (la propia glicina), deuterio (glicina deuterada), metilo (alanina), cianometilo (β -ciano-alanina), etilo, 1-propilo (norvali-

ES 2 242 291 T3

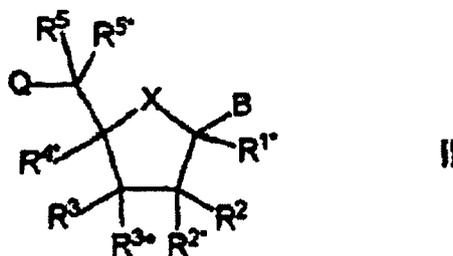
na), 2-propilo (valina), 2-metil-1-propilo (leucina), 2-hidroxi-2-metil-1-propilo (β -hidroxi-leucina), 1-butilo (norleucina), 2-butilo (isoleucina), metiltioetilo (metionina), bencilo (fenilalanina), p-amino-bencilo (p-amino-fenilalanina), p-iodo-bencilo (p-iodo-fenilalanina), p-fluoro-bencilo (p-fluoro-fenilalanina), p-bromo-bencilo (p-bromo-fenilalanina), p-cloro-bencilo (p-cloro-fenilalanina), p-nitro-bencilo (p-nitro-fenilalanina), 3-piridilmetilo (β -(3-piridil)-alanina), 3,5-diiodo-4-hidroxi-bencilo (3,5-diiodo-tirosina), 3,5-dibromo-4-hidroxi-bencilo (3,5-dibromo-tirosina), 3,5-dicloro-4-hidroxi-bencilo (3,5-dicloro-tirosina), 3,5-difluoro-4-hidroxi-bencilo (3,5-difluoro-tirosina), 4-metoxi-bencilo (O-metil-tirosina), 2-naftilmetilo (β -(2-naftil)-alanina), 1-naftilmetilo (β -(1-naftil)-alanina), 3-indolilmetilo (triptófano), hidroximetilo (serina), 1-hidroxietilo (treonina), mercaptometilo (cisteína), 2-mercapto-2-propilo (penicilamina), 4-hidroxibencilo (tirosina), amino-carbonilmetilo (asparagina), 2-aminocarboniletilo (glutamina), carboximetilo (ácido aspartico), 2-carboxietilo (ácido glutámico), aminometilo (ácido α,β -diaminopropiónico), 2-aminoetilo (ácido α,γ -diaminobutírico), 3-amino-propilo (ornitina), 4-amino-1-butilo (lisina), 3-guanidino-1-propilo (arginina), y 4-imidazolilmetilo (histidina).

El PNA monomérico o segmento de oligómero podría incorporarse en un oligómero tal como se describe en EP-0.672.677-A2.

Los oligómeros de la presente invención se pretende que también abarquen los oligómeros quiméricos. "Oligómeros quiméricos" significa dos o más oligómeros con monómeros de diferente origen unidos, bien directamente o a través de un espaciador. Son ejemplos ilustrativos de tales oligómero que pueden combinarse los péptidos, los PNA-oligómeros, los oligómeros que contienen LNA, y los oligómeros de oligonucleótidos.

Aparte de los oligómeros definidos más arriba, la presente invención proporciona también LNA monoméricos útiles, por ejemplo, en la preparación de oligómeros, como sustratos para, por ejemplo, las polimerasas de ácidos nucleicos, las quinasas de polinucleótidos, las transferasas terminales, y como agentes terapéuticos, ver más abajo. Los LNA monoméricos corresponden en la estructura global (especialmente respecto a los posibles biradicales) a los LNA definidos como constituyentes en los oligómeros, sin embargo, con respecto a los grupo P y P*, los LNA monoméricos difieren ligeramente, tal como se explicará más abajo. Más aún, los LNA monoméricos podrían comprender grupos protectores del grupo funcional, especialmente en los casos en que los LNA monoméricos han de incorporarse en oligómeros mediante síntesis química.

Un subgrupo interesante de los posibles LNA monoméricos comprende los ácidos nucleicos bicíclicos (LNA) con la Fórmula II general,



en donde el sustituyente B se selecciona de entre las nucleobases, los intercaladores del ADN, los grupos fotoquímicamente activos, los grupos termoquímicamente activos, los grupos quelantes, los grupos informadores, y los ligandos; X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R^{N*})-, y -C(R⁶R^{6*})-, preferiblemente de entre -O-, -S-, y -N(R^{N*})-; uno de los sustituyentes R², R^{2*}, R³, y R^{3*} es un grupo Q*;

cada uno de Q y Q* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, cyano, nitro, hydroxy, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, C₁₋₆-alquiltio, amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono- o di(C₁₋₆-alquil) amino, C₁₋₆-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alkyl opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquenilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxi opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, C₂₋₈-alquiniloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, Act-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-, Act-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo protector para -OH, -SH, y -NH(R^H)-, respectivamente, Act es un grupo de activación para -OH, -SH, y -NH(R^H)-, respectivamente, y RH se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₆-alquilo;

R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de entre -O-, -S-, -N(R^{*})-, -(CR^{*}R^{*})_{r+s+1}-, -(CR^{*}R^{*})_r-O-(CR^{*}R^{*})_s-, -(CR^{*}R^{*})_r-S-(CR^{*}R^{*})_s-, -(CR^{*}R^{*})_r-N(R^{*})-(CR^{*}R^{*})_s-, -O-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-O-, -S-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-O-, -O-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-S-, -N(R^{*})-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-O-, -O-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-N(R^{*})-, -S-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-S-, -N(R^{*})-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-N(R^{*})-, -N(R^{*})-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-S-, y -S-(CR^{*}R^{*})_{r+s}-N(R^{*})-;

R² en donde R* es tal como se definió para los oligómeros; y cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R^{2*}, R³, R^{4*}, R⁵, y R^{5*}, que no están implicados en Q, Q* o los biradicales, son como se definieron más arriba para los oligómeros.

Los LNA monoméricos también comprenden las sales básicas y las sales por adición de ácido de los mismos. Más aún, debería entenderse que cualquier grupo químico (incluyendo cualquier nucleobase), que es reactivo en las condiciones que predominan en la síntesis química de oligonucleótido, esta opcionalmente protegido en su grupo funcional tal como se conoce en la técnica. Esto significa que los grupos tales como los grupos hidroxilo, amino, carboxilo, sulfono, y mercapto, así como las nucleobases, de un LNA monomérico son opcionalmente grupos funcionales protegidos. La protección (y desprotección) se realiza mediante procedimientos conocidos por las personas especialistas en la técnica (ver, por ejemplo, Greene, T.W. y Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª edición, John Wiley, N.Y. (1991), y M.J. Gait, "Oligonucleotide Synthesis", IRL Press, 1984).

Son ejemplos ilustrativos de grupos protectores de hidroxilo los tritilo opcionalmente sustituidos, tales como el 4,4'-dimetoxitritilo (DMT), el 4-monometoxitritilo (MMT), y tritilo, 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo) opcionalmente sustituido, etoxicarbonilo opcionalmente sustituido, p-fenilazofeniloxicarbonilo, tetrahidropirano (thp), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), metoxitetrahidropirano (mthp), sililoxilos tales como el trimetilsililo (TMS), triisopropilsililo (TIPS), tert-butildimetilsililo (TBDMS), trietilsililo, y fenildimetilsililo, benciloxicarbonilo o benciloxicarbonilo éteres sustituidos, tales como el 2-bromo benciloxicarbonilo, tert-butiléteres, alquiléteres tales como el metiléter, acetales (incluyendo dos grupos hidroxilo), aciloxis tales como el acetilo o acetilos sustituidos con halógenos, por ejemplo, cloroacetilo o fluoroacetilo, isobutirilo, pivaloilo, benzoilo y benzoilos sustituidos, metoximetilo (MOM), benciléteres o benciléteres sustituidos, tales como el 2,6-diclorobencilo (2,6-Cl₂ Bzl). Alternativamente, el grupo hidroxilo podría protegerse mediante la unión a un soporte sólido opcionalmente a través de un eslabón.

Son ejemplos ilustrativos de grupos protectores de aminos el Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo), BOC (tert-butiloxicarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxicarbonilo (alloc, AOC), bencil-oxicarbonilo (Z, Cbz), benciloxicarbonilos sustituidos tales como el 2-cloro benciloxicarbonilo ((2-ClZ), monometoxitritilo (MMT), dimetoxitritilo (DMT), ftaloilo, y 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo).

Son ejemplos ilustrativos de grupos protectores de carboxilos los alilésteres, metilésteres, etilésteres, 2-cianoetilésteres, trimetilsililetilésteres, bencilésteres (Obzl), 2-adamantilésteres (O-2-Ada), ciclohexilésteres (OcHex), 1,3-oxazolinas, oxazolones, 1,3-oxazolidinas, amidas o hidrazidas.

Son ejemplos ilustrativos de grupos protectores de mercapto el tritilo (Trt), acetamidometilo (acm), trimetilacetamidometilo (Tacm), 2,4,6-trimetoxibencilo (Tmob), tert-butilsulfenilo (StBu), 9-fluorenilmetilo (Fm), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), y 4-metilbencilo (Meb).

Más aún, podría ser necesario o deseable proteger cualquier nucleobase incluida en un LNA monomérico, especialmente cuando el LNA monomérico ha de incorporarse en un oligómero de acuerdo con la invención. En el presente contexto, el término "nucleobase protegida" significa que la nucleobase en cuestión es portadora de un grupo protector seleccionado de entre los grupos que son bien conocidos para una persona especialista en la técnica (ver, por ejemplo, Protocols for Oligonucleotides and Analogs, volumen 20, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, N.J.; S.L. Beaucage y R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 49:6123 (1993); S.L. Beaucage y R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223 (1992); y E. Uhlmann y A. Peyman, *Chem. Rev.*, 90:543). Son ejemplos ilustrativos el benzoilo, isobutirilo, tert-butilo, tert-butiloxicarbonilo, 4-cloro-benciloxicarbonilo, 9-fluorenilmetilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, 4-metoxibenzoilo, 4-metoxitritifenilmetilo, triazolo opcionalmente sustituido, p-toluenesulfonilo, sulfonilo opcionalmente sustituido, isopropilo, amidinas opcionalmente sustituidas, tritilo opcionalmente sustituido, fenoxiacetilo, acilo opcionalmente sustituido, pixilo, tetrahidropirano, sililéters opcionalmente sustituidos, y 4-metoxibenciloxicarbonilo. El Capítulo 1 en "Protocols for oligonucleotide conjugates", *Methods in Molecular Biology*, Volumen 26, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, N.J.; S.L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223 (1992) descubren ejemplos apropiados adicionales.

En una realización preferida, el grupo B en un LNA monomérico se selecciona preferiblemente de entre las nucleobases y nucleobases protegidas.

En una realización de los LNA monoméricos acorde con la presente invención, uno de Q y Q*, preferiblemente Q*, designa un grupo seleccionado de entre Act-O-, Act-S-, Act-N(R^H)-, Act-O-CH₂-, Act-S-CH₂-, Act-N(R^H)-CH₂-, y el otro de Q y Q*, preferiblemente Q*, designa un grupo seleccionado de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, mercapto, Prot-S-, C₁₋₆-alquiltio, amino, Prot-N(R^H)-, mono- o di (C₁₋₆-alkyl) amino, C₁₋₆-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alkyl opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquenilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxi opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquiniloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, y R^H se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₆-alkyl.

En el caso descrito más arriba, el grupo Prot designa un grupo protector para -OH, -SH, y -NH(R^H), respectivamente. Tales grupos protectores se seleccionan de entre los mismos definidos más arriba para los grupos protectores de hidroxilo, grupos protectores de mercapto, y grupos protectores de amino, respectivamente, tomando en consideración, no obstante, la necesidad de un grupo protector estable y reversible. Sin embargo, se prefiere que cualquier grupo protector para -OH se seleccione de entre tritilo opcionalmente sustituido, tal como dimetoxitritilo (DMT), monometoxitritilo (MMT), y tritilo, y 9-(9-fenil)xantenilo (pixyl) opcionalmente sustituido, tetrahidropirano (thp) (se

describen grupos protectores de hidroxilo adicionales, apropiados para la síntesis de oligonucleótidos de fosforamidito, en Agrawal, ed. "Protocols for Oligonucleotide Conjugates"; *Methods in Molecular Biology*, volumen 26, Humana Press, Totowa, N.J. (1994) y en "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", Volumen 20, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, N.J.), o protegidos como acetales; que cualquier grupo protector para -SH se seleccione de entre tritilo, tal como dimetoxitritilo (DMT), monometoxitritilo (MMT), y tritilo, y 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo), opcionalmente sustituido, tetrahidropiraniolo (thp) (se describen grupos protectores de mercapto, apropiados para la síntesis de oligonucleótidos de fosforamidito, en Agrawal (ver más arriba)); y que cualquier grupo protector para -NH(R^H) se seleccione de entre trityl, tal como dimetoxitritilo (DMT), monometoxitritilo (MMT), y tritilo, y 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo), opcionalmente sustituido, tetrahidropiraniolo (thp) (se describen grupos protectores de hidroxilo adicionales, apropiados para la síntesis de oligonucleótidos de fosforamidito, en Agrawal (ver más arriba).

En la realización anterior, así como para cualquier LNA monomérico definido en ésta, Act designa un grupo de activación para -OH, -SH, y -NH(R^H), respectivamente. Tales grupos de activación se seleccionan, por ejemplo, de entre O-fosforamidito opcionalmente sustituido, O-fosfortriéster opcionalmente sustituido, O-fosfordiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonate opcionalmente sustituido, y O-fosfonate opcionalmente sustituido.

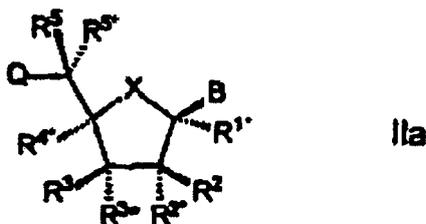
En el presente contexto, el "término" fosforamidito significa un grupo con la fórmula -P(OR^x)-N(R^v)₂, en donde R^x designa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, metilo, 2-cianoetilo o bencilo, y cada uno de R^v designa grupos alquilos opcionalmente sustituidos, por ejemplo etilo o isopropilo, o el grupo -N(R^v)₂ forma un grupo morfolino (-N(CH₂CH₂)₂O). R^x preferiblemente designa 2-cianoetilo y los dos R^v son preferiblemente idénticos y designan isopropilo. Por tanto, un fosforamidito especialmente relevante es el N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil) fosforamidito.

Debería entenderse que los grupos protectores usados para un único LNA monomérico o varios LNA monomérico podría seleccionarse se forma que cuando este/estos LNA(s) se incorporan en un oligómero de acuerdo con la invención, será posible realizar o una desprotección simultánea, o una desprotección secuencial de los grupos funcionales. Esta última situación abre la posibilidad de introducir regioselectivamente uno o varios grupos "activos/funcionales" tales como los intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, en donde tales grupos podrían unirse a través de un espaciador tal como se ha descrito más arriba.

En una realización preferida, Q se selecciona de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, mercapto, Prot-S-, C₁₋₆-alquiltio, amino, Prot-N(R^H)-, mono- o di(C₁₋₆-alquil)amino, optionally substituted C₁₋₆-alcoxilo, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueno opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquiniloxilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo protector para -OH, -SH, y -NH(R^H), respectivamente, y R^H se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₆-alquilo; y Q* se selecciona de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Act-O-, mercapto, Act-S-, C₁₋₆-alquiltio, amino, Act-N(R^H), mono- o di(C₁₋₆-alquil) amino, C₁₋₆-alcoxilo opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueno opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquiniloxilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, en donde Act es un grupo de activación para -OH, -SH, y -NH(R^H), respectivamente, y R^H se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₆-alquil.

Los LNA monoméricos con la Fórmula II general podrían, como los LNA incorporados en oligómeros, representar varios estereoisómeros. Por tanto, se cree que las variantes estereoquímicas descritas más arriba para los LNA incorporados en oligómeros son igualmente aplicables en el caso de LNA monoméricos (no obstante, debería destacarse que P debería entonces reemplazarse con Q).

En una realización preferida de la presente invención, el LNA monomérico tiene la Formula IIa general,



en donde los sustituyentes son tal como se definieron más arriba.

Más aún, en relación a las definiciones de los sustituyentes, biradicales, R*, etc. las mismas realizaciones preferidas tal como se han definidos más arriba para los oligómeros acordes de la invención se aplican también en el caso de los LNA monoméricos.

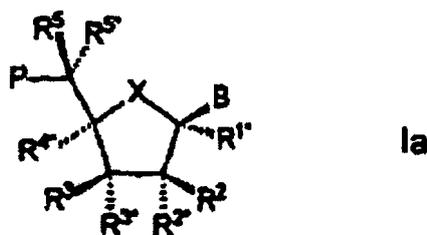
ES 2 242 291 T3

En una realización particularmente interesante de los LNA monoméricos de la presente invención, B designa una nucleobase, preferiblemente una nucleobase seleccionada de entre timina, citosina, uracilo, adenina y guanina (en particular adenina y guanina), X es -O-, R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de entre -(CH₂)₀₋₁-O-(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₀₋₁-S-(CH₂)₁₋₃-, y -(CH₂)₀₋₁-N(R^N)-(CH₂)₁₋₃-, en particular -O-CH₂-, -S-CH₂- y -R^N-CH₂-, en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alquilo, Q designa Prot-O-, R^{3*} es Q* que designa Act-OH, y R^{1*}, R², R³, R⁵, y R^{5*} cada uno designa hidrógeno. En esta realización, R^N podrían seleccionarse también de entre los intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores y ligandos.

En una realización particularmente interesante adicional de los LNA monoméricos de la presente invención, B designa una nucleobase, preferiblemente una nucleobase seleccionada de entre timina, citosina, uracilo, adenina y guanina (en particular adenina y guanina), X es -O-, R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de entre -(CH₂)₀₋₁-O-(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₀₋₁-S-(CH₂)₁₋₃-, y -(CH₂)₀₋₁-N(R^N)-(CH₂)₁₋₃-, en particular -O-CH₂-, -S-CH₂- y -R^N-CH₂-, en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y C₁₋₄-alquilo, Q se selecciona de entre hidroxilo, mercapto, C₁₋₆-alquiltio, amino, mono- o di (C₁₋₆-alquil) amino, C₁₋₆-alcoxilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquiniloxilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, y trifosfato, R^{3*} es Q* el cual se selecciona de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, C₁₋₆-alquiltio, amino, mono- o di (C₁₋₆-alquil) amino, C₁₋₆-alcoxilo opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, y C₂₋₆-alquiniloxilo opcionalmente sustituido, R³ se selecciona de entre hidrógeno, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, y C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, y R^{1*}, R², R⁵, y R^{5*} cada uno designa hidrógeno. También aquí, R^N podría seleccionarse también de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores y ligandos.

Un aspecto de la invención es proporcionar diversos derivados de LNA para su incorporación en fase sólida y/o fase en solución en un oligómero. Como un ejemplo ilustrativo, son monómeros apropiados para la incorporación de (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(citosin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(uracilo-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(guanin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, y (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(adenin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, usando respectivamente la estrategia del fosforamidito, la estrategia del fosfortriéster, y la estrategia del H-fosfonato, los (1R,3R,4R,7S)-7-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1R,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-(4,4'-di-metoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano-7-O-(2-clorofenilfosfato), y (1R,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano-7-O-(H-fosfonato) y los análogos 3-(citosin-1-il), 3-(uracilo-1-il), 3-(adenin-1-il) y 3-(guanin-1-il) del mismo, respectivamente. Más aún, se espera que también los análogos en donde el biradical metileneoxi de los monómeros se sustituye con un metileneamino, un metileneamino, o un biradical 1,2-etileno constituyan variantes particularmente interesantes de la presente invención. Se cree que los análogos de metileneamino y metileneamino son igualmente aplicables como el análogo de metileneoxi y por tanto los reactivos específicos correspondientes a aquéllos mencionados para la incorporación de (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(citosin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(uracilo-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(guanin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, y (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(adenin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano deberían considerarse también como monómeros reactivos particularmente interesantes en la presente invención. Para el análogo de metileneamino, debería destacarse que la amina secundaria podría portar un sustituyente seleccionado de entre C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, tal como metilo y bencilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo opcionalmente sustituido, tal como trifluoroacetilo, arilcarbonilo opcionalmente sustituido y heteroarilcarbonilo opcionalmente sustituido.

En una realización particularmente interesante, la presente invención se refiere a un oligómero que comprende al menos un LNA con la Fórmula Ia general,

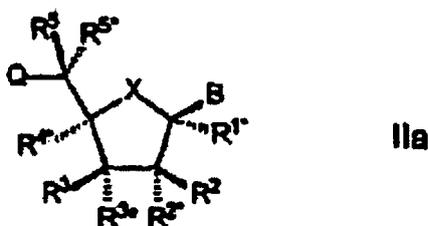


en donde X es -O-; B se selecciona de entre las 1 nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos; P designa la posición radical para un enlace internucleósidos a un monómero sucesivo, o un grupo 5'-terminal, tal enlace internucleósidos o grupo 5'-terminal incluyendo opcionalmente el sustituyente R⁵; R^{3*} es un grupo P* que designa un enlace internucleósidos a un monómero precedente, o un grupo 3'-terminal; R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical selec-

cionado de entre -O-, -S-, -N(R*)-, -(CR*R*)_{r+s+1}-, -(CR*R*)_r-O-(CR*R*)_s-, -(CR*R*)_r-S-(CR*R*)_s-, -(CR*R*)_r-N(R*)-(CR*R*)_s-, -O-(CR*R*)_{r+s}-O-, -S-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -S-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-S-, y -S-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-; en donde cada R* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di (C₁₋₆-alquil) amino, C₁₋₆-alcoxilo opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y/o dos R* adyacentes (no geminales) podrían designar juntos un doble enlace, y cada uno de r y s es 0-3 a condición de que la suma r+s sea 1-4; cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R³, R⁵, y R^{5*} se selecciona independientemente de entre hidrógeno, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, optionally substituted C₂₋₆-alqueni-
 10 lo, hidroxilo, C₁₋₆-alcoxilo, C₂₋₆-alqueniloxilo, carboxilo, C₁₋₆-alcoxicarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, formilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di (C₁₋₆-alquil)-amino-carbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilamino, carbamido, azido, C₁₋₆-alcanoiloxilo, sulfono, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y halógeno, en donde dos sustituyentes geminales juntos podrían designar ácido de los mismos.
 15 En particular, un R se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C₁₋₆-alcoxilo opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y cualesquier sustituyentes R* restantes son hidrógeno.

Especialmente, el biradical se selecciona de entre -O-, -(CH₂)₀₋₁-O-(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₀₋₁-S-(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₀₋₁-N(R^N)-(CH₂)₁₋₃-, y -(CH₂)₂₋₄-.

En una realización adicional particularmente interesante, la presente invención se refiere a un LNA con la Fórmula IIa general



en donde X es -O-; B se selecciona de entre nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos; R^{3*} es un grupo Q*; cada uno de Q y Q* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, C₁₋₆-alquiltio, amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono- o di (C₁₋₆-alquil)amino, C₁₋₆-alcoxilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquinilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alquiniloxilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, Act-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-, Act-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo protector para -OH, -SH, y -NH(R^H), respectivamente, Act es un grupo de activación para -OH, -SH, y -NH(R^H), respectivamente, y R^H es seleccionado de entre hidrógeno y C₁₋₆-alquilo; R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de entre -O-, -S-, -N(R*)-, -(CR*R*)_{r+s+1}-, -(CR*R*)_r-O-(CR*R*)_s-, -(CR*R*)_r-S-(CR*R*)_s-, -(CR*R*)_r-N(R*)-(CR*R*)_s-, -O-(CR*R*)_{r+s}-O-, -S-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -S-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-S-, y -S-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-; en donde cada R* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di(C₁₋₆-alquil)amino, C₁₋₆-alcoxilo opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y/o dos R* adyacentes (no geminales) podrían juntos designar un doble enlace, y cada uno de r y s es 0-3 con la condición de que la suma r+s sea 1-4; cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R³, R⁵, y R^{5*} se selecciona independientemente de entre hidrógeno, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueniilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, C₁₋₆-alcoxilo, C₂₋₆-alqueniloxilo, carboxilo, C₁₋₆-alcoxicarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, formilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)-amino-carbonilo, C₁₋₆-alquil-carbonilamino, carbamido, azido, C₁₋₆-alcanoiloxilo, sulfono, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y halógeno, en donde dos sustituyentes geminales juntos podrían designar oxo; y sales básicas y sales por adición de ácido de los mismos; y con la condición de que cualquier grupo químico (incluyendo cualquier nucleobase), que sea reactivo en las condiciones predominantes en la síntesis de oligonucleótidos, tiene su grupo funcional opcionalmente protegido. Preferiblemente, un R* se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C₁₋₆-alcoxilo opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y cualesquier sustituyentes R* restantes son hidrógeno. Especialmente, el biradical se selecciona de entre -O-, -(CH₂)₀₋₁-O-(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₀₋₁-S-(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₀₋₁-N(R^N)-(CH₂)₁₋₃-, y -(CH₂)₂₋₄-.

ES 2 242 291 T3

Generalmente, la presente invención proporciona oligómeros que tienen propiedades de hibridación sorprendentemente buenas con respecto a la afinidad y especificidad. Por tanto, la presente invención proporciona un oligómero que comprende al menos un análogo de nucleósido que confiere al oligómero una T_m con un oligonucleótido de ADN complementario que es al menos 2,5°C superior, preferiblemente al menos 3,5°C superior, en particular al menos 4,0°C superior, especialmente al menos 5,0°C superior, a la del correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado, el cual no comprende ningún análogo de nucleósido. En particular, la T_m del oligómero es al menos 2,5×N°C superior, preferiblemente al menos 3,5×N°C superior, en particular al menos 4,0×N°C superior, especialmente al menos 5,0×N°C superior, en donde N es el número de análogos de nucleósidos.

En el caso de la hibridación con un oligonucleótido de ARN complementario, el al menos un análogo de nucleósido confiere al oligómero una T_m con el oligonucleótido de ADN complementario que es al menos 4,0°C superior, preferiblemente al menos 5,0°C superior, en particular al menos 6,0°C superior, especialmente al menos 7,0°C superior, que la del correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado, el cual no comprende ningún análogo de nucleósido. En particular, la T_m del oligómero es al menos 4,0×N°C superior, preferiblemente al menos 5,0×N°C superior, en particular al menos 6,0×N°C superior, especialmente al menos 7,0×N°C superior, en donde N es el número de análogos de nucleósidos.

The term “correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado” se pretende que signifique un oligonucleótido que solamente consiste en nucleótidos que ocurren naturalmente, el cual representa las mismas nucleobases en el mismo orden absoluto (y con la misma orientación).

La T_m se mide bajo una de las siguientes condiciones, (es decir, esencialmente tal como se ilustra en el Ejemplo 129):

- a) 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA;
- b) 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,0, 0,1 mM EDTA; o
- c) 3M cloruro de tetrametilamonio (TMAC), 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 0,1 mM EDTA;

preferiblemente bajo las condiciones a), en cantidades equimolares (típicamente 1,0 μM) del oligómero y del oligonucleótido de ADN complementario.

El oligómero es preferiblemente tal como se definió más arriba, en donde, el al menos un análogo de nucleósido tiene la Fórmula I en donde B es una nucleobase. En particular, es interesante el caso en donde al menos un análogo de nucleósido incluye una nucleobase seleccionada de entre adenina y guanina.

Más aún, con respecto a la especificidad y afinidad, el oligómero, cuando se hibrida con un oligonucleótido de ADN parcialmente complementario, o un oligonucleótido de ARN parcialmente complementario, que tiene uno o más desemparejamientos con dicho oligómero, debería presentar una reducción en la T_m , a resultas de dichos desemparejamientos, que es igual a o superior a, la reducción que se observaría con el correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado, el cual no comprende ningún análogo de nucleósido. También, el oligómero debería tener sustancialmente la misma sensibilidad de la T_m por la fuerza iónica del tampón de hibridación que el correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado.

Los oligómeros definidos en ésta están típicamente modificados en al menos un 30%, preferiblemente 1 modificados al menos en un 50%, en particular modificados en un 70%, y algunas aplicaciones interesantes 100% modificados.

Los oligómeros de la invención tienen una estabilidad 3'-exonucleolítica sustancialmente superior a la del correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado. Esta importante propiedad puede examinarse tal como se describe en el Ejemplo 136.

Definiciones

En el presente contexto, el término “C₁₋₁₂-alquilo” significa un grupo hidrocarburo lineal, cíclico o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, tal como el metilo, etilo, propilo, iso-propilo, ciclopropilo, butilo, tert-butilo, iso-butilo, ciclobutilo, pentilo, ciclopentilo, hexilo, ciclohexilo, y dodecilo. Análogamente, el término “C₁₋₆-alquilo” significa un grupo hidrocarburo lineal, cíclico o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tal como el metilo, etilo, propilo, isopropilo, pentilo, ciclopentilo, hexilo, ciclohexilo, y el término “C₁₋₄-alquilo” se pretende que abarque los grupos de hidrocarburos lineales, cíclicos o ramificados que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, el metilo, etilo, propilo, iso-propilo, ciclopropilo, butilo, iso-butilo, tert-butilo, ciclobutilo.

Son ejemplos preferidos de “C₁₋₆-alquilo” el metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, tert-butilo, iso-butilo, pentilo, ciclopentilo, hexilo, ciclohexilo, en particular metilo, etilo, propilo, iso-propilo, tert-butilo, isobutilo y ciclohexilo. Son ejemplos preferidos de “C₁₋₄-alquilo” el metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, tert-butilo, e isobutilo.

De forma similar, el término “C₂₋₁₂-alqueno” abarca grupos hidrocarburos lineales, cíclicos o ramificados que tienen de 2 a 12 átomos de carbono y comprenden un enlace insaturado. Son ejemplos de grupos alqueno el vinilo,

ES 2 242 291 T3

alilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo, dodecaenilo. Análogamente, el término “C₂₋₆-alqueno” se pretende que abarque grupos hidrocarburos lineales, cíclicos o ramificados que tienen de 2 a 6 átomos de carbono e incluyen un enlace insaturado. Son ejemplos preferidos de alqueno, el vinilo, alilo, butenilo, especialmente el alilo.

5

Similarmente, el término “C₁₋₁₂-alquino” significa un grupo hidrocarburo lineal o ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y comprende un triple enlace. Son ejemplos de éste el etino, propino, butino, octino, y dodecano.

10

En el presente contexto, es decir, en conexión con los términos “alquilo”, “alqueno” y “alquino”, el término “opcionalmente sustituido” significa que el grupo en cuestión podría estar sustituido una o varias veces, preferiblemente 1-3 veces, con grupo(s) seleccionados de entre hidroxilo (el cual cuando se une a un átomo de carbono insaturado podría estar presente en la forma tautomérica ceto), C₁₋₆-alcoxi (es decir, C₁₋₆-alquil-oxi), C₂₋₆-alquenoiloxilo, carboxilo, oxo (formando una funcionalidad ceto o aldehído), C₁₋₆-alcoxycarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxycarbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxycarbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino; carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)aminocarbonilo, amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonylamino, ciano, guanidino, carbamido, C₁₋₆-alcanoiloxilo, sulfono, C₁₋₆-alquilsulfoniloxilo, nitro, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, halógeno, en donde cualquier arilo y heteroarilo podría estar sustituido tal como se describe específicamente más abajo para “arilo y heteroarilo opcionalmente sustituido”.

15

20

Preferiblemente, los sustituyentes se seleccionan de entre hidroxilo, C₁₋₆-alcoxilo, carboxilo, C₁₋₆-alcoxycarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxycarbonilo, arilcarbonilo, heteroarilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)aminocarbonilo, amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonylamino, ciano, carbamido, halógeno, en donde arilo y heteroarilo podría estar sustituido 1-5 veces, preferiblemente 1-3 veces, con C₁₋₄-alquilo, C₁₋₄-alcoxilo, nitro, ciano, amino o halógeno. Son ejemplos especialmente preferidos el hidroxilo, C₁₋₆-alcoxi, carboxilo, arilo, heteroarilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino, y halógeno, en donde arilo y heteroarilo podrían estar sustituidos 1-3 veces con C₁₋₄-alquilo, C₁₋₄-alcoxilo, nitro, ciano, amino o halógeno.

25

30

En el presente contexto, el término “arilo” significa un anillo o sistema de anillos carbocíclicos completa o parcialmente aromáticos, tales como fenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, antracilo, fenantracilo, pirenilo, benzopirenilo, fluorenilo y xantenilo, de entre los cuales el fenilo es un ejemplo preferido.

35

El término “heteroarilo” significa un anillo o sistema de anillos carbocíclicos completa o parcialmente aromáticos, en donde uno o más de los átomos de carbono se ha reemplazado con heteroátomos, por ejemplo, átomos de nitrógeno (=N- o -NH), azufre, y/u oxígeno. Son ejemplos de tales grupos heteroarilos el oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, piperidinilo, coumarilo, furilo, quinolilo, benzothiazolilo, benzotriazolilo, benzodiazolilo, benzooxazolilo, ftalazinilo, ftalanilo, triazolilo, tetrazolilo, isoquinolilo, acridinilo, carbazolilo, dibenzazepinilo, indolilo, benzopirazolilo, fenoxazonilo.

40

45

En el presente contexto, es decir, en conexión con los términos “arilo” y “heteroarilo”, el término “opcionalmente sustituido” significa que el grupo en cuestión podría estar sustituido una o varias veces, preferiblemente 1-5 veces, con grupo(s) seleccionados de entre hidroxilo (el cual cuando está en un sistema enol podrían estar representado en la forma tautomérica ceto), C₁₋₆-alquilo, C₁₋₆-alcoxilo, oxo (el cual podría estar representado en la forma tautomérica enol), carboxilo, C₁₋₆-alcoxycarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxilo, ariloxycarbonilo, arilcarbonilo, heteroarilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino; carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)aminocarbonilo, amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonylamino, ciano, guanidino, carbamido, C₁₋₆-alcanoiloxilo, sulfono, C₁₋₆-alquilsulfoniloxilo, nitro, sulfanilo, dihalógeno-C₁₋₄-alquilo, trihalógeno-C₁₋₄-alquilo, halógeno, en donde los arilos y heteroarilos que presentan sustituyentes podrían estar sustituidos 1-3 veces con C₁₋₄-alquilo, C₁₋₄-alcoxilo, nitro, ciano, amino o halógeno. Son ejemplos preferidos el hidroxilo, C₁₋₆-alquilo, C₁₋₆-alcoxilo, carboxilo, C₁₋₆-alcoxycarbonilo, C₁₋₆-alquilcarbonilo, arilo, amino, mono- y di(C₁₋₈-alquil) amino, y halógeno, en donde arilo podría estar sustituido 1-3 veces con C₁₋₄-alquilo, C₁₋₄-alcoxilo, nitro, ciano, amino o halógeno.

50

55

“Halógeno” incluye fluoro, cloro, bromo, y yodo.

60

Debería entenderse que los oligómeros (en donde se han incorporado los LNA) y los LNA como tales incluyen las posibles sales de los mismos, de entre las cuales son especialmente relevantes las sales farmacéuticamente aceptables. Las sales incluyen las sales por adición de ácido y las sales básicas. Son ejemplos de sales de adición por ácido las sales de hidrocloreto, sales sódicas, sales de calcio, sales potásicas, etc. Son ejemplos de sales básicas las sales en donde el contraión (restante) se selecciona de entre metales alcalinos, tales como el sodio y potasio, metales alcalinotérreos, tales como el calcio, e iones amonio (⁺N(R^e)₃R^h), en donde cada uno de R^e y R^h independientemente designa C₁₋₆-alquilo opcionalmente sustituido, C₂₋₆-alqueno opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido). Son sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, aquéllas descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a edición. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mack Publishing Company, Easton, Pa., U.S.A., 1985 y ediciones más recientes, y en la “Enciclopedia of Pharmaceutical Technology”. Por tanto, el término “sal por adición de ácido o sal básica del mismo” usando en ésta se pretende que comprenda tales sales. Más aún,

65

los oligómeros y LNA, así como cualesquier intermediario o material de partida de los mismos, también podrían estar presente en forma hidratada.

Preparación de monómeros

En una realización preferida, se sintetizaron mediante el siguiente procedimiento nucleósidos que contenían un anillo adicional unido en 2'-O,4'-C:

La síntesis de un cierto número de 4'-C-hidroximetil-nucleósidos ha sido descrita previamente (R.D. Youssefyeh, J.P.H. Verheyden y J.G. Moffatt, *J. Org. Chem.*, 44:1301 (1979); G.H. Jones, M. Taniguchi, D. Tegg y J.G. Moffatt, *J. Org. Chem.*, 44:1309 (1979); C. O-Yang, H.Y. Wu, E.B. Fraser-Smith y K.A.M. Walker, *Tetrahedron Lett.*, 33:37 (1992); H. Thrane, J. Fensholdt, M. Regner y J. Wengel, *Tetrahedron*, 51:10389 (1995); K.D. Nielsen, F. Kirpekar, P. Roepstorff y J. Wengel, *Bioorg. Med. Chem.*, 3:1493 (1995)). Para ilustrar la síntesis de nucleósidos bicíclicos unidos en 2'-O,4'-C escogemos una estrategia que parte del derivado 31 de la 4'-C-hidroximetilfuranosa. La bencilación, acetilación y acetólisis seguida por otra acetilación rindieron la furanosa 33, un intermediario clave para el acoplamiento del nucleósido. La reacción estereoselectiva con con timina sililada rindió el compuesto 34, el cual se desacetiló para rendir el diol de nucleósido 35. La tosilación seguida por el cierre del anillo inducido por base rindió el derivado del nucleósido bicíclico unido en 2'-O,4'-C 36. La debencilación rindió el análogo de nucleósido bicíclico desprotegido 37, el cual se transformó en el análogo protegido 5'-O-4,4'-dimetoxitritil 38 y, de forma subsiguiente, en el derivado fosforamidito 39 para la síntesis del oligonucleótido. Se ha usado un procedimiento similar para la síntesis de los correspondientes nucleósidos de uracilo, adenina, citosina y guanina, tal como se ilustra en la sección de Ejemplos. Este procedimiento de acoplamiento es sólo uno de los varios posibles, tal como será evidente para una persona especialista en la técnica. También es posible una estrategia partiendo de un nucleósido preformado. Por tanto, por ejemplo, la conversión del derivado de uridina 62 en el derivado 44 se consiguió exitosamente mediante tosilación, deisopropilidación, y cierre del anillo inducido por base. Como otro ejemplo, la conversión del nucleósido 67 en el nucleósido 61B se ha conseguido tal como se ilustra en la Figura 34.

La conversión del nucleósido de timina bicíclico 37 en el correspondiente nucleósido 5-metil-citosina 65 se consiguió mediante una secuencia de reacción conocida usando triazola y POCl₃, seguidos por benzoilación y tratamiento con amoníaco. Un procedimiento similar debería ser aplicable para la síntesis de 57C a partir de 44. Como otro ejemplo de estrategia posible, es posible el acoplamiento de derivados de furanosa preciclados, que ya contienen un anillo adicional, con derivados de nucleobases. Una estrategia tal, permitiría además la preparación de los correspondientes α -análogo de nucleósido. Cuando acoplamos con un metil furanósido protegido de 4-C,2-O-metilene-D-ribofuranosa, obtuvimos principalmente un producto con el anillo abierto. Sin embargo, el acoplamiento de la 1-O-acetyl furanose 207 o de la tiofenil furanose 212 rindió exitosamente nucleósidos LNA con los α -anómeros como un producto. La incorporación de tales α -LNA nucleósidos será posible usando las técnicas de polimerización estándares (como para los oligómeros de LNA que contienen Z), rindiendo α -LNA oligómeros. Además, es posible un estrategia sintética que realiza el acoplamiento de nucleósidos usando una 4'-C-hidroximetil furanosa ya activada para el cierre del anillo (por ejemplo, conteniendo un grupo mesilo o tosilo en el grupo 4'-C-hidroximetilo), tal como se ilustra por la conversión de la furanosa 78 en el nucleósido 79 seguida por la desprotección y cierre del anillo para rendir 36. La transglicosilación o anomerización química o enzimática de los derivados de furanosa o nucleósidos apropiados son aún otras posibles estrategias sintéticas. Estas y otras estrategias relacionadas permiten la síntesis de nucleósidos bicíclicos que contienen otras nucleobases o análogos de las mismas, bien mediante el acoplamiento con estas nucleobases o análogos, o empezando a partir de derivados de nucleósidos preformados.

Los ejemplos descritos se pretende que sean ilustrativos de los procedimientos y ejemplos de esta invención. Las estructuras de los compuestos sintetizados se verificaron usando técnicas de RMN 1D ó 2D, por ejemplo, experimentos NOE.

Una realización adicional de la presente invención es proporcionar nucleósidos bicíclicos que contienen anillos adicionales de diferentes tamaños y de diferentes estructuras químicas. A partir de los procedimientos descritos, es obvio para una persona especializada en la técnica de la síntesis orgánica que la ciclización de otros nucleósidos es posible usando procedimientos similares, también la de nucleósidos que contengan diferentes ramas C. La persona especialista en la técnica será capaz de hallar inspiración y guía para la preparación de nucleósidos sustituidos en la literatura, ver por ejemplo WO 96/14329. En relación a los anillos con diferentes composiciones químicas, está claro que es posible, usando procedimientos similares o procedimientos bien establecidos en el campo de la química orgánica, la síntesis, por ejemplo, de análogos tio de los análogos oxo ilustrados, así como los es la síntesis de los análogos amino correspondientes (usando, por ejemplo, reacciones de sustitución nucleofílicas o alquilaciones reductivas).

En la sección de ejemplos, se describe la síntesis de los amino análogos de LNA 73-74F. La conversión de 74 y 74D en bloques constructores estándares para la oligomerización fue posible mediante protección 5'-O-DMT y 3'-O-fosfitilación siguiendo los procedimientos estándares. Para el amino análogo de LNA, la protección de la funcionalidad 2'-amino es necesaria para una oligomerización lineal controlada. Tal protección puede conseguirse usando técnicas estándares de protección de grupos amino como, por ejemplo, Fmoc, trifluoroacetilo o BOC. Alternativamente, puede mantenerse un grupo N-alquil (por ejemplo, bencilo, metilo, etilo, propilo o alquilo funcionalizado) durante las transformaciones y oligomerización del nucleósido. En las Figuras 35 y 36, se muestran estrategias usando derivados N-trifluoroacetilo y N-metilo. Tal como se esquematiza en la Figura 37, la conversión del nucleósido 75 en el análogo

de nucleósido 2'-tio-LNA 76D se ha realizado exitosamente, al igual que la síntesis subsiguiente del derivado fosforamitido 76F. El compuesto 76F tiene la estructura requerida para la síntesis automatizada de oligonucleótidos 2'-tio-LNA. El sintón N-trifluoroacetilo 2'-amino-LNA 74A tiene la estructura requerida para la síntesis automatizada de 2'-amino-LNA oligonucleótidos.

5

La síntesis de los correspondientes derivados de citosina, guanina, y adenina de los nucleósidos 2'-tio- y 2'-amino-LNA puede conseguirse usando estrategias análogas a las mostradas en las Figuras 35, 36 y 37. Alternativamente, la estereoquímica alrededor del C-2' puede invertirse antes de las ciclizaciones, bien usando un sintón de furanosa convenientemente configurado, por ejemplo, un arabino-configurado, o invirtiendo la configuración alrededor del átomo de carbono C-2' empezando de un nucleósido/furano ribo-configurado. La subsiguiente activación del 2'- β -OH, por ejemplo, mediante tosilación, doble sustitución nucleofílica, como en el ejemplo uracilo/timina descrito más arriba, podría proveer los nucleósidos bicíclicos 2'-tio-LNA o 2'-amino-LNA deseados. Los así obtenidos análogos de citosina, guanina, y adenina, convenientemente protegidos, pueden prepararse para la oligomerización usando las reacciones estándares (protección con DMT y fosfitilación) tal como se ha descrito más arriba para otros ejemplos.

15

Preparación de oligómeros

Los oligo- y polinucleótidos lineales, ramificados (M. Groetli y B.S. Sproat, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 495 (1995); R.H.E. Hudson y M.J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:2119 (1993); M. Von Bujren, G.V. Petersen, K. Rasmussen, G. Brandenburg, J. Wengel y F. Kirpekar, *Tetrahedron*, 51:8491 (1995)) y circulares (G. Prakash y E.T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:3523 (1992)) de la invención podrían producirse usando las técnicas de polimerización de la química del ácido nucleico bien conocidas por una persona con la formación ordinaria en el campo de la química orgánica. Se usó la química del fosforamidito chemistry (S.L. Beaucage y R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 49:6123 (1993); S.L. Beaucage y R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223 (1992)), pero, por ejemplo, también podrían haberse usado la química del H-fosfonato, la química del fosfortriéster, o la síntesis enzimática. Generalmente, se usaron las condiciones de acoplamiento estándares y la estrategia del fosforamidito, pero para algunos monómeros de la invención se usaron tiempos de acoplamiento más largos, y/o acoplamientos repetidos con reactivos recientes, y/o el uso de reactivos de acoplamiento más concentrados. Como otra posibilidad, también podrían haberse usado activadores más activos que el 1H-tetrazolio para incrementar la velocidad de la reacción de acoplamiento. Los fosforamiditos 39, 46, 53, 57D, 61D, y 66 se acoplaron todos con rendimientos satisfactorios de acoplamiento paso a paso >95%. Se sintetizó un oligómero todo de fosforotioato-LNA (Tabla 7) usando procedimientos normales. Por tanto, intercambiando la oxidación, por ejemplo yodo/piridina/H₂O, usada para la síntesis de oligómeros fosfordiester, con una oxidación usando el reactivo de Beaucage's (disponible comercialmente), se sintetizó eficientemente el oligómero de fosfortioato-LNA (rendimientos de acoplamiento paso a paso >=98%). Los oligonucleótidos de 2'-amino-LNA y 2'-metilamino-LNA (Tabla 9) se sintetizaron eficientemente (rendimientos de acoplamiento paso a paso >=98%) usando los amiditos 74 y 74F. Los oligonucleótidos de 2'-tio-LNA (Tabla 8) se sintetizaron eficientemente usando los procedimientos estándares del fosforamidito tal como se describen más arriba la los oligonucleótidos de LNA. Después de la síntesis de la secuencia deseada, el desarrollo se realizó usando condiciones estándares (separación del soporte sólido y retirada de los grupos protectores usando amoníaco al 30%, a 55°C, durante 5 horas). La purificación de los oligonucleótidos de LNA se realizó usando cartuchos desechables de purificación en fase inversa y/o HPLC en fase inversa y/o precipitación a partir de etanol o butanol. La electroforesis en gel capilar, la HPLC en fase inversa, y MALDI-MS se usaron para verificar la pureza de los análogos de oligonucleótidos sintetizados, y para verificar que, tal como se contemplaba, se habían incorporado el número deseado de análogos de nucleósido.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar procedimientos para análogos de oligonucleótidos que contienen LNA unidos mediante enlaces internucleósidos no naturales. Por ejemplo, la síntesis de los análogos fosforotioato y fosforamidato es posible usando estrategias bien establecidas en el campo de la química de oligonucleótidos ("Protocols for Oligonucleotides and Analogs", volumen 20, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, N.J.; S.L. Beaucage y R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 49:6123 (1993); S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223 (1992); E. Uhlmann y A. Peyman, *Chem. Rev.*, 90:543 (1990)).

Por tanto, generalmente, la presente invención proporciona también el uso de un LNA, tal como se define en esta, para la preparación de oligonucleótidos modificados con LNA. Debería entenderse que el oligonucleótido modificado con LNA podría comprender nucleósidos normales (es decir, nucleósidos que ocurren en la naturaleza, tales como ribonucleósidos y/o desoxiribonucleósidos), así como nucleósidos modificados diferentes de los definidos con la Fórmula II general. En una realización particularmente interesante, la incorporación del LNA modula la capacidad del oligonucleótido para actuar como sustrato de enzimas activos de ácidos nucleicos.

Además, los materiales de soporte sólido que tienen inmovilizados sobre sí LNA con su nucleobase opcionalmente protegida y 5'-OH opcionalmente protegido, son especialmente interesantes como material para la síntesis de oligonucleótidos de LNA modificados en donde se incluye un monómero de LNA en el extremo 3'. En este caso, el material de soporte sólido es preferiblemente CPG, por ejemplo, un material de CPG fácilmente (comercialmente) disponible sobre el cual se une un LNA funcionalizado en 3', opcionalmente protegido en su nucleobases y opcionalmente protegido en 5'-OH, usando las condiciones establecidas por el suministrador para ese material particular. Por ejemplo, puede usarse el soporte de CPG Biogenex Universal (BioGenex, U.S.A.). El grupo protector de 5'-OH podría ser, por ejemplo, el grupo DMT. El grupo funcional en 3' debería seleccionarse con la debida atención a las condiciones aplicables para el material CPG en cuestión.

Aplicaciones

La presente invención descubre el sorprendente hallazgo de que varios derivados novedosos de monómeros de nucleósidos bicíclicos (LNA), cuando se incorporan en oligonucleótidos, incrementan dramáticamente la afinidad de estos oligonucleótidos modificados por ambos, ADNss y ARNss complementarios en comparación con los oligonucleótidos no modificados. Descubre además el hallazgo sorprendente de que ambos, los oligonucleótidos completa y parcialmente modificados con LNA mejoran enormemente las propiedades de hibridación con sus secuencias de ácido nucleico complementarias. Dependiendo de la aplicación, el uso de estos LNA ofrece, por tanto, la interesante posibilidad de, o bien incrementar enormemente la afinidad de un oligonucleótido estándar sin comprometer la especificidad (tamaño constante del oligonucleótido) o incrementar significativamente la especificidad sin comprometer la afinidad (reducción en el tamaño del oligonucleótido). La presente invención también descubre el hallazgo inesperado de que los oligonucleótidos modificados con LNA, además de mejorar enormemente las propiedades de hibridación, presentan muchas de las útiles propiedades fisicoquímicas de los oligonucleótidos normales de ADN y ARN. Los ejemplos proporcionados en ésta incluyen una solubilidad excelente, una respuesta de los oligonucleótidos modificados con LNA a sales como el cloruro sódico y cloruro de tetrametilamonio que imita la de los oligonucleótidos no modificados, la capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA para actuar como cebadores para una variedad de polimerasas, la capacidad de los nucleótidos modificados con LNA para actuar como cebadores en una reacción de amplificación de diana usando una polimerasa del ADN termoestable, la capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA de actuar como un sustrato para la quinasa de polinucleótidos T4, la capacidad de los LNA biotinilados para capturar, de forma específica para la secuencia, amplicones de PCR sobre una superficie sólida recubierta con estreptoavidina, la capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA inmovilizados para capturar amplicones de forma específica para la secuencia, y, de forma muy importante, la capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA para apuntar específicamente para la secuencia a ADN de doble hebra mediante invasión de la hebra. Por tanto, es evidente para alguien con formación ordinaria en la técnica que estos novedosos análogos de nucleósidos son herramientas extremadamente útiles para mejorar, en general, las prestaciones de las técnicas basadas en oligonucleótidos, en la terapéutica, diagnóstico y biología molecular.

Un objeto de la presente invención es proporcionar LNA monoméricos acordes con la invención, los cuales pueden incorporarse en oligonucleótidos usando procedimientos y equipamiento bien conocido a alguien especialista en la técnica de la síntesis de oligonucleótidos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos modificados total o parcialmente con LNA (oligómeros) que son capaces de hibridar, de forma específica para la secuencia, oligonucleótidos complementarios, formando bien dúplexes o tríplexes de afinidad sustancialmente superior a la de los correspondientes complejos formados mediante oligonucleótidos no modificados.

Otro objeto de la presente invención es usar los LNA para mejorar la especificidad de oligonucleótidos normales sin comprometer su afinidad. Esto puede conseguirse reduciendo el tamaño (y por tanto la afinidad) del oligonucleótido normal hasta un punto que iguale la ganancia en afinidad resultante de la incorporación de los LNA.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos total o parcialmente modificados que contengan tanto LNA, como nucleósidos normales y otros análogos de nucleósidos.

Un objeto adicional de la presente invención es explotar la elevada afinidad de los LNA para crear oligonucleótidos modificados con una afinidad extrema que sean capaces de unirse a sus respectivas secuencias diana en un ADNds mediante el “desplazamiento de la hebra”.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar diferentes clases de LNA, los cuales, cuando se incorporan en oligonucleótidos, difieren en su afinidad hacia sus nucleósidos complementarios. De acuerdo con la invención esto puede conseguirse bien sustituyendo las nucleobases normales G, A, T, C y U con derivados que tengan, por ejemplo, alteradas las posibilidades unirse al hidrógeno, o usando LNA que difieren en su estructura fundamental. La disponibilidad de tales LNA diferentes facilita el ajuste exquisito de la afinidad de los oligonucleótidos modificados.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos modificados con LNA que son más resistentes a la nucleasas que sus contrapartidas no modificadas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos modificados con LNA que pueden reclutar la RNAasa H.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar LNA que pueden actuar como sustratos de las polimerasas de ADN y ARN, permitiendo por tanto que los análogos sean, bien incorporados en una cadena de ácido nucleico en crecimiento, o que actúen como terminadores de cadena.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar LNA que pueden actuar como agentes terapéuticos. Se conocen muchos ejemplos de ácidos nucleicos terapéuticos y pueden sintetizarse derivados similares de los ácidos nucleicos descubiertos en ésta usando los procedimientos conocidos de la literatura (E. De Clercq, *J. Med. Chem.* 38:2491 (1995); P. Herdewijn y E. De Clercq: “Classical Antiviral Agents y Design og New Antiviral Agents.” In: *A Textbook of Drug Design y Development*; Editores P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors y U. Madsen; Harwood

Academic Publishers, Amsterdam, 1996, p. 425; I. K. Larsen: "Anticancer Agents." In: *A Textbook of Drug Design y Development*; Editores P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors y U. Madsen; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996, p. 460).

5 Se ha demostrado que los ARN de doble hebra poseen actividad antiviral y actividad supresora de tumores (Sharp *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 230(1):97-103 (1995), Lengyel-P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(13):5893-5895 (1993), y Laurent-Crawford *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8(2):285-90 (1992)). Es probable que los LNA de doble hebra puedan imitar el efecto de los ARN de doble hebra terapéuticamente activos y, en consecuencia, tales LNA de doble hebra tienen un potencial como drogas terapéuticas.

10 Cuando se usa en ésta, el término "ácido nucleico natural" se refiere a ácidos nucleicos en el sentido más amplio, como, por ejemplo, ácidos nucleicos presentes en células intactas de cualquier origen, o virus o ácidos nucleicos liberados a partir de tales fuentes mediante medios químicos o físicos, o ácidos nucleicos derivados de tales fuentes primarias mediante amplificación. El ácido nucleico natural podría ser sencillo, doble, o parcialmente de doble hebra, y podría ser una especie relativamente pura o una mezcla de diferentes ácidos nucleicos. Podría ser también un componente de una muestra biológica cruda que contuviera otros ácidos nucleicos y otros componentes celulares. Por otra parte, el término "ácidos nucleicos sintéticos" se refiere a cualquier ácido nucleico producido mediante síntesis química.

20 La presente invención proporciona también el uso de oligonucleótidos modificados con LNA en la terapéutica, diagnóstico y biología molecular basada en ácido nucleico. Los oligonucleótidos modificados con LNA pueden usarse en la detección, identificación, captura, caracterización, cuantificación y fragmentación de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, y como agentes bloqueadores de la traducción y transcripción *in vivo* y *in vitro*. En muchos casos, será de interés unir varias moléculas a cualquier extremo del oligonucleótido o podrían unirse en una o más posiciones internas. Alternativamente, podrían unirse al oligonucleótido a través de espaciadores unidos al extremo 5' ó 3'. Son grupos representativos de tales moléculas los intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos. Generalmente, todos los procedimientos para marcar los oligonucleótidos de ADN y ARN no modificados con estas moléculas pueden usarse también para marcar los oligonucleótidos modificados con LNA. De igual forma, todos los procedimientos usados para detectar oligonucleótidos marcados se aplican generalmente a los correspondientes oligonucleótidos marcados, modificados con LNA.

Terapia

35 El término "desplazamiento de hebra" se refiere a un proceso mediante el cual un oligonucleótido se une a su secuencia diana complementaria en un ADN o ARN de doble hebra con objeto de desplazar la otra hebra de dicha hebra diana.

40 En un aspecto de la presente invención, los oligonucleótidos modificados con LNA capaces de realizar el "desplazamiento de hebra" se explotan en el desarrollo de nuevas drogas farmacéuticas basadas en la estrategia del "antigen". En contraste con los oligonucleótidos capaces de formar hélices triples, tales oligonucleótidos de "desplazamiento de hebra" permiten apuntar a cualquier secuencia en el ADNds y a fuerza iónica y pH fisiológicos.

45 Los oligonucleótidos de "desplazamiento de hebra" pueden usarse también de forma ventajosa en la estrategia antisentido en aquellos casos en los que la secuencia de ADN diana es inaccesible debido a los enlaces de hidrógeno intramoleculares. Tales estructuras intramoleculares podrían ocurrir en los ARNm, y pueden causar problemas significativos cuando se intenta "apagar" la traducción del ARNm mediante la estrategia antisentido.

50 Otras clases de ARN celulares, como, por ejemplo, los ARNt, ARNr, ARNsn y ARNsc, contienen estructuras intramoleculares que son importantes por su función. Estas clases de ARN altamente estructurados no codifican proteínas sino que (en forma de partículas ARN/proteína) participan en un rango de funciones celulares tales como, el corte y empalme del ARNm, la poliadenilación, la traducción, la edición, el mantenimiento de la integridad del extremo final del cromosoma, etc. Debido a su elevado grado de estructura, que dificulta o incluye impide a los oligonucleótidos normales hibridarse eficientemente, estas clases de ARN no han atraído hasta la fecha el interés como dianas antisentido.

El uso de monómeros de LNA de elevada afinidad debería facilitar la construcción de sondas antisentido con termoestabilidad suficiente para hibridarse efectivamente a tales ARN diana.

60 En algunos casos, podría ser ventajoso desregular la expresión de un gen, mientras que en otros casos podría ser ventajoso activarla. Tal como muestran Mollegaard *et al.* (Mollegaard, N.E.; Buchardt, O.; Egholm, M.; Nielsen, P.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3892 (1994)), los oligómeros capaces de "desplazamiento de hebra" pueden funcionar como activadores transcripcional del ARN. En un aspecto de la presente invención, los LNA capaces de "desplazamiento de hebra" se usan para activar genes con interés terapéutico.

65 Los nucleósidos y los análogos de nucleósidos se han probado efectivos en la quimioterapia de numerosas infecciones virales y cánceres. Los nucleósidos de NA son potencialmente útiles como tales drogas basadas en nucleósidos.

Varios tipos de ARN de doble hebra inhiben el crecimiento de varios tipos de cánceres. Los duplexes que implican uno o más oligonucleótidos de LNA son potencialmente útiles como tales drogas de doble hebra.

La invención concierne también a composiciones farmacéuticas que comprenden un oligonucleótido modificado con LNA farmacéuticamente activo o un monómero de LNA farmacéuticamente activo, tal como se ha definidos más arriba, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Tales composiciones podrían hallarse en una forma adaptada a la administración oral, parenteral (intravenosa, intraperitoneal), intramuscular, rectal, intranasal, dermal, vaginal, bucal, ocular o pulmona, preferiblemente en una forma adaptada a la administración oral, y tales composiciones podrían prepararse de una manera bien conocida por la persona especialista en la técnica, por ejemplo, tal como se describe de forma general en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, Pa., U.S.A., 1985 y en ediciones más recientes, y en las monografías de la serie "Drugs and the Pharmaceutical Sciences", Marcel Dekker.

15 *Diagnósticos*

Se han desarrollado varios procedimientos diagnósticos y de biología molecular que utilizan paneles de diferentes oligonucleótidos para analizar simultáneamente un ácido nucleico diana en busca de la presencia de un plétora de mutaciones posibles. Típicamente, los paneles de oligonucleótidos se inmovilizan en un patrón determinado sobre un soporte sólido, de tal forma que la presencia de una determinada mutación en el ácido nucleico diana puede revelarse mediante la posición sobre el soporte sólido en donde se hibrida. Un requisito importante para el uso exitoso de paneles de diferentes oligonucleótidos en el análisis de ácidos nucleicos es que todos sean específicos para su particular secuencia diana en la única condición de hibridación aplicada. Puesto que la afinidad y especificidad de los oligonucleótidos estándares por sus secuencias complementarias depende intensamente de su secuencia y tamaño, hasta la fecha ha sido difícil satisfacer este criterio.

En una realización preferida, por tanto, los LNA se usan como un medio para incrementar la afinidad y/o especificidad de las sondas y como un medio para igualar la afinidad de diferentes oligonucleótidos por sus secuencias complementarias. Tal como se descubre en ésta, tal modulación de la afinidad puede conseguirse, por ejemplo, reemplazando nucleósidos seleccionados en el oligonucleótido con una nucleobase similar portadora de LNA. Tal como se muestra adicionalmente en ésta, las diferentes clases de LNA presentan diferentes afinidades por sus nucleósidos complementarios. Por ejemplo, los LNA con puente 2-3 con la nucleobase T presentan menos afinidad por el nucleósido A que el LNA correspondiente con puente 2-4. Por tanto, el uso de diferentes clases de LNA ofrece un nivel adicional para ajustar con finura la afinidad de un oligonucleótido.

En otra realización preferida, la elevada afinidad y especificidad del LNA modificado se explota en la captura específica para la secuencia y purificación de ácidos nucleicos naturales o sintéticos. En un aspecto, los ácidos nucleicos naturales o sintéticos se ponen en contacto con el oligonucleótido modificado con LNA inmovilizado sobre una superficie sólida. En este caso, la hibridación y captura ocurren simultáneamente. Los ácidos nucleicos capturados podrían, por ejemplo, detectarse, caracterizarse, cuantificarse o amplificarse directamente sobre la superficie mediante una variedad de procedimientos bien conocidos en la técnica, o podrían liberarse de la superficie antes de que ocurre tal caracterización o amplificación, sometiendo el oligonucleótido modificado, inmovilizado, y ácido nucleico capturado a condiciones de deshibridación, tales como, por ejemplo, el calor, o usando tampones con baja fuerza iónica.

El soporte sólido podría escogerse de entre un amplio rango de materiales poliméricos, tales como, por ejemplo, el CPG (vidrio de poro controlado), el polipropileno, poliestireno, policarbonato o polietileno, y podría adoptar una variedad de formas, tales como, por ejemplo, un tubo, una placa de microvaloración, una varilla, una cuenta, un filtro, etc. El oligonucleótido modificado con LNA podría inmovilizarse sobre el soporte sólido a través de sus extremos 5' ó 3' (o a través de los extremos de eslabones unidos a los extremos 5' ó 3') mediante una variedad de procedimientos químicos o fotoquímicos usualmente empleados en la inmovilización de oligonucleótidos, o mediante acoplamiento no covalente, tal como, por ejemplo, a través de la unión de oligonucleótido modificado con LNA biotinilado a estreptoavidina inmovilizada. Un procedimiento preferido para inmovilizar oligonucleótidos modificados con LNA sobre diferentes soportes sólidos es fotoquímico, usando un antraquinona fotoquímicamente activa unida covalentemente al extremo 5' ó 3' del oligonucleótido modificado (opcionalmente a través de eslabones) tal como se describe en (WO 96/31557). Por tanto, la presente invención proporciona también una superficie portadora de un oligonucleótido modificado con LNA.

En otro aspecto, el oligonucleótido modificado con LNA porta un ligando unido covalentemente a uno de los extremos 5' ó 3'. En este caso, el oligonucleótido modificado con LNA se pone en contacto con ácidos nucleicos naturales o sintéticos en solución, a partir de los cual los híbridos formados se capturan sobre un soporte sólido portador de moléculas que puede unir específicamente el ligando.

En aún otro aspecto, los oligonucleótidos modificados con LNA capaces de realizar el "desplazamiento de hebra" se usan en la captura de ácidos nucleicos naturales y sintéticos sin desnaturalización previa. Tales oligonucleótidos modificados son particularmente útiles en los casos en los que es difícil o imposible acceder a la secuencia diana mediante oligonucleótidos normales debido a la rápida formación de estructuras intramoleculares estables. Son ejemplo de ácidos nucleicos que contiene tales estructuras el ARNr, ARNt, ARNsn y ARNsc.

En otra realización preferida, los oligonucleótidos modificados con LNA diseñados con el propósito de elevada especificidad se usan como cebadores en la secuenciación de ácidos nucleicos y como cebadores en cualquiera de las diferentes reacciones de amplificación bien conocidas, tales como la reacción de la PCR. Tal como se muestra en ésta, el diseño de los oligonucleótidos modificados con LNA determina si sostendrá una amplificación exponencial o lineal de la diana. Los productos de la reacción de amplificación pueden analizarse mediante una variedad de procedimientos aplicables al análisis de los productos de amplificación generados con cebadores de ADN normales. En el caso particular en que los cebadores de oligonucleótido modificado con LNA se diseñan para sostener una amplificación lineal, los amplicones resultantes portarán extremos de hebra única que pueden ser apuntados por sondas complementarias sin desnaturalización. Tales extremos podrían, por ejemplo, usarse para capturar amplicones mediante oligonucleótidos complementarios modificados con LNA unidos sobre una superficie sólida.

En otro aspecto, se usan como cebadores oligos modificados con LNA capaces de “desplazamiento de hebra” en reacciones de amplificación tanto lineales como exponenciales. Se espera que el uso de tales oligos mejore los rendimientos globales de amplicón compitiendo efectivamente con la re-hibridación del amplicón en las últimas etapas de la reacción de amplificación. Demers, *et al.* (*Nucl. Acid Res.* 23:3050-3055 (1995)) descubre el uso de oligos de elevada afinidad, no extensibles, como un medio para incrementar el rendimiento global de una reacción de PCR. Se cree que los oligonucleótidos general este efecto interfiriendo con la re-hibridación del amplicón en las etapas finales de la reacción de la PCR. Se expresa que los oligos modificados con LNA bloqueados en su extremo 3’ proporcionen la misma ventaja. El bloqueo del extremo 3’ puede conseguirse de numerosas formas, como, por ejemplo, intercambiando el grupo hidroxilo en 3’ con hidrógeno o fosfato. Tales oligos modificados con LNA y bloqueados en 3’ pueden usarse también para amplificar selectivamente secuencias de ácidos nucleicos estrechamente relacionados de forma similar a la descrita por Yu *et al.* (*Biotechniques*, 23:714-716 (1997)).

En años recientes, se han inventados nuevas clases de sonda que pueden usarse en, por ejemplo, la detección en tiempo real de amplicones generados mediante reacciones de amplificación de la diana. Una de tales clases de dianas se ha denominado “Balizas Moleculares”. Estas sondas se sintetizan como oligonucleótidos parcialmente auto-complementarios que contienen un fluoróforo en un extremo y una molécula atenuadora en el otro extremo. Cuando están libres en solución, la sonda se pliega en un estructura de horquilla (guiada por las regiones auto-complementarias) con la posición del atenuador lo suficientemente proxima al fluoróforo para atenuar su señal fluorescente. A partir de la hibridación con su ácido nucleico diana, la horquilla se abre separando el fluoróforo y atenuador, y dando lugar a una señal fluorescente.

Otra clase de sondas se ha denominado “Sondas Taqman”. Estas sondas también contienen un fluoróforo y una molécula atenuadora. Sin embargo, al contrario de las Balizas Moleculares, la capacidad de los atenuadores para atenuar la señal fluorescente procedente del fluoróforo se mantiene después de la hibridación de la sonda con su secuencia diana. En cambio, la señal fluorescente es generada después de la hibridación mediante separación física de uno de los dos, atenuador o fluoróforo, de la sonda por la acción de la actividad 5’-exonucleada de una polimerasa que ha iniciado la síntesis a partir de un cebador ubicado 5’ respecto el sitio de unión de la sonda Taqman. La afinidad elevada por el sitio diana es una característica importante es ambos tipos de sondas y, en consecuencia, tales sondas tienden a ser bastante largas (típicamente de 30 a 40-meros). Como resultando, se han hallado problemas significativos en la producción de sondas de elevada calidad. Por tanto, en una realización preferida, los LNA se usan para mejorar la producción y subsiguientes prestaciones de las sondas Taqman y Balizadas Moleculares mediante reducción de su tamaño mientras retienen la afinidad requerida.

En un aspecto adicional, los LNA se usan para construir nuevos pares de afinidad (oligonucleótidos completa o parcialmente modificados). Las constantes de afinidad pueden ajustarse fácilmente a lo largo de un amplio rango y pueden diseñarse y sintetizarse un vasto número de pares de afinidad. Una parte de estos pares de afinidad pueden unirse a la molécula de interés (por ejemplo, proteínas, amplicones, enzimas, polisacáridos, anticuerpos, haptenos, péptidos, PNA, etc.) mediante procedimientos estándares, mientras que la otra parte del par de afinidad puede unirse a, por ejemplo, un soporte sólido tal como cuentas, membranas, placas de microvaloración, varillas, tubos, etc. El soporte sólido podría escogerse de entre un amplio rango de material poliméricos, tales como, por ejemplo, polipropileno, poliestireno, policarbonato o polietileno. Los pares de afinidad podrían usarse en el aislamiento, purificación, captura y detección selectiva de una diversidad de las moléculas diana mencionadas más arriba.

El principio de capturar una molécula marcada con LNA por medio de la interacción con otro oligonucleótido de LNA complementario (bien completa o parcialmente modificado) puede usarse para crear un número infinito de pares de afinidad nuevos.

En otra realización preferida, la elevada afinidad y especificidad de los oligonucleótidos modificados con LNA se explota en la construcción de sondas útiles en la hibridación *in situ*. Por ejemplo, el LNA podría usarse para reducir el tamaño de las sondas de AND tradicionales mientras que se mantiene la afinidad requerida, incrementando de ese modo las cinéticas de la sonda y su capacidad para penetrar el espécimen de muestra. La capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA para “invadir la hebra” de estructuras de ácidos nucleicos de doble hebra es también de considerable ventaja en la hibridación *in situ*, puesto que facilita la hibridación sin desnaturalización previa del ADN/ARN diana.

En otra realización preferida, los oligonucleótidos modificados con LNA a usarse en la terapéutica antisentido se diseñan con el doble propósito de elevada afinidad y capacidad para reclutar la RNAasa H. Esto puede conseguirse,

ES 2 242 291 T3

por ejemplo, teniendo segmentos con LNA que flanquean un segmento de ADN no modificado central.

La presente invención proporciona también un equipo para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, en donde el equipo comprende un cuerpo de reacción, y uno o más oligonucleótidos modificados con LNA (oligómeros) tal como se definen en esta. Los oligonucleótidos modificados con LNA se inmovilizan preferiblemente sobre dicho cuerpo de reacciones.

La presente invención también proporciona un equipo para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, en donde el equipo comprende un cuerpo de reacción y uno o más LNA tal como se han definido en ésta. Los LNA se inmovilizan preferiblemente sobre dicho cuerpo de reacciones (por ejemplo, usando las técnicas de inmovilización descritas más arriba).

Para los equipos acordes con la invención, el cuerpo de reacción es preferiblemente un material de soporte sólido, por ejemplo, seleccionado de entre vidrio de borosilicato, vidrio soda-lime, poliestireno, policarbonato, polipropileno, polietileno, polietilenglicol tereftalato, polivinilacetato, polivinilpirrolidina, polimetilmetacrilato y polivinilcloruro, preferiblemente poliestireno y policarbonato. El cuerpo de reacción podría estar en forma de un tubo de muestras, un vial, un portaobjetos, una lámina, una película, una cuenta, un aglomerado, un disco, una placa, un anillo, una barra, una red, un filtro, una bandeja, una placa de microvaloración, una varilla, o una varilla con múltiples palas.

Los equipos se acompañan típicamente con una hoja de instrucciones escritas que contiene las condiciones óptimas para el uso del equipo.

Los aspectos diagnósticos y terapéuticos de la presente invención se han ilustrado con los siguientes ejemplos.

Experimental

General

Todos los reactivos se obtuvieron de suministradores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Después de secar cualquier fase orgánica usando Na_2SO_4 , se realizó una filtración. El gel de sílice (0,040-0,063 mm) usado para la cromatografía en columna se compró a Merck. Los espectros de RMN se adquirieron a 300 MHz ó 250 MHz para ^1H RMN y 62,9 MHz para ^{13}C RMN, y a 202,33 MHz para ^{31}P RMN. Los valores de δ están en ppm relativas al tetrametilsilano como estándar interno (^1H RMN y ^{13}C RMN) y relativas a 85% H_3PO_4 como estándar externo (^{31}P RMN). Las asignación de los picos de RMN se da de acuerdo con la nomenclature estándar de nucleósidos. El espectro de masas, el espectro de masas FAB y el espectro de masas por Desorción de Plasma se registraron para obtener información sobre el peso molecular de los compuestos sintetizados. Los análogos de oligonucleótidos se sintetizaron usando la metodología del fosforamido. La purificación de los análogos de oligonucleótidos 5'-O-DMT-ON ó 5'-O-DMT-OFF se consiguió usando cartuchos desechables de cromatografía en fase reversa o HPLC en fase inversa cuando fue necesario. Los espectros de masas por desorción de la matriz asistida por láser se obtuvieron para verificar el peso molecular y composición de monómero de muestras de oligonucleótido representativos. La electroforesis en gel capilar se realizó para verificar la pureza de muestras de oligonucleótidos representativos.

Las descripciones específicas siguientes se acompañan con las Figuras 2-41 y Tablas 1-10. A menos que se indique lo contrario, en los ejemplos siguientes, "LNA" designa la variante con enlace 2'-4' ilustrada con la Fórmula Z en la Figura 2.

Preparación de monómeros de LNA

Ejemplo 1

3-C-Alil-1,2-O-isopropilideno- α -D-ribofuranosa (OA)

Procedimiento 1

Una solución de 5-O-t-butildimetilsilil-1,2-O-isopropilideno- α -D-ribofuran-3-ulososa (Y, Yoshimura, T. Sano, A. Matsuda y T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, 36:162 (1988)) (17,8 g, 58,9 mmol) en THF anhidro (980 cm^3) se agitó a 0°C y se añadió bromuro de alilmagnesio 1M en éter anhidro (130 cm^3 , 130 mmol) gota a gota. Después de agitar durante 2 h, se añadió una solución saturada de cloruro amónico (800 cm^3) y se reextrajo la mezcla con diclorometano (3x400 cm^3). Se lavó la fase orgánica con salmuera (3x450 cm^3) y se secó (Na_2SO_4). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se disolvió en THF anhidro (700 cm^3). Se añadió una solución 1,1 M de fluoruro de tetrabutilamonio en THF (54,4 cm^3 , 59,8 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (1700 cm^3) y se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3x500 cm^3) y se secó (Na_2SO_4). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir furanosa OA como un material sólido blanco (9,42 g, 69%).

ES 2 242 291 T3

Procedimiento 2

Se sintetizó furanosa OA análogamente a partir de 5-O-t-butildifenilsilil-1,2-O-isopropilideno-e-D-ribofuran-3-
ulosa (T.F. Tam y B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 556 (1980)) (9,5 g, 22,2 mmol) usando: THF
anhidro (425 cm³); una solución 1 M de bromuro de alilmagnesio en éter anhidro (130 cm³, 130 mmol); una solución
saturada de cloruro amónico (490 cm³); éter para extracción (350+2×160 cm³); salmuera (2×160 cm³); una solución
1,1 M de fluoruro de tetrabutilamonio en THF (22,3 cm³, 24,6 mmol); THF anhidro (400 cm³); diclorometano (1400
cm³); una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×500 cm³); salmuera (500 cm³) y (Na₂SO₄). δ_{H} ((CD₃)₂
SO) 5,84 (1H, m, 2'-H), 5,65 (1H, d, J 3,8, 1-H), 5,12 (1H, d, J 6,1, 3'-H_a), 5,06 (1H, br s, 3'-H_b), 4,76 (1H, s, 3-OH),
4,64 (1H, t, J 5, 4, 5-OH), 4,16 (1H, d, J 3,8, 2-H), 3,84 (1H, dd, J 2,2, 8,1, 4-H), 3,56 (1H, ddd, J 2,3, 5,6, 11,8, 5-H_a),
3,42 (1H, m, 5-H_b), 2,16 (1H, dd, J 6,1, 14,3, 1'-H_a), 1,98 (1H, dd, J 8, 2, 14, 3, 1'-H_b), 1,46 (3 H, s, CH₃), 1,25 (3 H,
s, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 133,5 (C-2'), 117,9 (C-3'), 110,8 (C(CH₃)₂), 102,9 (C-1), 82, 6, 81, 0, 77,7 (C-2, C-3, C-4), 59,4
(C-5), 36,4 (C-1'), 26,4, 26,3 (CH₃) (Hallado: C, 57,4; H, 8,0; C₁₁H₁₈O₅ requiere: C, 57,4; H, 7,9%).

15 Ejemplo 2

3-C-Alil-3,5-di-O-bencil-1,2-O-isopropilideno- α -D-ribofuranosa (OB)

Una suspensión al 60% de hidruro sódico (4,9 g, 123 mmol) en DMF anhidro (100 cm³) se agitó a 0°C y una
solución de furanosa OA (9,42 g, 40,9 mmol) en DMF anhidro (65 cm³) se añadió gota a gota a lo largo de 45
minutos, se agitó la solución durante 1 hora a 50°C y se enfrió a 0°C. Se añadió una mezcla de bromuro de bencilo
(14,5 cm³, 121 mmol) y DMF anhidro (14,5 cm³) gota a gota, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18
h. La mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad y una solución del residuo en diclorometano (700 cm³) se lavó
con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×450 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo
presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando éter de petróleo/etilacetato
(9:1, v/v) como eluyente para rendir el compuesto OB como un aceite (14,5 g, 86%). δ_{H} (CDCl₃) 7,39-7,21 (10 H, m,
Bn), 5,92 (1H, m, 2'-H), 5,71 (1H, d, J 3,8, 1-H), 5,17-5,09 (2 H, m, 3'-H_a, 3'-H_b), 4,67 (2 H, m, Bn), 4,60 (1H, d, J
12,2, Bn), 4,52 (1H, d, J 12,1, Bn), 4,43 (1H, m, 4-H), 4,42 (1 H, d, J3,8, 2-H), 3,73 (1H, dd, J3,2, 10,8, 5-H_a), 3,66
(1H, dd, J7,4, 10,8, 5-H_b), 2,50 (1H, dd, J 7,7, 14,9, 1'-H_a), 2,39 (1H; dd, J 6, 5, 14, 9, 1'-H_b), 1,60 (3 H, s, CH₃), 1,34
(3 H, s, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 138,7, 138,1 (Bn), 132,6 (C-2'), 128,3, 128,2, 127,7, 127,5, 127,4, 127,4 (Bn), 118,5 (C-
3'), 112,6 (C(CH₃)₂), 104,1 (C-1), 86,5, 82,1, 80,4 (C-2, C-3, C-4), 73,4, 68,6 (Bn), 67,0 (C-5), 35,8 (C-1'), 26,8, 26,6
(CH₃). FAB-MS *m/z* 433 [M+Na]⁺ (Hallado: C, 73,4; H, 7,4; C₂₅H₃₀O₅ requiere: C, 73,2; H, 7,4%).

Ejemplo 3

35 3-C-Alil-1,2-di-O-acetil-3,5-di-O-bencil-D-ribofuranosa (OC)

Una solución de furanosa OB (12,42 g, 30,3 mmol) en ácido acético acuoso al 80% (150 cm³) se agitó a 90°C.
durante 3 h. Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se coevaporó con etanol (3×75 cm³), tolueno (3×75
cm³) y piridina anhidra (2×75 cm³) y redisolvió en piridina anhidra (60 cm³). Se añadió anhídrido acético (46 cm³)
y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 48 h. Se añadió una mezcla de hielo y agua (300 cm³) y la mezcla
resultante se extrajo con diclorometano (2×300 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada
de hidrógeno carbonato sódico (3×200 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se evaporó el solvente y el residuo se purificó usando
cromatografía en gel de sílice con éter de petróleo/acetato de etilo (4:1, v/v) como eluyente para rendir la mezcla
anomérica OC (β : α ~ 2:1) como un aceite (13,3 g, 97%). δ_{C} (CDCl₃) 169,7, 169,6 (C=O), 138,7, 138,4, 137,7, 137,6
(Bn), 132,4, 132,2 (C-2'), 128,4, 128,4, 128,2, 128,2, 127,8, 127,7, 127,7, 127,6, 127,3, 127,3, 126,9, 126,8 (Bn), 118,5
(C-3'), 5,99,4, 93,5 (C-1), 84,8, 83,7, 83,2, 82,0, 79,1, 75,5 (C-2, C-3, C-4), 73, 7, 73, 5, 69, 3, 68,7 (Bn), 66,1 (C-5),
35, 5, 34,9 (C-1), 21,1, 21,0, 20,7, 20,6 (CH₃) (Hallado: C, 68,7; H, 6,7; C₂₆H₃₀O₇ requiere: C, 68,8; H, 6,6%).

50 Ejemplo 4

1-(2-O-Acetil-3-C-alil-3,5-di-O-bencil- β -D-ribofuranosyl)timina (1)

A una solución agitada de la mezcla anomérica OC (β : α ~ 2:1, 11,8 g, 26,0 mmol) (P. Nielsen, H.M. Pfundheller
y J. Wengel, *Chem. Commun.*, 825 (1997); P. Nielsen, H.M. Pfundheller, C.E. Olsen y J. Wengel, *J. Chem. Soc.,
Perkin Trans. 1*, 1997, en prensa) y timina (6,55 g, 52,0 mmol) en acetonitrilo anhidro (250 cm³) se le añadió N,O-bis
(trimetilsilil)acetamida (44,9 cm³, 182 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 1 h y se enfrió hasta
0°C. Se añadió trimetilsilil triflato (8,00 cm³, 44,0 mmol) gota a gota y se agitó la solución a temperatura ambiente
durante 12 h. Se añadió una solución acuosa saturada y enfriada en hielo de hidrógenocarbonato sódico (270 cm³) y se
reextrajo la mezcla con diclorometano (3×125 cm³). La fase orgánica se lavó con soluciones saturadas de hidrógeno
carbonato sódico (2×125 cm³) y salmuera (2×125 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida
y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v)
como eluyente para rendir el nucleósido 1 como un material sólido blanco (11,6 g, 86%). δ_{H} (CDCl₃) 8,64 (1H, br s,
NH), 7,75 (1H, d, J 1,1, 6-H), 7,41-7,25 (10 H, m, Bn), 6,43 (1H, d, J 8,2, 1'-H), 5,88 (1H, m, 2''-H), 5,66 (1H, d, J
8,2, 2'-H), 5,12 (1H, s, 3''-H_a), 5,07 (1H, dd, J 1,5, 8, 5, 3''-H_b), 4, 85 (1H, d, J 11, 2, Bn), 4,64 (2 H, s, Bn), 4,63 (1H, d,
J 11,2, Bn), 4,33 (1H, br s, 4'-H), 3,81 (1H, dd, J 2,7, 11,1, 5'-H_a), 3,65 (1H, m, 5'-H_b), 2,81-2,65 (2 H, m, 1''-H_a, 1''-
H_b), 2,08 (3 H, s, COCH₃), 1,52 (3 H, d, J 0,8, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 170,1 (C=O), 163,6 (C-4), 150,9 (C-2), 138,1, 136,6
(Bn), 136,0 (C-6), 131,6 (C-2''), 128,8, 128,4, 128,3, 127,6, 127,5, 127,1 (Bn), 118,5 (C-3''), 111,1 (C-5), 84, 2, 83, 4,

ES 2 242 291 T3

83, 1, 77,4 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73,6, 69,2 (Bn), 65,6 (C-5'), 33,7 (C-1''), 20,8 (COCH₃), 11,9 (CH₃) (Hallado: C, 66,8; H, 6,3; N, 5,1. C₂₉H₃₂N₂O₇ requiere: C, 66,9; H, 6,2; N, 5,4%).

Ejemplo 5

5

1-(3-C-Alil-3,5-di-O-bencil-β-D-ribofuranosyl)timina (2)

A una solución agitada del nucleósido 1 (11,6 g, 22,3 mmol) en metanol (110 cm³) se le añadió metóxido sódico (3,03 g, 55,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y se neutralizó con ácido clorhídrico diluido dilute hydrochloric acid. El solvente se evaporó parcialmente y el residuo se disolvió en diclorometano (2×400 cm³). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×250 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida para rendir 2 como un material sólido blanco (10,1 g, 95%). δ_H (CDCl₃) 8,77 (1H, br s, NH), 7,58 (1H, d, J 1, 2, 6-H), 7,41-7,25 (10 H, m, Bn), 6,14 (1H, m, 2''-H), 6,12 (1H, d, J 7,8, 1'-H), 5,23 (1H, m, 3''-H_a), 5,17 (1H, br s, 3''-H_b), 4,68 (1H, d, J 10,8, Bn), 4,59 (2 H, s, Bn), 4,55 (1H, d, J 10,9, Bn), 4,39 (1H, br s, 4'-H), 4,26 (1H, dd J 7,8, 10,7, 2'-H), 3,84 (1H, dd, J 3,1, 11,0, 5'-H_a), 3,58 (1H, dd, J 1,4, 11,0, 5'-15 H_b), 3,04 (1H, d, J 10,8, 2'-OH), 2,82-2,78 (2 H, m, 1''-H_a, 1''-H_b), 1,51 (3 H, d, J 1,0, CH₃). δ_C (CDCl₃) 163,5 (C-4), 151,1 (C-2), 137, 3, 136,7 (Bn), 136,0 (C-6), 132,1 (C-2''), 128,8, 128,5, 128,3, 127,9, 127,6 (Bn), 118,4 (C-3''), 111,1 (C-5), 87,4, 82,6, 81,1, 79,3 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73,7, 69,8 (Bn), 64,7 (C-5'), 35,1 (C-1''), 11,9 (CH₃). (Hallado: C, 67,8; H, 6,1; N, 5,5. C₂₇H₃₀N₂O₆ requiere: C, 67,8; H, 6,3; N, 5,9%).

20

Ejemplo 6

1-(3-C-Alil-3,5-di-O-bencil-2-O-metanosulfonil-β-D-ribofuranosil)timina (3)

A una solución agitada del nucleósido 2 (3,50 g, 7,31 mmol) en piridina anhidra (23 cm³) a 0°C se le añadió cloruro de metanosulfonilo (1,69 cm³, 21,89 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, se añadió agua (100 cm³) y se realizó la extracción usando diclorometano (3×150 cm³). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×200 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1) como eluyente para rendir 3 como un material sólido blanco (3,64 g, 89%). δ_H (CDCl₃) 8,95 (1 H, br s, NH), 7,71 (1H, d, J 1,1, 6-H), 7,39-7,25 (10 H, m, Bn), 6,52 (1H, d, J 8, 0, 1' -H), 5,90 (1H, m, 2''-H), 5,34 (1H, d, J 7,9, 2'-H), 5,20-5,09 (2 H, m, 3''-H_a, 3''-H_b), 4,91 (1H, d, J 11,2, Bn), 4,68 (1H, d, J 11,3, Bn), 4,64 (2 H, s, Bn), 4,33 (1H, br s, 4' -H), 3,81 (1H, dd, J 2,5, 11,1, 5'-H_a), 3,73 (1H, dd, J 1,1, 11,1, 5'-H_b), 3,08 (1H, dd, J 5,5, 5,7, 1''-H_a), 2,99 (3 H, s, CH₃), 2,68 (1H, m, 1''-H_b), 1,51 (3 H, d, J 0,8, CH₃). 8C (CDCl₃) 163,4 (C-4), 150,8 (C-2), 137,9, 136,3 (Bn), 135,5 (C-6), 131,0 (C-2''), 128,8, 128,3, 127,5, 127,2 (Bn), 119,3 (C-3''), 111,6 (C-5), 84,1, 83,6, 82,4, 82,2 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73,7, 68,9 (Bn), 66,2 (C-5'), 38,7 (CH₃), 33,0 (C-1''), 11,9 (CH₃) (Hallado: C, 60,5; H, 5,8; N, 4,9. C₂₈H₃₂N₂O₈S requiere: C, 60,4; H, 5,8; N, 5,0%).

35

Ejemplo 7

40

1-(3-C-Alil-3,5-di-O-bencil-β-D-arabinofuranosil)timina (4)

Una solución del nucleósido 3 (3,59 g, 6,45 mmol) en etanol (72 cm³), agua (72 cm³) y hidróxido sódico acuoso 1 M (20,6 cm³) se agitó bajo reflujo durante 18 h. Después de su neutralización con ácido clorhídrico diluido, se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (3×150 cm³). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×200 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir 4 como un material sólido blanco (2,32 g, 74%). δ_H (CDCl₃) 7,60 (1H, d, J 1,2, 6-H), 7,50-7,23 (10 H, m, Bn), 6,22 (1H, d, J 2,9, 1'-H), 5,80 (1H, m, 2''-H), 5,15-5,08 (2 H, m, 3''-H_a, 3''-H_b), 4,86-4,33 (6 H, m, 2×Bn, 2'-H, 4'-H), 3,82-3,71 (2 H, m, 5'-H_a, 5'-H_b), 2,72 (1H, m, 1''-H), 2,52 (1H, dd, J 7,6, 16,1, 1''-H_b), 1,70 (3 H, d, J 0,9, CH₃). δ_C (CDCl₃) 165,1 (C-4), 150,4 (C-2), 138,4, 136,8 (Bn), 137,7 (C-6), 132,3 (C-2''), 128,77 128,4, 128,3, 128,0, 127,9, 127,6 (Bn), 118,5, (C-3''), 107,8 (C-5), 88,0, 87,8, 83,7 (C-1', C-3', C-4'), 73,7, 72,9, 69,4 (Bn, C-2'), 64,7 (C-5'), 31,1 (C-1''), 12,4 (CH₃) (Hallado: C, 67,5; H, 6,3; N, 5,3. C₂₇H₃₀N₂O₆O, 0,25H₂O requiere: C, 67,1; H, 6,4; N, 5,8%).

55

Ejemplo 8

1-(3,5-Di-O-bencil-3-C-(2-hidroxietil)-β-D-arabinofuranosil)timina (5)

A una solución agitada del nucleósido 4 (2,26 g, 4,68 mmol) en THF (12 cm³) y agua (12 cm³) se añadió periodato sódico (3,04 g, 14,2 mmol) y una 2,5% solución de tetraóxido de osmio en tert-butanol (p/p, 0,603 cm³, 40 μmol). se agitó la solución a temperatura ambiente durante 45 min. Se añadió agua (25 cm³) y se extrajo la solución con diclorometano (2×50 cm³). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×30 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se redisolvió en THF (12 cm³) y agua (12 cm³). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se añadió borohidruro de sodio (182 mg, 4,71 mmol) se añadió. Después de agitar durante 1,5 h, se añadió agua (25 cm³) y se extrajo la solución con diclorometano (2×50 cm³). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×30 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice

ES 2 242 291 T3

usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir 5 como un material sólido blanco (1,13 g, 49%). δ_{H} (CDCl_3) 9,29 (1H, br s, NH), 7,47 (1H, d, J 1,1, 6-H), 7,38-7,25 (10 H, m, Bn), 6,22 (1H, d, J 3,4, 1'-H), 4,62 (2 H, s, Bn), 4,60 (1H, m, 4'-H), 4,46 (2 H, s, Bn), 4,35 (1H, dd, J 3,4, 7,5, 2'-H), 3,83-3,73 (4 H, m, 2 \times 5'-H, 2 \times 2''-H), 2,67 (1 H, br s, OH), 2,07-2,01 (2 H, m, 2 \times 1''-H), 1,77 (3 H, d, J 0,5, CH_3). δ_{C} (CDCl_3) 164,3 (C-4), 150,3 (C-2), 137,6, 137,4 (Bn, C-6), 136,7 (Bn), 128,6, 128,4, 128,2, 127,8, 127,6, 127,3, 127,1 (Bn), 108,4 (C-S), 88,0, 87,7, 81,6, 74,7 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73,7, 69,6 (Bn), 64,6 (C-5'), 57,7 (C-2''), 28,6 (C-1''), 12,4 (CH_3). FAB-MS m/z 483 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 505 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Hallado: C, 63,6; H, 6,2; N, 5,4. $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7$, 0,5 H_2O requiere: C, 63,5; H 6,4; N, 5,7%).

Ejemplo 9

(1*S*,5*R*,6*R*,8*R*)-5-Hidroxi-6-(hidroximetil)-8-(timin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]-octane (6)

Una solución de el nucleósido 5 (1,08 g, 2,20 mmol) en piridina anhidra (5,0 cm^3) se agitó a 0°C y se añadió gota a gota una solución de cloruro de p-toluensulfonilo (462 mg, 2,47 mmol) en piridina anhidra (2,0 cm^3). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 h y de adicionar una mezcla de agua y hielo (70 cm^3), se realizó la extracción con diclorometano (2 \times 75 cm^3). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3 \times 50 cm^3) y se secó (Na_2SO_4). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir un intermediario que, después de la evaporación, se disolvió en DMF anhidro (4,0 cm^3). La solución se añadió gota a gota a una suspensión agitada de hidruro sódico al 60% (203 mg, 4,94 mmol) en DMF anhidro (4,0 cm^3) a 0°C. La mezcla se agitó durante 18 h y se añadió agua (20 cm^3). Después de la neutralización con ácido clorhídrico, se añadió diclorometano (75 cm^3). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3 \times 50 cm^3) y se secó (Na_2SO_4). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir material sólido blanco (858 mg). Una solución de material sólido blanco (846 mg, 1,80 mmol) en etanol (10,0 cm^3) se agitó a temperatura ambiente y se añadió hidróxido de paladio al 20% sobre carbón (400 mg). La mezcla se desgasó con argón y se colocó en una atmósfera de hidrógeno. Después de agitarla durante 2 h, la mezcla se purificó directamente mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (97:3, v/v) como eluyente para rendir 6 como un material sólido blanco (444 mg, 82%). δ_{H} ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 11,3 (1H, br s, NH), 7,36 (1H, d, J 1,1, 6-H), 5,80 (1H, d, J 4,3, 1'-H), 5,61 (1H, s, OH), 4,86 (1H, m, 5'-H_a), 3,89 (1H, d, J 4,2, 2'-H), 3,85 (1H, m, 2''-H_a), 3,83-3,64 (3 H, m, 4'-H, 5'-H_b, 2''-H_b), 2,14 (1H, m, 1''-H_a), 1,81 (1H, m, 1''-H_b), 1,78 (3 H, d, J 1,0, CH_3). δ_{C} CD_3OD 166,7 (C-4), 152,2 (C-2), 139,7 (C-6), 110,1 (C-5), 89,4, 89,1, 85,5, 85,2 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 71,4 (C-2''), 61,6 (C-5''), 37,0 (C-1''), 12,7 (CH_3) (Hallado: C, 47,4; H, 5,7; N, 9,0. $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$, H_2O requiere: C, 47,7; H, 6,0; N, 9,3%).

Ejemplo 10

(1*S*,5*R*,6*R*,8*R*)-6-(4,4'-Dimetoxitritiloximetil)-5-hidroxi-8-(timin-1-il)-2,7-dioxa-bicyclo[3.3.0]nonano (7)

Una solución del nucleósido 6 (310 mg, 1,09 mmol) en piridina anhidra (2,5 cm^3) se agitó a temperatura ambiente y se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritil (593 mg, 1,83 mmol). Después de agitar durante 3 h, se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritil adicional (100 mg, 0,310 mmol). Después de agitar durante otras 2 h, se añadió metanol (0,5 cm^3) y la mezcla se evaporó. El residuo se disolvió en diclorometano (5 cm^3) y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (3 \times 5 cm^3). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice con diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir 7 como un material sólido blanco (618 mg, 97%). δ_{H} (CDCl_3) 9,04 (1H, br s, NH), 7,47-7,16 (10 H, m, 6-H, DMT), 6,86-6,82 (4 H, m, DMT), 6,06 (1H, d, J 4,1, 1'-H), 4,35 (1H, d, J 4,1, 2'-H), 4,03 (1H, m, 4'-H), 3,89 (1H, m, 2''-H_a), 3,79 (6 H, s, 2 \times OCH₃), 3,61 (1H, m, 5'-H_a), 3,32-3,26 (2 H, m, 5'-H_b, 2''-H_b), 1,94-1,69 (2 H, m, 1''-H, 1''-H_b), 1,89 (3 H, s, CH_3). δ_{C} (CDCl_3) 163,4 (C-4), 158,6 (DMT), 150,1 (C-2), 144,3 (DMT), 137,2 (C-6), 135,6, 135,3, 129,9, 129,9, 128,9, 128,1, 127,9, 126,9, 125,2, 113,2 (DMT), 109,3 (C-5), 88,7, 87,3, 86,9, 83,5, 81,0 (DMT, C-1', C-2', C-3', C-4'), 69,7 (C-2''), 62,1 (C-5'), 55,1 (OCH₃), 36,5 (C-1''), 12,5 (CH_3).

Ejemplo 11

(1*S*,5*R*,6*R*,8*R*)-5-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)phosfihinoxi)-6-(4,4'-dimetoxi-tritiloximetil)-8-(timin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]nonano (8)

Una solución de el nucleósido 7 (436 mg, 0,743 mmol) en diclorometano anhidro (2,2 cm^3) y diisopropiletilamina (0,62 cm^3) se agitó a temperatura ambiente y se añadió 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,33 cm^3 , 1,46 mmol). Después de agitar durante 1,5 h, se añadieron metanol (0,4 cm^3) y acetato de etilo (5 cm^3) y la mezcla se lavó con solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (3 \times 5 cm^3) y salmuera (3 \times 5 cm^3). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/trietilamina (97:3, v/v) como eluyente, se evaporaron los solventes para rendir un aceite que se disolvió en tolueno (1 cm^3), y la precipitación a partir de hexano a -30°C rindió 8 como un material sólido blanco (517 mg, 88%). δ_{P} (CDCl_3) 142,0, 141,9.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 12

1-(3,5-Di-O-bencil-3-C-(2-hidroxietil)-β-D-ribofuranosyl)timina (9)

5 A una solución agitada del nucleósido 2 (1,00 g, 2,09 mmol) en THF (5,4 cm³) y agua (5,4 cm³) se le añadió periodato sódico (1,34 g, 6,27 mmol) y una solución al 2,5% de tetraóxido de osmio en tert-butanol (p/p, 0,265 cm³, 19 μmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 45 min. Se añadió agua (25 cm³) y se extrajo la solución con diclorometano (2×50 cm³). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×30 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se redisolvió en THF (5,4 cm³) y agua (5,4 cm³). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se añadió borohidruro de sodio (79 mg, 2,08 mmol). Después de agitar durante 1,5 h, se añadió agua (25 cm³) y se extrajo la solución con diclorometano (2×50 cm³). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×30 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 9 como un material sólido blanco (488 mg, 48%). δ_H (CDCl₃) 9,14 (1H, br s, NH), 7,60 (1H, d, J 1,1, 6-H), 7,40-7,22 (10H, m, Bn), 6,25 (1H, d, J 7,7, 1'-H), 4,59 (1H, d, J 7,1 Bn), 4,49 (1H, d, J 7,1 Bn), 4,39-3,30 (m, 8H, 4'-H, 2'-H, Bn, 5'-H_a, 5'-H_b, 2''-H_a, 2''-H_b), 2,23-2,00 (2H, m, 1''-H_a, 1''-H_b), 1,49 (3H, d, J 0,7, CH₃). δ_C (CDCl₃) 163,5 (C-4), 151,2 (C-2), 137,1, 136,5 (Bn), 135,7 (C-6), 128,7, 128,5, 128,2, 127,8, 127,6, 127,2 (Bn), 111,3 (C-5), 87,0, 82,7, 81,1, 78,3 (C-1', -2', C-3', C-4'), 73,7, 69,6 (Bn), 64,4 (C-5'), 57,0 (C-2''), 32,4 (C-1''), 11,8 (CH₃) (Hallado: C, 63,9; H, 6,3; N, 5,4. C₂₆H₃₀N₂O₇, 0,25H₂O requiere: C, 64,1; H, 6,3; N, 5,75%).

Ejemplo 13

1-[3C-(2-O-t-Butildimetilsilyloxi)etil]-3,5-di-O-bencil-β-D-ribofuranosil]timina (10)

25 Una mezcla del nucleósido 9 (1,80 g, 3,4 mmol) y cloruro de t-butildimetilsililo (0,585 g, 3,9 mmol) se disolvió en piridina anhidra (20 cm³). Transcurridas 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad, se coevaporó dos veces con tolueno (2×10 cm³) y se redisolvió en diclorometano (150 cm³). Se lavó la solución con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×50 cm³) y se evaporó para rendir una espuma. Este material se purificó mediante HPLC preparativa con gel de sílice usando elución con gradiente (0-3% metanol en diclorometano, v/v) para rendir el nucleósido 10 como un material sólido blanco (1,86 g, 92%). δ_H (CDCl₃) 7,61 (1H, d, J 1,1, 6-H), 7,35-7,20 (10H, m, Bn), 6,27 (1H, d, J 7,9, 1'-H), 4,65-4,40 (4H, m, Bn, 2'-H), 4,37 (1H, s, Bn), 4,28 (1H, t, J 7,9, 4'-H), 4,35-3,55 (4H, m, 2''-H_a, 2''-H_b, 5'-H_a, 5'-H_b), 2,30-2,05 (2H, m, 1''-H_a, 1''-H_b), 1,46 (3H, s, 5-CH₃), 0,90 (9H, m, CH₃-C-Si), 0,08 (6H, m, CH₃-Si). δ_C (CDCl₃) 163,6 (C-6), 151,0 (C-2), 137,5, 136,6, 135,8 (C-5, Bn), 128,3, 128,1, 127,8, 127,2, 127,1, 126,8, 126,7 (Bn), 110,7 (C-4), 86,8, 82,5, 81,6, 78,3 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73,3, 69,8 (Bn), 64,46 (C-5'), 58,2 (C-2''), 32,9 (C-1''), 25,6, 25,4, 17,9, -3,9, -5,7 (TBDMS), 11,6 (CH₃). FAB⁺-MS: m/z 597,19 [M+H]⁺, 619,18 [M+Na]⁺ (Hallado: C, 64,2; H, 7,4; N, 4,2; C₃₂H₄₄O₇N₂Si requiere: C, 64,4; H, 7,4; N, 4,7%).

Ejemplo 14

1-[3-C-(2-t-Butildimetilsilyloxi)etil]-3,5-di-O-bencil-β-D-erythro-pentofuran-2-ulosil]timina (11)

45 Se suspendió una mezcla del nucleósido 10 (2,14 g, 3,59 mmol), 1,48 g (3,95 mmol) de dicromato de piridina (1,48 g, 3,95) y polvo de tamiz molecular 3A activado (4 g) en 1 diclorometano anhidro (80 cm³). Después de enfriar la mezcla hasta -10°C, se añadió gota a gota anhídrido acético (10 cm³, 98 mmol) bajo agitación energética. Se dejó atemperar la muestra hasta la temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 1,5 h, después de lo cual se 5 detuvo la reacción mediante la adición de trietilamina (20 cm³). La mezcla se diluyó con diclorometano hasta 300 cm³ y se lavó con agua (2×200 cm³). La fase orgánica se evaporó, y el residuo se purificó mediante *flash*-cromatografía con gel de sílice usando un gradiente de 1,0, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5% de metanol en diclorometano (v/v, total volume 250 cm³ cada uno) para rendir el nucleósido 11 (1,89 g, 84,4%) como un material sólido blanco. δ_H (CDCl₃) 7,35-7,20 (11H, m, Bn, 6-H), 6,40 (1H, s, 1'-H), 4,57 (1H, s, Bn), 4,52 (1H, s, Bn), 4,46 (1H, d, J 11,0, Bn), 4,29 (1H, d, J 11,0, Bn), 4,07 (1H, dd, J' 0, 5, 2,2, 4'-H), 3,95-3,70 (4H, m, 2''-H_a, 2''-H_b, 5'-H_a, 5'-H_b), 2,05 (1H, m, 1''-H_a), 2,42 (1H, m, 1''-H_b), 1,42 (3H, d, J 1,1, 5-CH₃), 0,86 (9H, s, CH₃-C-Si), 0,01 (6H, s, CH₃-Si). δ_C (CDCl₃) 202,6 (C-2'), 163,7 (C-4), 151,2 (C-2), 137,7, 136,6, 136,5 (Bn, C-6), 128,7, 128,5, 128,2, 128,1, 127,7, 126,4, 126,3 (Bn), 110,9 (C-5), 84,5, 81,3, 80,2 (C-1', C-3', C-4'), 73,6, 70,4 (Bn), 66,0 (C-5'), 57,6 (C-2''), 27,3 (C-1''), 25,9, 25,7, 18,2, -5,8, -5,9 (TBDMS), 11,7 (CH₃). FAB-MS m/z 595,14 [M+H]⁺ (Hallado: C, 64,1; H, 6,9; N, 4,5; C₃₂H₄₂O₇N₂Si requiere: C, 64,6; H, 7,1; N, 4,7%).

Ejemplo 15

(1S,5R,6R,8R)-1-Hidroxil-5-benciloxi-6-benciloxi-metil-8-(timin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano (12)

65 El compuesto 11 (1,80 g, 3,3 mmol) se disolvió en 0,5% HCl en metanol (p/p, 20 cm³) y la mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la evaporación hasta la sequedad, el residuo se disolvió en diclorometano (100 cm³) y se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×40 cm³). La fase orgánica se lavó y el residuo se purificó mediante *flash*-cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con metanol al 2% en diclorometano (v/v) para rendir el nucleósido 12 (1,35 g, 93,5%) como un material sólido blanco. δ_H (CDCl₃) 7,37-

ES 2 242 291 T3

7,27 (1H, m, Bn, 6-H), 5,87 (1H, s, 1'-H), 4,71 (2H, s, Bn), 4,64 (1H, d, J 12,0, Bn), 4,56 (1H, d, J 12,0, Bn), 4,36 (1H, t, J 5,7, 4'-H), 4,16 (1H, m, 2''-H_a), 3,96 (1H, m, 2''-H_b), 3,74 (2H, m, 5'-H_a, 5'-H_b), 2,35-2,15 (2H, m, 1''-H_a, 1''-H_b), 1,88 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 163,7 (C-4), 151,4 (C-2), 137,8, 137,3, 136,7 (Bn, C-6), 128,5, 128,4, 128,0, 127,8, 127,5 (Bn), 109,9 (C-5), 108,6 (C-2'), 88,8, 87,1, 80,9 (C-1', C-3', C-4'), 73,6, 68,5, 68,1, 67,9 (C-5', C-2'', Bn), 30,9 (C-1''), 12,6 (CH₃). FAB-MS: m/z 481,03 [M+H]⁺, 503,02 [M+Na]⁺ (Hallado: C, 64,6; H, 5,8; N, 5,7; C₂₆H₂₈O₇N₂ requiere: C, 65,0; H, 5,9; N, 5,8%).

Ejemplo 16

10 (1S,5R,6R,8R)-1,5-Dihidroxi-6-hidroximetil-8-(timin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano (13)

El compuesto 13 se derivó exitosamente del compuesto 12 mediante supresión catalítica del grupo protector bencilo de la misma forma descrita en la preparación de 6. La purificación de 13 se realizó mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con gradiente de concentraciones (6 al 14%) de metanol en diclorometano. Adicionalmente se purificaron cantidades analíticas del compuesto 13 (hasta 15 mg) mediante HPLC con fase inversa en una columna (10x250 mm) rellena con Nucleosil C18 (10 μ m). Velocidad de flujo: 8 cm³/min; eluyente: 0-10% acetonitrilo en 60 min. Rendimiento: 82%. δ_H (CD₃OD) 7,44 (1H d, J 1,2, 6-H), 5,83 (1H, s, 1'-H), 4,10-3,80 (5H, m, 5'-H_a, 5'-H_b, 2''-H_a, 2''-H_b, 4'-H), 2,39-2,25 (1H, m, 1''-H_a), 2,00-1,90 (1H, m, 1''-H_b), 1,87 (3H, d, J 1,2, CH₃). δ_C (CD₃OD) 166,3 (C-4), 152,7 (C-2), 139,8 (C-6), 110,0, 109,6 (C-2', -5), 87,8, 85,8, 84,6 (C-1', C-3', C-4'), 68,8, 61,6 (C-5', C-2''), 35,6 (C-1''), 12,4 (CH₃). FAB-MS: m/z 301,03 [M+H]⁺ (Hallado: C, 46,6; H, 5,7; N, 8,5; C₁₂H₁₆O₇N₂ requiere: C, 48,0; H, 5,4; N, 9,3%).

Ejemplo 17

25 (1S,5R,6R,8R)-5-Benciloxi-6-benciloximetil-1-metoxi-8-(3-N-metiltimin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano (14), (1S,5R,6R,8R)-5-Benciloxi-6-benciloximetil-1-hidroxi-8-(3-N-metiltimin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano (15) y (1S,5R,6R,8R)-5-Benciloxi-6-benciloximetil-1-metoxi-8-(timin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano (16)

Una mezcla del compuesto 12 (1,04 g, 2,16 mmol) e hidruro sódico (171 mg de una suspensión al 60% en aceite mineral, 4,30 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (4 cm³) durante 10 minutos con agitación. Se añadió yoduro de metilo (1 cm³, 16 mmol) y la mezcla de reacción se incubó a 36°C durante 23 h. Después de la evaporación, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0,4-2, de metanol al 4% en diclorometano (v/v) para rendir los productos 14, 15 y 16 y el material de partida 12 (212 mg, 20,5%). Compuesto 14 (47 mg, 4,3%). δ_H (CDCl₃) 7,25-7,37 (11H, m, Bn, 6-H), 6,15 (1H, s, 1'-H), 4,74 (1H, d, J 11,5, Bn), 4,67 (1H, d, J 11,3, Bn), 4,62 (1H, d, J 12,1, Bn), 4,55 (1H, d, J 11,9, Bn), 4,34 (1H, t, J 5,6, 4'-H), 3,99, (1H, m, 2''-H_a), 4,22 (1H, m, 2''-H_b), 3,72 (2H, m, 5'-H_a, 5'-H_b), 3,41 (3H, s, CH₃-O), 3,35 (3H, s, CH₃-N³), 2,27 (1H, m, 1''-H_a), 2,41 (1H, m, 1''-H_b), 1,93 (3H, s, 5-CH₃). δ_C (CDCl₃) 163,3 (C-4), 151,0 (C-2), 138,2, 137,3, 135,7 (Bn, C-6), 128,3, 128,2, 127,8, 127,6, 127,4, 126,9 (Bn), 111,8 (C-5), 108,5 (C-2'), 89,1, 84,8, 79,5 (C-1', C-3', C-4'), 73,5, 68,4, 68,2, 67,3 (Bn, C-5', C-2''), 50,8 (CH₃-O), 32,6 (C-1''), 27,9 (CH₃-N), 13,2 (CH₃). FAB-MS: m/z 508,88 [M+H]⁺ (Hallado: C, 65,7; H, 6,9; N, 4,8; C₂₈H₃₂O₇N₂ requiere: C, 66,1; H, 6,3; N, 5,5%). Compuesto 15 (97 mg, 9,1%). δ_H (CDCl₃) 7,37-7,28 (11H, m, Bn, 6-H), 5,86 i (1H, s, 1'-H), 4,72 (2H, s, Bn), 4,64 (1H, d, J 11,9, Bn), 4,58 (1H, d, J 11,9, Bn), 4,37 (1H, t, J 5,6, 4'-H), 4,13 (1H, m, 2''-H_a), 3,93 (1H, m, 2''-H_b), 3,75 (2H, m, 5'-H_a, 5'-H_b), 3,34 (1H, s, CH₃-N), 2,32-2,16 (2H, m, 1''-H_a, 1''-H_b), 1,93 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 163,2 (C-4), 151,9 (C-2), 137,5, 137,1, 134,0 (Bn, C-6), 128,4, 128,3, 128,1, 127,9 127,7, 127,6, 127,3 (Bn), 108,8, 108,5 (C-2', C-5), 88,7 (C-1'), 88,0, 81,0 (C-3', C-4'), 73,5, 68,3, 67,9, 67,7 (Bn, C-5', C-2''), 30,6 (C-1''), 27,8 (CH₃-N), 13,2 (CH₃). FAB-MS m/z 495,28 [M+H]⁺, 517,24 [M+Na]⁺. Compuesto 16 (665 mg, 62,3%). δ_H (CDCl₃) 7,35-7,25 (11H, m, Bn, 6-H), 6,06 (1H, s, 1'-H), 4,73 (1H, d, J 11,5, Bn), 4,66 (1H, d, J 11,3, Bn), 4,61 (1H, d, J 11,9, Bn), 4,55 (1H, d, J 12,0, Bn), 4,34 (1H, t, J 5,6, 4'-H), 4,20 (1H, m, 2''-H_a), 3,98 (1H, m, 2''-H_b), 3,72 (2H, m, 5'-H_a, 5'-H_b), 3,40 (3H, s, CH₃-O), 2,45-2,35 (1H, m, 1''-H_a), 2,30-2,20 (1H, m, 1''-H_b), 1,90 (3H, d, J 1,1, CH₃). δ_C (CDCl₃) 163,2 (C-4), 150,1 (C-2), 138,2, 137,9, 137,3 (Bn, C-6), 128,4, 128,2, 127,8, 127,6 127,4, 127,1 (Bn), 110,8 (C-5), 109,3 (C-2'), 89,2, 84,2, 79,6 (C-1', C-3', C-4'), 73,6, 68,5, 68,3, 67,4 (Bn, C-5', C-2''), 50,8 (CH₃-O), 32,6 (C-1''), 12,5 (CH₃). FAB-MS m/z 495,22 [M+H]⁺, 517,23 [M+Na]⁺ (Hallado: C, 66,2; H, 7,2; N, 4,4; C₂₇H₃₀O₇N₂ requiere: C, 65,6; H, 6,1; N, 5,7%).

Ejemplo 18

55 (1S,5R,6R,8R)-5-Hidroxi-6-hidroximetil-1-metoxi-8-(timin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano (17)

A una solución del nucleósido 16 (1,20 g, 2,43 mmol) en metanol (10 cm³) se le añadió hidróxido de paladio al 20% sobre carbón vegetal (250 mg) y la mezcla se desgasó cuidadosamente bajo presión reducida. Se le proporcionó una atmósfera de hidrógeno y se continuó la agitación durante 12 h. El catalizador se retiró mediante filtración de la mezcla de reacción a través de una columna de vidrio (1x8 cm) rellena con gel de sílice en metanol. La columna se lavó adicionalmente con metanol (20 cm³). Se recogieron todas las fracciones, se evaporó hasta la sequedad y se coevaporó con éter de petróleo para rendir un sólido parecido al vidrio. Este residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradient de 5-10% metanol en diclorometano (v/v). Las fracciones que contenían el producto se recogieron, combinaron se evaporaron hasta la sequedad. El residuo se disolvió en metanol anhidro (5 cm³) y se añadió benceno anhidro (100 cm³). La liofilización rindió el nucleósido 17 (0,61 g, 79%) como un material sólido blanco. δ_H (CD₃OD) 7,45 (1H, s, 6-H), 5,93 (1H, s, 1'-H), 4,15-3,81 (5H, m, 5'-H_a, 5'-H_b, 2''-H_a, 2''-H_b, 4'-H), 3,43 (3H, s, CH₃-O), 2,47-2,40 (1H, m, 1''-H_a), 2,03-1,93 (1H, m, 1''-H_b), 1,92 (3H, s, CH₃). δ_C (CD₃OD) 164,1

ES 2 242 291 T3

(C-4), 150,1 (C-2), 138,3 (C-6), 109,6 (C-5), 108,3 (C-2'), 84,4, 84,1, 82,4 (C-1', C-3', C-4'), 68,0, 59,5 (C-5', C-2''), 49,6 (CH₃-O), 34,0 (C-1''), 10,5 (CH₃). FAB-MS m/z 315,13 [M+H]⁺, 337,09 [M+Na]⁺ (Hallado: C, 49,9; H, 5,7; N, 8,2; C₁₃H₁₈O₇N₂ requiere: C, 49,7; H, 5,8; N, 8,9%).

5 Ejemplo 19

(1S,5R,6R,8R)-6-(4,4'-Dimetoxitritiloximetil)-5-hidroxi-1-metoxi-8-(timin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano (18)

Una mezcla del compuesto 17 (0,95 g, 3,03 mmol) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1,54 g, 4,77 mmol) se disolvió en piridina anhidra (20 cm³) y se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó para rendir un residuo aceitoso que se coevaporó con tolueno (2×20 cm³). Se añadieron diclorometano (50 cm³) y una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (50 cm³), se separó la fase 5 orgánica y evaporó, y el residuo se purificó mediante HPLC en gel de sílice (el residuo se disolvió en la mínima cantidad de diclorometano conteniendo un 0,5% de trietilamina (v/v) y se aplicó a la columna equilibrada con el mismo solvente. Se lavó la columna (etilacetato:éter de petróleo:trietilamina; 15:84,5:0,5 (v/v/v, 1000 cm³) y el producto se eluyó en un gradiente de metanol (0-2%) en diclorometano conteniendo el 0,5% de trietilamina (v/v/v) para rendir el compuesto 18 (1,71 d, 92,8%) como material sólido blanco. δ_{H} (CDCl₃) 7,51-7,17 (10H, m, DMT, 6-H), 6,79-6,85 (4H, m, DMT), 6,04 (1H, s, 1'-H), 4,12-3,98 (3H, m, 5'-H_a, 5'-H_b, 4'-H), 3,77 (6H, s, CH₃-DMT), 3,49 (3H, s, CH₃-O), 3,45-3,32 (2H, m, 2''-H_a, 2''-H_b), 2,11-2,01 (1H, m, 1''-H), 1,94-1,87 (1H, m, 1''-H_b), 1,93 (3H, s, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 164,2 (C-4), 158,6, 144,7, 135,7, 130,1, 128,2, 127,9, 126,8, 113,2 (DMT), 150,7 (C-2), 137,7 (C-6), 109,8, 109,7 (C-5, C-2'), 86,5, 85,3, 85,0, 81,4 (DMT, C-1', C-3', C-4'), 69,2, 62,4 (C-5', C-2''), 55,2 (CH₃-DMT), 51,7 (CH₃-O), 35,5 (C-1''), 12,7 (CH₃). FAB-MS m/z 617,26 [M+H]⁺, 639,23 [M+Na]⁺ (Hallado: C, 66,4; H, 6,1; N, 4,2; C₃₄H₃₆O₉N₂ requiere: C, 66,2; H, 5,9; N, 4,5%).

Ejemplo 20

(1S,5R,6R,8R)-5-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-6-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-1-metoxi-8-(timin-1-il)-2,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano (19)

El compuesto 18 (1,2 g, 1,95 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (10 cm³). Se añadieron N,N-diisopropililamina (1,35 cm³, 7,8 mmol) y 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,92 g, 3,9 mmol) con agitación a temperatura ambiente. Transcurridas 72 h, la mezcla se diluyó hasta 100 cm³ con diclorometano y se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (50 cm³). La fase orgánica se evaporó y se aplicó a una purificación mediante HPLC en gel de sílice usando un gradiente de eluyente B (éter de petróleo:diclorometano:acetato de etilo:piridina; 45:45:10:0,5; v/v/v) en eluyente A (éter de petróleo:diclorometano:piridina; 50:50:0,5; v/v/v). Las fracciones conteniendo el producto se concentraron, coevaporaron con tolueno, (10 cm³) y se secaron bajo presión reducida. El residuo se disolvió en benceno anhidro (20 cm³) y se precipitó mediante la adición de esta solución en éter de petróleo anhidro (400 cm³) con agitación. El sólido blanco resultante se aisló mediante filtración y se secó para rendir el compuesto 19 (0,96 g, 60,3%). δ_{P} (CDCl₃) 142,64, 142,52. FAB-MS m/z 817,26 [M+H]⁺, 839,24 [M+Na]⁺ (Hallado: C, 62,8; H, 6,4; N, 6,9; C₄₃H₅₃O₁₀N₄P requiere: C, 63,2; H, 6,5; N, 6,9%).

Ejemplo 21

1,2-O-Isopropilideno-3-C-vinil- α -D-ribofuranosa (20)

Una solución de 5-O-t-butildimetilsilil-1,2-O-isopropilideno- α -D-eritro-pent-3-ulo furanosa (Y. Yoshimura, T. Sano, A. Matsuda, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 162 (1988)) (6,05 g, 0,020 mol) en THF anhidro (250 cm³) se agitó a 0°C y se añadió gota a gota una solución 1 M de bromuro de vinilmagnesio en éter (44 cm³, 44 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, después de lo cual se añadió cloruro amónico acuoso saturado (200 cm³), y se realizó la extracción usando diclorometano (3×300 cm³). El extracto combinado se lavó con salmuera (3×250 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente y el residuo se redisolvió en THF anhidro (225 cm³). A esta mezcla se le añadió una solución 1 M de fluoruro de tetrabutilamonio en THF (22 cm³, 22 mmol), la agitación a temperatura ambiente se prosiguió durante 20 min, después de lo cual, la mezcla se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (500 cm³) y se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×200 cm³). La fase acuosa se extrajo usando extracción continua durante 12 h y se secó (Na₂SO₄) y evaporó el extracto combinado. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir furanosa 20 como un material sólido blanco (3,24 g, 75%). δ_{H} (CDCl₃) 5,84 (1H, d, J 3,7, 1-H), 5,74 (1H, dd, J 11,0, 17,2, 1'-H), 5,52 (1H, dd, J 1,6, 17,1, 2'-H_a), 5,29 (1H, dd, J 1,3, 11,0, 2'-H_b), 4,21 (1H, d, J 3,7, 2-H), 3,98 (1H, t, J 5,7, 4-H), 3,68-3,64 (2H, m, 5-H_a, 5-H_b), 2,88 (1H, s, 3-OH), 1,99 (1H, t, J 6, 3, 5-OH), 1,60 (3H, s, CH₃), 1,35 (3H, s, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 133,6 (C-1'), 116,2 (C-2'), 113,0 (C(CH₃)₂), 103,8 (C-1), 83,4, 82,4 (C-4, C-2), 79,6 (C-3), 61,3 (C-5), 26,5, 26,4 (CH₃).

Ejemplo 22

3,5-Di-O-bencil-1,2-O-isopropilideno-3-C-vinil- α -D-ribofuranosa (21)

A 60% suspensión de hidruro sódico (p/p, 1,78 g, 44,5 mmol) en DMF anhidro (50 cm³) se agitó a 0°C y se añadió gota a gota una solución de furanosa 20 (3,20 g, 14,8 mmol) en DMF anhidro (35 cm³) a lo largo de 30 min. La mezcla se agitó a 50°C durante 1 h y subsiguientemente se enfrió hasta 0°C. Se añadió gota a gota una solución de

ES 2 242 291 T3

bromuro de bencilo (5,3 ml, 44,5 mmol) en DMF anhidro (5,3 cm³), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se evaporó y redisolvió en diclorometano (300 cm³), se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×200 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Los solventes se retiraron bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando éter de petróleo/etilacetato (9:1, v/v) como eluyente para rendir furanosa 21 como un material sólido blanco (5,36 g, 91%). δ_H (CDCl₃) 7,40-7,26 (10H, m, Bn), 5,90 (1H, d, J 3,6, 1-H), 5,72 (1H, dd, J 11,1, 17,9, 1'-H), 5,41 (1H, dd, J 0,7, 11,1, 2'-H_a), 5,30 (1H, dd, J 0,5, 17,8, 2'-H_b), 4,70-4,45 (6H, m, Bn, 2-H, 4-H), 3,69 (1H, dd, J 2,6, 10,8, 5-H_a), 3,50 (1H, dd, J 7,9, 10,9, 5-H_b), 1,64 (3H, s, CH₃), 1,40 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 138,6, 138,3 (Bn), 134,5 (C-1'), 128,3-1 27,4 (Bn), 118,2 (C-2'), 112,9 (C(CH₃)₂), 104,7 (C-1), 84,7, 81,1, 81,0 (C-2, C-3, C-4), 73,3 (C-5), 69, 4, 67,0 (Bn), 26, 8, 26,6 (CH₃).

Ejemplo 23

1,2-Di-O-acetil-3,5-di-O-bencil-3-C-vinil-α,β-D-ribofuranosa (22)

Una solución de furanosa 21 (4,40 g, 11,1 mmol) en ácido acético acuoso al 80% (50 cm³) se agitó a 90°C durante 8 h. Se retiraron los solventes y el residuo se coevaporó con etanol al 99% (3×25 cm³), tolueno (3×25 cm³) y piridina anhidra (2×25 cm³), y se redisolvió en piridina anhidra (20 cm³). Se añadió acético anhídrido (17 cm³) y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 48 h. La reacción se detuvo con hielo-agua fría (100 cm³) y se extrajo con diclorometano (2×100 cm³). El extracto combinado se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×100 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se evaporó el solvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando éter de petróleo/etilacetato (4:1, v/v) como eluyente para rendir furanosa 22 como un aceite (4,27 g, 87%, α:β ~ 1:1). δ_C (CDCl₃) 169,9, 169,8 (C=O), 139,0, 138,6, 138,0, 137,8 (Bn), 133,3, 132,4 (C-1'), 128,4-126,8 (Bn), 119,6, 119,5 (C-2'), 99,5, 94,0 (C-1), 85,4, 85,0, 84,3, 83,6, 77,7, 73,6, 73,5, 73,3, 70,0, 69,2, 67,5, 67,2 (C-2, C-3, C-4, C-5, Bn), 21,0, 20,9, 20,6, 20,4 (CH₃).

Ejemplo 24

1-(2-O-Acetil-3,5-di-O-bencil-3-C-vinil-β-D-ribofuranosil)timina (23)

A una solución agitada del compuesto 22 (4,24 g, 9,6 mmol) y timina (2,43 g, 19,3 mmol) en acetonitrilo anhidro (100 cm³) se le añadió N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (11,9 cm³, 48,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo for 30 min. Después de enfriarla hasta 0°C, se añadió trimetilsilil triflato (3,2 cm³, 16,4 mmol) gota a gota y se agitó la solución durante 24 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado frío (100 cm³) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (3×50 cm³). El extracto combinado se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (2×50 cm³) y salmuera (2×50 cm³) y se secó (Na₂SO₄). El extracto se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 23 como una espuma blanca (4,03 g, 83%). δ_H (CDCl₃) 8,78 (1H, br s, NH), 7,75 (1H, s, 6-H), 7,38-7,26 (10H, m, Bn), 6,49 (1H, d, J 8,1, 1'-H), 5,99-5,88 (2H, m, 2'-H y 1''-H), 5,54-5,48 (2H, m, 2''-H_a, 2''-H_b), 4,91-4,50 (4H, m, Bn), 4,34 (1H, s, 4'-H), 3,80 (1H, m, 5'-H_a), 3,54 (1H, m, 5'-H_b), 2,11 (3H, s, COCH₃), 1,48 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 170,1 (C=O), 163,8 (C-4), 151,0 (C-2), 138,9, 136,9 (Bn), 136,1 (C-6), 132,0 (C-1''), 128,7, 128,5, 128,2, 127,8, 127,7, 127,5, 127,5, 127,1 (Bn), 120,7 (C-2''), 111,3 (C-5), 85,4 (C-1'), 85,2 (C-3'), 84,3 (C-4'), 76,0 (C-2'), 73,7 (C-5'), 69,3, 67,6 (Bn), 20,6 (COCH₃), 11,7 (CH₃). Found: C, 66,3; H, 6,0; N, 5,1; C₂₈H₃₀N₂O₇ requiere: C, 66,4; H, 6,0; N, 5,5%.

Ejemplo 25

1-(3,5-Di-O-bencil-3-C-vinil-β-D-ribofuranosil)timina (24)

A una solución agitada del nucleósido 23 (3,90 g, 7,7 mmol) en metanol anhidro (40 cm³) se le añadió metóxido sódico (0,83 g, 15,4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 42 h y a continuación se neutralizó con ácido clorhídrico acuoso diluido. Se reextrajo la mezcla con diclorometano (2×150 cm³), y el extracto combinado se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×100 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida para rendir el nucleósido 24 como una espuma blanca (3,48 g, 97%). δ_H (CDCl₃) 8,89 (1H, br s, NH), 7,60 (1H, d, J 0,9, 6-H), 7,36-7,26 (10H, m, Bn), 6,23 (1H, d, J 7,8, 1'-H), 5,98 (1H, dd, J 11,2, 17,7, 1''-H), 5,66 (1H, d, J 17,7, 2''-H_a), 5,55 (1H, d, J 11,5, 2''-H_b), 4,75-4,37 (6H, m, 2'-H, 4'-H, Bn), 3,84 (1H, dd, J 2,7, 10,8, 5'-H_a), 3,58 (1H, d, J 11,2, 5'-H_b), 3,23 (1H, d, J 10,6, 2'-OH), 1,50 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 163,7 (C-4), 151,3 (C-2), 138,0, 136,9 (Bn), 136,0 (C-6), 131,2 (C-1''), 128,8, 128,6, 128,3, 127,8, 127,7, 127,3 (Bn), 120,7 (C-2''), 111,3 (C-5), 87,3 (C-1'), 84,6 (C-3'), 81,4 (C-4'), 78,0 (C-2'), 73,7 (C-5'), 70,0, 66,4 (Bn), 11,8 (CH₃). Hallado: C, 66,8; H, 6,2; N, 5,9; C₂₆H₂₈N₂O₆ requiere: C, 67,2; H, 6,1; N, 6,0%.

Ejemplo 26

1-(3,5-Di-O-bencil-2-O-metanosulfonil-3-C-vinil-β-D-ribofuranosil)timina (25)

El nucleósido 24 (2,57 g, 5,53 mmol) se disolvió en piridina anhidra (18 cm³) y se enfrió hasta 0°C. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (1,28 cm³, 16,6 mmol) gota a gota y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se detuvo con agua (5 cm³) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (3×80 cm³). El extracto combinado se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×120 cm³) y se secó (Na₂SO₄). El

ES 2 242 291 T3

solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 25 como un espuma amarilla (2,53 g, 84%). δ_{H} (CDCl₃) 8,92 (1H, br s, NH), 7,71 (1H, d, J 1,4, 6-H), 7,41-7,28 (10H, m, Bn), 6,57 (1H, d, J 7,8, 1'-H), 5,99-5,61 (4H, m, 2'-H, 1''-H y 2''-H_a, 2''-H_b), 4,86-4,50 (4H, m, Bn), 4,37 (1H, dd, J 1,5, 2,4, 4'-H), 8,82 (1H, dd, J 2,6, 11,0, 5'-H_a), 3,55 (1H, dd, J 1,2, 11,0, 5'-H_b), 3,02 (3H, s, CH₃), 1,47 (3H, d, J 1,1, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 163,7 (C-4), 151,5 (C-2), 138,7, 136,7 (Bn), 135,7 (C-6), 130,9 (C-1''), 128,8, 128,5, 128,4, 127,6, 127,0 (Bn), 121,8 (C-2''), 111,9 (C-5), 85,1 (C-1'), 84,5 (C-3'), 84,0 (C-4'), 80,7 (C-2'), 73,7 (C-59, 69,2, 67,7 (Bn), 38,9 (CH₃), 11,8 (CH₃).

Ejemplo 27

10 *1-(3,5-Di-O-bencil-3-C-vinil-β-D-arabinofuranosil)timina (26)*

Una solución del nucleósido 25 (2,53 g, 4,66 mmol) en una mezcla de etanol (50 cm³), agua (50 cm³) e hidróxido sódico acuoso 1 M (15 cm³) se agitó bajo reflujo durante 16 h. La mezcla se neutralizó usando ácido clorhídrico acuoso diluido, el solvente se evaporó bajo presión reducida, y el residuo se extrajo con diclorometano (3×120 cm³). El extracto combinado se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×150 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1) como eluyente para rendir 26 como una espuma blanca (1,61 g, 74%). δ_{H} (CDCl₃) 9,89 (1H, br s, NH), 7,50 (1H, d, J 1,1, 6-H), 7,41-7,26 (Bn), 6,28 (1H, d, J 2,8, 1'-H), 6,05 (1H, dd, J 11,1, 17,9, 1''-H), 5,58-5,50 (2H, m, 2''-H_a, 2''-H_b), 4,98 (1H, d, J 9,0, 2'-OH), 4,64-4,31 (6H, m, 2'-H, 4'-H, Bn), 3,73 (2H, m, 5'-H_a, 5'-H_b), 1,73 (1H, d, J 0,6, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 165,1 (C-4), 150,5 (C-2), 138,4, 138,0, 136,7 (C-6, Bn), 130,4 (C-1''), 128,8, 128,6, 128,5, 128,1, 128,0, 127,8 (Bn), 120,6 (C-2''), 108,1 (C-5), 88,6 (C-1'), 87,9 (C-3'), 87,2 (C-4'), 73,7 (C-2'), 71,8 (C-5'), 69,7, 66,3 (Bn), 12,3 (CH₃). Hallado: C, 66,8; H, 6,2; N, 5,9; C₂₆H₂₈N₂O₈ requiere: C, 67,2; H, 6,1; N, 6,0.

Ejemplo 28

25 *1-(3,5-Di-O-bencil-3-C-hidroximetil-β-D-arabinofuranosil)timina (27)*

30 A una solución del nucleósido 26 (2,00 g, 4,31 mmol) en una mezcla de THF (15 cm³) y agua (15 cm³) se le añadió periodato sódico (2,76 g, 12,9 mmol) y una solución de tetróxido de osmio al 2,5% en t-butanol (p/p, 0,54 cm³, 431 μmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h, se detuvo con agua (50 cm³), y se reextrajo la mezcla con diclorometano (2×100 cm³). El extracto combinado se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×75 cm³), se secó (Na₂SO₄) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se redisolvió en una mezcla de THF (15 cm³) y agua (15 cm³), y se añadió borohidruro de sodio (488 mg, 12,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se añadió agua (50 cm³), y se reextrajo la mezcla con diclorometano (2×100 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×75 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 27 como una espuma blanca (732 mg, 36%). δ_{H} (CDCl₃) 11,09 (1H, br s, NH), 7,41 (1H, d, J 1,0, 6-H), 7,38-7,26 (Bn), 6,16 (1H, d, J 2,6, 1'-H), 5,12 (1H, d, J 5,4, 2'-OH), 4,66-4,29 (6H, m, 2'-H, 4'-H, Bn), 4,02-3,96 (2H, m, 1''-H_a, 1''-H_b), 3,90 (1H, dd, J 7,2, 9,7, 5'-H_a), 3,79 (1H, dd, J 5,6, 9,7, 5'-H_b), 2,49 (1H, t, J 6,4, 1''-OH), 1,68 (3H, d, J 0,6, CH₃); δ_{C} (CDCl₃) 166,1 (C-4), 150,6 (C-2), 139,0, 137,9, 137,0 (C-6, Bn), 128,7, 128,6, 128,4, 128,3, 128,0 (Bn), 107,5 (C-5), 88,2 (C-1'), 88,1 (C-3'), 84,2 (C-4'), 73,7 (C-5'), 72,1 (C-21), 69,3, 65,4 (Bn), 58,6 (C-1''), 12,3 (CH₃).

Ejemplo 29

45 *(1R,2R,4R,5S)-1-Benciloxi-2-benciloximetil-4-(timin-1-il)-3,6-dioxabicyclo[3.2.0]heptano (28)*

50 Una solución del compuesto 27 (2,26 g, 4,83 mmol) en piridina anhidra (20 cm³) se agitó a -40°C y a solución de metanosulfonil chloride (0,482 cm³, 4,83 mmol) en piridina anhidra (10 cm³) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 h, agua (50 cm³) se añadió, y se reextrajo la mezcla con diclorometano (2×100 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×100 cm³), se secó (Na₂SO₄) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir un intermedio que, después de la evaporación de los solventes, se disolvió en DMF anhidro (15 cm³). Esta solución se añadió gota a gota a una suspensión de hidruro sódico al 60% (461 mg, 11,5 mmol) en DMF anhidro (15 cm³) a 0°C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, a continuación se detuvo con agua (60 cm³). Después de la neutralización usando ácido clorhídrico acuoso diluido, la mezcla se disolvió en diclorometano (150 cm³), se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso diluido (3×100 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se evaporaron los solventes y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 28 as a white foam (2,00 g, 93%). δ_{H} (CDCl₃) 9,13 (1H, br s, NH), 7,55 (1H, d, J 1,4, 6-H), 7,40-7,26 (Bn), 5,99 (1H, d, J 2,5, 1'-H), 5,30 (1H, d, J 2,7, 2'-H), 4,88-4,57 (6H, m, 1''-H_a, 1''-H_b, Bn), 4,22-4,19 (1H, m, 4'-H), 3,92 (1H, dd, J 6,2, 10,8, 5'-H_a), 3,82 (1H, dd, J 3,7, 10,8, 5'-H_b), 1,91 (3H, d, J 1,3, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 163,8 (C-4), 150,3 (C-2), 137,6 (C-6), 137,5, 137,0 (Bn), 128,7, 128,6, 128,2, 128,0, 127,8, 127,3 (Bn), 109,8 (C-5), 85,7 (C-3'), 84,1 (C-1'), 83,5 (C-4'), 79,7 (C-1''), 73,9 (C-2'), 73,6 (C-5'), 68,6, 67,8 (Bn), 12,4 (CH₃). FAB m/z 451 [M+H]⁺, 473 [M+Na]⁺. Hallado: C, 66,3; H, 5,9; N, 6,1; C₂₅H₂₆N₂O₆ requiere: C, 66,7; H, 5,8; N, 6,2%.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 30

(1R,2R,4R,5S)-1-Hidroxi-2-hidroxiometil-4-(timin-1-il)-3,6-dioxabicyclo[3.2.0]heptano (29)

5 A una solución agitada del nucleósido 28 (180 mg, 0,40 mmol) en etanol (3 cm³) se le añadió hidróxido de paladio al 10% sobre carbón (90 mg). La mezcla se desgasó varias veces con argón y se colocó en una atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h, a continuación se filtró a través de celita. El filtrado se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (96:4, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 29 como un material sólido blanco (92 mg, 86%). δ_{H} (CD₃OD) 7,79 (1H, d, J 1,2, 6-H), 5,91 (1H, d, J 2,5, 1'-H), 4,96 (1H, d, J 2,5, 2'-H), 4,92 (1H, d, J 7,4, 1''-H_a), 4,58 (1H, dd, J 0,9, 7,4, 1''-H_b), 3,98 (1H, dd, J 7,3, 12,8, 5'-H_a), 3,87-3,82 (2H, m, 4'-H, 5'-H_b), 3,34 (2H, s, 3'-OH, 5'-OH), 1,87 (3H, d, J 1,3, CH₃). δ_{C} (CD₃OD) 166,5 (C-4), 152,1 (C-2), 140,1 (C-6), 110,1 (C-5), 91,2 (C-2'), 85,1 (C-1'), 84,0 (C-4'), 79,6 (C-3'), 78,6 (C-1''), 61,1 (C-5'), 12,3 (CH₃).

15 Ejemplo 31

(1R,2R,4R,5S)-1-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-2-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-4-(timin-1-il)-3,6-dioxabicyclo[3.2.0]heptano (30)

20 A una solución del diol 29 (250 mg, 0,925 mmol) en piridina anhidra (4 cm³) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (376 mg, 1,11 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La reacción se detuvo con metanol (1,5 cm³) y la mezcla se evaporó bajo presión reducida. Una solución del residuo en diclorometano (30 cm³) se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×20 cm³), se secó (Na₂SO₄) y evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir un intermedio que se disolvió en diclorometano anhidro (7,0 cm³). Se añadió N,N-Diisopropiletilamina (0,64 cm³, 3,70 mmol) seguida por 2-cianoetil N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,41 cm³, 1,85 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 25 h. La reacción se detuvo con metanol (3 cm³), y la mezcla se disolvió en etilacetato (70 cm³), se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×50 cm³) y salmuera (3×50 cm³), se secó (Na₂SO₄), y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando éter de petróleo/diclorometano/etilacetato/trietilamina (100:45:45:10, v/v/v/v) como eluyente. El residuo obtenido se disolvió en tolueno (2 cm³) y se precipitó bajo agitación a partir de éter de petróleo a -50°C. Después de la evaporación de los solventes, el residuo se coevaporó con acetonitrilo anhidro (4x5 cm³) para rendir 30 como una espuma blanca (436 mg, 61%). ³¹P RMN (CDCl₃) 146,6.

35 Ejemplo 32

3,5-Di-O-bencil-4-C-hidroxiometil-1,2-O-isopropilideno- α -D-ribofuranosa (31)

40 A una solución de 3-O-bencil-4-C-hidroxiometil-1,2-O-isopropilideno- α -D-ribofuranosa (R.D. Youssefyeh, J.P.H. Verheyden y J.G. Moffatt, *J. Org.2 Chem.*, 44:1301 (1979)) (20,1 g, 0,064 mol) en DMF anhidro (100 cm³) a -5°C se le añadió una suspensión de NaH (60% en aceite mineral (p/p), cuatro porciones durante 1 h 30 min, total 2,85 g, 0,075 mol). Se añadió bromuro de bencilo (8,9 cm³, 0,075 mol) gota a gota, y la agitación a temperatura ambiente se continuó durante 3 h, después de lo cual se añadió hielo-agua fría (50 cm³). Se reextrajo la mezcla con EtOAc (4×100 cm³) y la fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄). Después de la evaporación, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con EtOAc al 5% en éter de petróleo (v/v) para rendir el compuesto 31 (18,5 g, 71%). δ_{C} (CDCl₃) 138,0, 137,4, 128,5, 128,3, 128,0, 127,8, 127,6 (Bn), 113,5 (C(CH₃)₂), 104,4 (C-1), 86,5 (C-4), 78,8, 78,6 (Bn), 73,6, 72,6, 71,6 (C-2, C-3, C-5), 63,2, (C-1'), 26,7, 26,1 (CH₃).

Ejemplo 33

50

4-C-(Acetoximetil)-3,5-di-O-bencil-1,2-O-isopropilideno- α -D-ribofuranosa (32)

55 A una solución de la furanosa 31 (913 mg, 2,28 mmol) en piridina anhidra (4,5 cm³) se le añadió gota a gota anhídrido acético (1,08 cm³, 11,4 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de hielo-agua fría (50 cm³) y la extracción se realizó con diclorometano (3×50 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×50 cm³), se secó (Na₂SO₄) y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano como eluyente para rendir el compuesto 32 como un aceite claro (911 mg, 90%). δ_{H} (CDCl₃) 7,34-7,25 (10H, m, Bn), 5,77 (1H, d, J 3,6, 1-H), 4,78-4,27 (8H, m, Bn, H-5_a, H-5_b, H-3, H-2), 3,58 (1H, d, J 10,3, H-1'_a), 3,48 (1H, d, J 10,5, H-1'_b), 2,04 (3H, s, COCH₃), 1,64 (3H, s, CH₃), 1,34 (3H, s, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 171,1 (C=O), 138,2, 137,9, 128,6, 128,1, 128,0, 128,0, 127,8 (Bn), 114,0 (C(CH₃)₂), 104,5 (C-1), 85,4 (C-4), 79,3, 78,6 (C-2, C-3), 73,7, 72,7, 71,2 (Bn, C-5), 64,9 (C-1'), 26,7, 26,3 (C(CH₃)₂), 21,0 (COCH₃). Hallado: C, 67,0; H, 6,5; C₂₅H₃₀O₇, 1/4H₂O requiere: C, 67,2; H, 6,9%.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 34

4-C-(Acetoximetil)-1,2-di-O-acetil-3,5-di-O-bencil-D-ribofuranosa (33)

5 Se agitó una solución de la furanosa 32 (830 mg, 1,88 mmol) en ácido acético al 80% (10 cm³) a 90°C durante 4 h. Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se coevaporó con etanol (3×5 cm³), tolueno (3×5 cm³) y piridina anhidra (3×5 cm³), y se redisolvió en piridina anhidra (3,7 cm³). Se añadió anhídrido acético (2,85 cm³) y se agitó la solución durante 72 h a temperatura ambiente. La solución se vertió en hielo-agua fría (20 cm³) y se reextrajo la mezcla con diclorometano (2×20 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno
10 carbonato sódico (2×20 cm³), se secó (Na₂SO₄) y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano como eluyente para rendir 33 (β : α ~ 1:3) como un aceite claro (789 mg, 86%). δ_C (CDCl₃) 171,0, 170,3, 170,0, 169,3 (C=O), 138,1, 137,6, 136,3, 128,9, 128,6, 128,2, 128,0, 128,0, 127,9, 127,7, 124,0 (Bn), 97,8, 97,8 (C-1), 87,0, 85,0, 78,9, 74,5, 74,4, 73,8, 73,6, 72,0, 71,8, 71,0, 70,9, 64,6, 64,4 (C-2, C-3, C-4, Bn, C-5, C-1'), 21,0, 20,8, 20,6 (COCH₃). Hallado: C, 64,2; H, 6,3; C₂₆H₃₀O₉ requiere: C, 15 64,2; H, 6,2%.

Ejemplo 35

1-(4-C-(Acetoximetil)-2-O-acetil-3,5-di-O-bencil- β -D-ribofuranosil)timina (34)

20 A una solución agitada de la mezcla anomérica 33 (736 mg, 1,51 mmol) y timina (381 mg, 3,03 mmol) en acetoneitrilo anhidro (14,5 cm³) se le añadió N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (2,61 cm³, 10,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 1 h, entonces se enfrió hasta 0°C. Se añadió trimetilsilil triflato (0,47 cm³, 2,56 mmol) gota a gota con agitación y la solución se agitó a 65°C durante 2 h. La reacción se detuvo con una solución acuosa saturada y fría de hidrógeno carbonato sódico (15 cm³) y la extracción se realizó con diclorometano (3×10 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (2×10 cm³) y salmuera (2×10 cm³), y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 34 como un material sólido blanco (639 mg, 76%). δ_H (CDCl₃) 8,98 (1H, br s, NH), 7,39-7,26 (11H, m, Bn, 6-H), 6,22
30 (1H, d, J 5,3, 1'-H), 5,42 (1H, t, J 5,4, 2'-H), 4,63-4,43 (5H, m, 3'-H, Bn), 4,41 (1H, d, J 12,2, 5'-H_a), 4,17 (1H, d, J 12,1, 5'-H_b), 3,76 (1H, d, J 10,2, 1''-H_a), 3,51 (1H, d, J 10,4, 1''-H_b), 2,09 (3H, s, COCH₃), 2,03 (3H, s, COCH₃), 1,53 (3H, d, J 0,9, CH₃). δ_C (CDCl₃) 170,8, 170,4 (C=O), 163,9 (C-4), 150,6 (C-2), 137,4 (C-6) 137,4, 136,1, 128,9, 128,8, 128,4, 128,2, 127,9 (Bn), 111,7 (C-5), 87,2, 87,2, 86,1 (C-1', C-3', C-4'), 77,6 (C-2'), 74,8, 73,9, 71,1, 63,8 (Bn, C-1'', C-5'), 20,9, 20,8 (COCH₃), 12,0 (CH₃). FAB-MS m/z 553 [M+H]⁺. Hallado: C, 62,7; H, 5,9; N, 4,7; C₂₉H₃₂N₂O₉ requiere: C, 63,0; H, 5,8; N, 5,1%.

Ejemplo 36

1-(3,5-Di-O-bencil-4-C-(hidroximetil)- β -D-ribofuranosil)timina (35)

40 A una solución agitada del nucleósido 34 (553 mg, 1,05 mmol) en metanol (5,5 cm³) se le añadió metóxido sódico (287 mg, 5,25 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, neutralizándose a continuación con ácido clorhídrico diluido. El solvente se evaporó parcialmente y la extracción se realizó con diclorometano (2×20 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×20 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida para rendir 35 como un material sólido blanco (476 mg, 97%). δ_H (CDCl₃) 7,47 (1H, d, J 1,0 6-H), 7,36-7,22 (10H, m, Bn), 6,07 (1H, d, J 3,8, 1'-H), 4,87 (1H, d, J 11,7, Bn), 4,55 (1H, d, J 11,7, Bn), 4,50-4,32 (4H, m, Bn, 2'-H, 3'-H), 3,84-3,53 (4H, m, 5'-H_a, 5'-H_b, 1''-H_a, 1''-H_b), 1,50 (3H, d, J 1,1, CH₃). δ_C (CDCl₃) 164,3 (C-4), 151,3 (C-2), 137,6 (C-6) 136,4, 136,3, 128,8, 128,6, 128,4, 128,3, 127,9 (Bn), 111,1 (C-5), 91,1, 91,0, 88,1 (C-1', C-3', C-4'), 77,4 (C-2'), 74,8, 73,8, 71,4, 63,2 (Bn, C-5', C-1''), 12,0
50 (CH₃). FAB-MS m/z 491 [M+Na]⁺. Hallado: C, 63,4; H, 6,0; N, 5,5; C₂₅H₂₈N₂O₇, 1/4H₂O requiere: C, 63,5; H, 6,1; N, 5,9%.

Ejemplo 37

55 *Intermedio 35A*

Una solución del nucleósido 35 (225 mg, 0,48 mmol) en piridina anhidra (1,3 cm³) se agitó a 0°C y se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (118 mg, 0,62 mmol) en pequeñas porciones. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 16 h y se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo adicional (36 mg, 0,19 mmol). Después de agitar durante otras
60 4 h y de la adición de hielo-agua fría (15 cm³), se realizó la extracción con diclorometano (2×15 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×15 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir un intermedio 35A (140 mg) que se usó sin purificación adicional al final de siguiente paso.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 38

(1S,3R,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (36)

5 El intermedio 35A (159 mg) se disolvió en DMF anhidro (0,8 cm³). La solución se añadió gota a gota a una suspensión agitada de hidruro sódico al 60% en aceite mineral (p/p, 32 mg, 0,80 mmol) en DMF anhidro (0,8 cm³) a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 h y a continuación se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (10 cm³), se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×5 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido bicyclico 36 como un material sólido blanco (65,7 mg, 57%). δ_H (CDCl₃) 9,24 (1H, br s, NH), 7,49 (1H, s, 6-H), 7,37-7,26 (10H, m, Bn), 5,65 (1H, s, 1'-H), 4,70-4,71 (5H, m, Bn, 2'-H), 4,02-3,79 (5H, m, 3'-H, 5'-H_a, 5'-H_b, 1''-H_a, 1''-H_b), 1,63 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 164,3 (C-4), 150,1 (C-2), 137,7, 137,1 (Bn), 135,0 (C-6), 128,8, 128,7, 128,4, 128,0, 127,9 (Bn), 110,4 (C-5), 87,5, 87,3 (C-1', C-3'), 76,7, 75,8, 73,9, 72,3, 72,1 (Bn, C-5', C-2', C-4'), 64,5 (C-1''), 12,3 (CH₃). FAB-MS m/z 451 [M+H]⁺.

Ejemplo 39

(1S,3R,4R,7S)-7-Hidroxi-1-hidroximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (37)

20 Una solución del nucleósido 36 (97 mg, 0,215 mmol) en etanol (1,5 cm³) se agitó a temperatura ambiente y se añadió hidróxido de paladio al 20% sobre carbón (50 mg). La mezcla se desgasó varias veces con argón y se colocó en una atmósfera de hidrógeno con un globo. Después de agitar durante 4 h, la mezcla se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano-metanol (97:3, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 37 como un material sólido blanco (57 mg, 98%). δ_H ((CD₃)₂SO) 11,33 (1H, br s, NH), 7,62 (1H, d, J 1,1 Hz, 6-H), 5,65 (1H, d, J 4,4 Hz, 3'-OH), 5,41 (1H, s, 1'-H), 5,19 (1H, t, J 5,6 Hz, 5'-OH), 4,11 (1H, s, 2'-H), 3,91 (1H, d, J 4,2 Hz, 3'-H), 3,82 (1H, d, J 7,7 Hz, 1''-H), 3,73 (1H, s, 5'-H_a), 3,76 (1H, s, 5'-H_b), 3,63 (1H, d, J 7,7 Hz, 1''-H_b), 1,78 (3H, d, J 0,7 Hz, CH₃). δ_C (CDCl₃) 166,7 (C-4), 152,1 (C-2), 137,0 (C-6), 110,9 (C-5), 90,5, 88,4 (C-1', C-4'), 80,9, 72,5, 70,4 (C-2', C-3', C-5'), 57,7 (C-1''), 12,6 (CH₃). El-MS m/z 270 [M]⁺.

Ejemplo 40

(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-Dimetoxitritiloximetil)-7-hidroxi-3-timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (38)

35 A una solución del nucleósido 37 (1,2 g, 4,44 mmol) en piridina anhidra (5 cm³) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (2,37 g, 7,0 mmol) a 0°C. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 2 h, después de lo cual la reacción se detuvo con hielo-agua fría (10 cm³) y se extrajo con diclorometano (3×15 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×10 cm³), salmuera (2×10 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 38 como un material sólido blanco (2,35 g, 93%). δ_H (CDCl₃) 9,89 (1H, br s, NH), 7,64 (1H, s, 6-H), 7,47-7,13 (9H, m, DMT), 6,96-6,80 (4H, m, DMT), 5,56 (1H, s, 1'-H), 4,53 (1H, br s, 2'-H), 4,31 (1H, m, 3'-H), 4,04-3,75 (9H, m, 1''-H_a, 1''-H_b, 3'-OH, OCH₃), 3,50 (2H, br s, 5'-H_a, 5'-H_b), 1,65 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 164,47 (C-4), 158,66 (DMT), 150,13 (C-2), 144,56, 135,46, 135,35, 134,78, 130,10, 129,14, 128,03, 127,79, 127,05 (C-6, DMT), 113,32, 113,14 (DMT), 110,36 (C-5), 89,17, 88,16, 87,05 (C-1', C-4', DMT), 79,36, 71,81, 70,25, 58,38 (C-2', C-3', C-5', C-1''), 55,22 (OCH₃), 12,57 (CH₃). FAB-MS m/z 595 [M+Na]⁺, 573 [M+H]⁺.

Ejemplo 41

50 *(1R,3R,4R,7S)-7-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (39)*

55 A una solución del nucleósido 38 (2,21 g, 3,86 mmol) en diclorometano anhidro (6 cm³) a temperatura ambiente se le añadió N,N-diisopropiletilamina (4 cm³) y 2-cianoetil N,N-diisopropilfosforamidocloridito (1 cm³, 4,48 mmol) y la agitación se continuó durante 1 h. Se añadió MeOH (2 cm³) y la mezcla se diluyó con acetato de etilo (10 cm³) y se lavó sucesivamente con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×5 cm³) y salmuera (3×5 cm³) y se secó (Na₂SO₄). El solvente se evaporó bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de alúmina básica con diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir 39 como una espuma blanca. Este residuo se disolvió en diclorometano (2 cm³) y el producto se precipitó a partir de éter de petróleo (100 cm³, se enfrió hasta -30°C) bajo agitación enérgica. El precipitado se recogió mediante filtración, y se secó para rendir el nucleósido 39 como un material sólido blanco (2,1 g, 70%). δ_P (CDCl₃) 149,06, 148,74. FAB-MS m/z 795 [M+Na]⁺, 773 [M+H]⁺.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 42

1-(2-O-Acetil-4-C-acetoximetil-3,5-di-O-bencil-β-D-ribofuranosil)uracil (40)

5 A una solución agitada de la mezcla anomérica 33 (3,0 g, 6,17 mmol) y uracilo (1,04 g, 9,26 mmol) en acetonitrilo anhidro (65 cm³) se le añadió N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (9,16 cm³, 37,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se enfrió hasta 0°C. Se añadió trimetilsilil triflato (1,8 cm³, 10,0 mmol) gota a gota y la solución se agitó a 60°C durante 2 h. La reacción se detuvo mediante la adición de una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (10 cm³) a 0°C y la extracción se realizó con diclorometano (3×20 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (2×20 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Los solventes se retiraron bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 40 como un material sólido blanco (2,5 g, 75%). δ_H (CDCl₃) 9,57 (1H, br s, NH), 7,63 (1H, d, J 8,2, 6-H), 7,40-7,24 (10H, m, Bn), 6,18 (1H, d, J 4,5, 1'-H), 5,39-5,32 (2H, m, 2'-H, 5-H), 4,61 (1H, d, J 11,6, Bn), 4,49-4,40 (5H, m, 3'-H, Bn, 1''-H_a), 4,37 (1H, d, J 12, 3, 1''-H_b), 3,76 (1H, d, J 10, 1, 5'-H_a), 3,49 (1H, d, J 10,1, 5'-H_b), 2,09 (s, 3H, COCH₃), 2,04 (3H, s, COCH₃). δ_C (CDCl₃) 170, 47, 169,94 (C=O), 163,32 (C-4), 150,30 (C-2), 140,24 (C-6), 137,15, 136,95, 128,65, 128,52, 128,32, 128,19, 128,02, 127,77 (Bn), 102,57 (C-5), 87,41, 86,14 (C-1', C-4'), 77,09, 74,84, 74,51, 73,75, 70,60, 63,73 (C-2', C-3', C-5', C-1'', Bn), 20,79, 20,68 (COCH₃). FAB-MS m/z 539 [M]⁺.

20 Ejemplo 43

1-(3,5-Di-O-bencil-4-C-hidroximetil-β-D-ribofuranosil)uracilo (41)

25 A una solución agitada del nucleósido 40 (2,0 g, 3,7 mmol) en metanol (25 cm³) se le añadió metóxido sódico (0,864 g, 95%, 16,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y se neutralizó con ácido clorhídrico acuoso al 20%. El solvente se evaporó parcialmente y el residuo se extrajo con acetato de etilo (3×50 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×20 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98,5:1,5, v/v) como eluyente para rendir 41 como un material sólido blanco (1,58 g, 95%). δ_H (CDCl₃) 9,95 (1H, br s, NH), 7,69 (d, J 8,1, 6-H), 7,35-7,17 (10H, m, Bn), 6,02 (1H, d, J 2,3, 1'-H), 5,26 (1H, d, J 8,1, 5-H), 4,80 (1H, d, J 11,7, Bn), 4,47 (1H, d, J 11,7, Bn), 4,45-4,24 (4H, m, Bn, 2'-H, 3'-H), 3,81 (1H, d, J 11,9, 1''-H_a), 3,69 (2H, br s, 2'-OH, 1''-OH), 3,67 (2H, m, 5'-H_a, 1''-H_b), 3,48 (1H, d, J 10,3, 5'-H_b). δ_C (CDCl₃) 163,78 (C-4), 150,94 (C-2), 140,61 (C-6), 137,33, 137,22, 128,59, 128,18, 128,01 (Bn), 102,16 (C-5), 91,46, 88,36 (C-1', C-4'), 76, 73, 74, 66, 73, 71, 73, 29, 70, 81, 62,81 (C-2', C-3', C-5', C-1'', Bn). FAB-MS m/z 455 [M+H]⁺.

Ejemplo 44

Intermedio 42

40 Se agitó una solución del nucleósido 41 (1,38 g, 3,0 mmol), anhidro piridina (2 cm³) y diclorometano anhidro (6 cm³) a -10°C, y se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (0,648 g, 3,4 mmol) en pequeñas porciones durante 1 h. La solución se agitó a -10°C durante 3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de hielo-agua fría (10 cm³) y se reextrajo la mezcla con diclorometano (3×50 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×20 cm³) y was se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el intermedio 42 (0,9 g) que se usó sin purificación adicional en el paso siguiente.

Ejemplo 45

(1S,3R,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-(uracil-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (43)

55 El compuesto 42 (0,7 g) de disolvió en DMF anhidro (3 cm³) y se añadió una suspensión de hidruro sódico al 60% (p/p, 0,096 g, 24 mmol) en cuatro porciones durante 10 min a 0°C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se detuvo con metanol (10 cm³), y los solventes se retiraron bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (20 cm³), se lavó con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (3×6 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/etanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 43 (0,30 g, 60%). δ_H (CDCl₃) 9,21 (1H, br s, NH), 7,70 (1H, d, J 8,2, 6-H), 7,37-7,24 (10H, m, Bn), 5,65 (1H, s, 1'-H), 5,52 (1H, d, J 8,2, 5-H), 4,68-4,45 (5H, m, 2'-H, Bn), 4,02-3,55 (5H, m, 3'-H, 5'-H_a, 1''-H_a, 5'-H_b, 1''-H_b). δ_C (CDCl₃) 163,33 (C-4), 149,73 (C-2), 139,18 (C-6), 137,46, 136,81, 128,58, 128,54, 128,21, 128,10, 127,79, 127,53 (Bn), 101,66 (C-5), 87,49, 87,33 (C-1', C-4'), 76,53, 75,71, 73,77, 72,33, 72,00, 64,35 (C-2', C-3', C-5', C-1'', Bn). FAB-MS m/z 459 [M+Na]⁺.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 46

(1S,3R,4R,7S)-7-Hidroxi-1-hidroxitetil-3-(uracil-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (44)

5 A una solución del compuesto 43 (0,35 g, 0,8 mmol) en etanol absoluto (2 cm³) se le añadió hidróxido de paladio al 20% sobre carbón (0,37 g) y la mezcla se desgasó varias veces con hidrógeno y se agitó bajo atmósfera de hidrógeno durante 4 h. Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (9:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 44 como un material sólido blanco (0,16 g, 78%). δ_{H} (CD₃OD) 7,88 (1H, d, J 8,1, 6-H), 5,69 (1H, d, J 8,1, 5-H), 5,55 (1H, s, 1'-H), 4,28 (1H, s, 2'-H), 4,04 (1H, s, 3'-H), 3,96 (1H, d, J 7,9, 1''-H_a), 3,91 (2H, s, 5'-H), 3,76 (1H, d, J 7,9, 1''-H_b). δ_{C} (CD₃OD) 172,95 (C-4), 151,82 (C-2), 141,17 (C-6), 101,97 (C-5), 90,52, 88,50 (C-1', C-4'), 80,88, 72,51, 70,50, 57,77 (C-2', C-3', C-5', C-1''). FAB-MS m/z 257 [M+H]⁺.

Ejemplo 47

15 *(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-Dimetoxitritiloximetil)-7-hidroxi-3-(uracil-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (45)*

A una solución del compuesto 44 (0,08 g, 0,31 mmol) en piridina anhidra (0,5 cm³) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,203 g, 0,6 mmol) a 0°C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se detuvo con hielo-agua fría (10 cm³) y se extrajo con diclorometano (3×4 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×3 cm³) y salmuera (2×3 cm³), y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98:2, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 45 como un material sólido blanco (0,12 g, 69%). δ_{H} (CDCl₃) 9,25 (1H, br s, NH), 7,93 (1H, d, J 7,2, 6-H), 7,50-7,15 (9H, m, DMT), 6,88-6,78 (4H, m, DMT), 5,63 (1H, s, 1'-H), 5,59 (1H, d, J 8,0, 5-H), 4,48 (1H, s, 2'-H), 4,26 (1H, s, 3'-H), 3,88 (1H, d, J 8,1, 1''-H_a), 3,85-3,55 (7H, m, 1''-H_b, OCH₃), 3,58-3,40 (2H, m, 5'-H_a, 5'-H_b). δ_{C} (CDCl₃) 164,10 (C-4), 158,60 (DMT), 150,45 (C-2), 147,53 (DMT), 144,51 (C-6), 139,72, 135,49, 135,37, 130,20, 129,28, 128,09, 127,85, 127,07 (DMT), 113,39, 113,17 (DMT), 101,79 (C-5), 88,20, 87,10, 86,87 (C-1', C-4', DMT), 79,25, 71,79, 69,70, 58,13 (C-2', C-3', C-5', C-1''), 55,33 (OCH₃). FAB-MS m/z 559 [M+H]⁺.

Ejemplo 48

(1R,3R,4R,7S)-7-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)posphinoxil)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (46)

35 A una solución del compuesto 45 (0,07 g, 0,125 mmol) en diclorometano anhidro (2 cm³) a temperatura ambiente se le añadió N,N-diisopropiletilamina (0,1 cm³) y 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridato (0,07 cm³, 0,32 mmol). Después de agitar durante 1 h, la reacción se detuvo con MeOH (2 cm³), y la mezcla resultante se diluyó con acetato de etilo (5 cm³) y se lavó sucesivamente con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×2 cm³) y salmuera (3×2 cm³), y se secó (Na₂SO₄). El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir una espuma blanca. Esta espuma se disolvió en diclorometano (2 cm³) y el producto se precipitó a partir de éter de petróleo (10 cm³, se enfrió hasta -30°C) con agitación enérgica. El precipitado se recogió mediante filtración y se secó para rendir el compuesto 46 como un material sólido blanco (0,055 g, 58%). δ_{P} (CDCl₃) 149,18, 149,02.

Ejemplo 49

9-(2-O-Acetil-4-C-acetoximetil-3,5-di-O-bencil-β-D-ribofuranosil)-2-N-isobutirilguanina (47)

50 A una suspensión agitada de la mezcla anomérica 33 (1,28 g, 5,6 mmol) y 2-N-isobutirilguanina (1,8 g, 3,7 mmol) en dicloroetano anhidro (60 cm³) se le añadió N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (4 cm³, 16,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 1 h. Se añadió trimetilsilil triflato (1,5 ml, 8,28 mmol) gota a gota a 0°C y la solución se agitó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante 1,5 h. Después de su dilución hasta 250 cm³ mediante la adición de diclorometano, la mezcla se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (200 cm³) y agua (250 cm³). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando 1,25% (200 cm³) y 1,5% (750 cm³) de metanol en diclorometano (v/v) como eluyentes para rendir 2,10 g (87%) de un sólido blanco que, de acuerdo con el análisis de 1H-RMN consistía en tres isómeros (proporción: 12,5:2,5:1). El producto principal formado en esas condiciones se espera que sea el compuesto 47 (P. Garner, S. Ramakanth, *J. Org. Chem.* 53:1294 (1988); H. Vorbruggen, K. Krolkiewicz, B. Bennua, *Chem. ver.* 114:1234 (1981)). No se aislaron los isómeros individuales y se usó la mezcla para el paso siguiente. Para el producto principal 47: δ_{H} (CDCl₃) 12,25 (br s, NHCO), 9,25 (br s, NH), 7,91 (s, 8-H) 7,39-7,26 (m, Bn), 6,07 (d, J 4,6, 1'-H), 5,80 (dd, J 5,8, J 4,7, 2'-H), 4,72 (d, J 5,9, 3'-H), 4,59-4,43 (m, Bn, 1''-H_a), 4,16 (d, J 12,1, 1''-H_b), 3,70 (d, J 10,1, 5'-H_a), 3,58 (d, J 10,1, 5'-H_b), 2,65 (m, CHCO), 2,05 (s, COCH₃), 2,01 (s, COCH₃), 1,22 (d, J 6,7, CH₃ CH), 1,20 (d, J 7,0, CH₃ CH). δ_{C} (CDCl₃) 178,3 (COCH), 170,6, 179,8 (COCH₃), 155,8, 148,2, 147,6 (guanina), 137,6, 137,2 (guanina, Bn), 128,5, 128,4, 128,2, 128,1, 128,0, 127,8, 127,7 (Bn), 121,2 (guanina), 86,2, 86,0 (C-1', C-4'), 77,8 (C-3'), 74,9, 74,5, 73,7, 70,4 (Bn, C-2', C-5'), 63,5 (C-1''), 36,3 (COCH), 20,8, 20,6 (COCH₃), 19,0 (CH₃ CH). For la mezcla: FAB-MS m/z 648 [M+H]⁺, 670 [M+Na]⁺. Hallado: C, 60,8; H, 6,0; N, 10,4; C₃₃H₃₆N₅O₉ requiere: C, 61,3; H, 5,6; N, 10,8%.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 50

9-(3,5-Di-O-bencil-4-C-hidroximetil-β-D-ribofuranosil)-2-N-isobutirilguanina (48)

5 Una solución de la mezcla descrita en el Ejemplo 49, conteniendo el compuesto 47 (2,10 g, 3,25 mmol) en THF/Piridina/metanol (2:3:4, v/v/v) (40 cm³), se enfrió hasta -10°C y se añadió metóxido sódico (320 mg, 5,93 mmol) a la solución agitada. La mezcla de reacción se agitó a 10°C durante 30 min y se neutralizó con 2 cm³ de ácido acético. El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se extrajo dos veces en un sistema de diclorometano/agua (2×100 cm³). Las fracciones orgánicas se combinaron y evaporaron bajo presión reducida. Después de la coevaporación con tolueno, el residuo se purificó cromatografía en columna de gel de sílice en un gradiente (2-7%)
10 de metanol en diclorometano (v/v) para rendir a material sólido blanco (1,62 g). De acuerdo con ¹H-RMN consistía en tres isómeros (proporción: 13,5:1,5:1). Para el producto principal 48: δ_H (CD₃OD) 8,07 (s, 8-H) 7,36-7,20 (m, Bn), 6,05 (d, J 3,9, 1'-H), 4,81 (d, J 11,5, Bn), 4,75 (m, 2'-H), 4,56 (d, J 11,5, Bn), 4,51-4,43 (m, Bn, 31-H), 3,83 (d, J 11,7, 1''-H_a), 3,65 (d, J 11,7, 1''-H_b), 3,64 (d, J 10,6, 5'-H_a), 3,57 (d, J 10,3, 5'-H_b), 2,69 (m, CHCO), 1,20 (6H, d, J 6,8, CH₃ CH). δ_C (CD₃OD) 181,6 (COCH), 157,3, 150,2, 149,5 (guanina), 139,4, 139,3, 139,0 (guanina, Bn), 129,5, 129,4, 129,3, 129,2, 129,1, 129,0, 128,9, 128,8 (Bn), 121,2 (guanina), 90,7, 89,6 (C-1', C-4'), 79,2 (C-3'), 75,8, 74,5, 74,3, 72,2 (Bn, C-2', C-5'), 63,1 (C-1''), 36,9 (COCH), 19,4 (CH₃ CH), 19,3 (CH₃ CH). For la mezcla: FAB-MS m/z 564 [M+H]⁺.

20 Ejemplo 51

Intermedio 49

25 Una solución de la mezcla descrita en el Ejemplo 50 conteniendo el compuesto 48 (1,6 g) en piridina anhidra (6 cm³) se agitó a -20°C y se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (0,81 g, 4,27 mmol). Se agitó la solución durante 1 h a -20°C y durante 2 h a -25°C. A continuación se diluyó la mezcla hasta 100 cm³ mediante la adición de diclorometano e inmediatamente se lavó con agua (2×100 cm³). Se separó la fase orgánica y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol como eluyente (1-2%, v/v) para rendir el intermedio 49 (980 mg). Después de la elución del compuesto 49 de la columna, se eluyó la mezcla de partida conteniendo el 48 (510 mg) usando metanol al 8% en diclorometano (v/v) como eluyente. Este material se concentró, se secó bajo presión reducida y se trató de la misma manera descrita más arriba para rendir adicionalmente 252 mg del intermedio. El intermedio (1,23 g) se purificó mediante HPLC en gel de sílice (PrepPak Cartridge relleno con Porasil, 15-20 μm, 125A, velocidad de flujo 60 cm³/min, eluyente 0-4% de metanol en diclorometano (v/v), 120 min). Las fracciones que contenían el intermedio 49 se juntaron y concentraron para rendir un sólido blanco (1,04 g). De acuerdo con ¹H-RMN, éste consistía en dos productos principales, a saber los derivados 1''-O y 2'-O monotosilados en una proporción de ~2:1. FAB-MS m/z 718 [M+H]⁺. Found C, 60,4; H, 5,8; N, 9,3; C₃₆H₃₉N₅O₉S requiere: C, 60,2; H, 5,5; N, 9,8%.

40 Ejemplo 52

(1S,3R,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-(2-N-isobutirilguanin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (50)

A una solución del intermedio 49 (940 mg) en THF anhidro (20 cm³) se le añadió una suspensión de hidruro sódico al 60% (p/p, 130 mg, 3,25 mmol), y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió ácido acético (0,25 ml) y la mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (100 cm³) y se lavó con agua (2×100 cm³). Se separó la fase orgánica y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol/diclorometano (1-1,5%, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 50 como un material sólido blanco (451 mg, 57%). δ_H (CDCl₃) 12,25 (1H, br s, NHCO), 10,12 (1H, br s, NH), 7,84 (1H s, 8-H), 7,31-7,15 (10H, m, Bn), 5,72 (1H, s, 1'-H), 4,60-4,46 (5H, m, Bn, 21-H), 4,14 (1H, s, 3'-H), 4,02 (1H, d, J 7,9, 1''-H_a), 3,85 (1H, d, J 7,9, 1''-H_b), 3,78 (2H, s, 5'-H), 2,81 (1H, m, CHCO), 1,24 (3H, d, J 6,8, CH₃ CH), 1,22 (3H, d, J 6,4, CH₃ CH). δ_C (CDCl₃) 179,5 (COCH), 155,6, 148,1, 147,3 (guanina), 137,3, 136,9, 136,0 (guanina, Bn), 128,4, 128,3, 127,9, 127,8, 127,5, 127,4 (Bn), 121,2 (guanina), 87,1, 86,2 (C-1', C-4'), 77,0 (C-3'), 73,6, 72,5, 72,1 (Bn, C-2', C-5'), 64,9 (C-1''), 36,1 (COCH), 19,0 (CH₃ CH), 18,9 (CH₃ CH). FAB-MS m/z 546 [M+H]⁺. Hallado: C, 63,3; H, 5,9; N, 12,5; C₂₉H₃₀N₅O₆ requiere: C, 64,0; H, 5,6; N, 12,9%.

55 Preparación alternativa del compuesto 50. G1AQ

A una suspensión del compuesto 78 (1,5 g, 2,51 mmol), N2-isobutirilguanina (0,93 g, 4,06 mmol) en DCM seco (50 ml) se le añadió BSA (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida; 3,33 ml, 13,5 mmol) y la mezcla se hizo refluir durante 2 h. Se añadió trimetilsilil triflato (1,25 ml, 6,9 mmol) a la mezcla y el reflujo se continuó durante 2 h adicionales. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se diluyó con 200 ml de DCM y se lavó con NaHCO₃ aq. saturado y agua. La cromatografía en columna de gel de sílice (1-2,5% de CH₃OH en diclorometano) rindió 1,05 g (55%) del isómero deseado G1AQ y 380 mg de isómeros con movilidad más elevada, los cuales se convirtieron en G1AQ mediante la repetición del procedimiento descrito más arriba. Se añadió hidróxido amónico (12 ml de una solución aq. al 25%) a una solución de G1AQ (1,05 g en 12 ml de metanol) y la mezcla se agitó durante 1 hr a temperatura ambiente. Después de su concentración, el producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (1-3% CH₃OH en diclorometano) para rendir 700 mg de G3 como un material sólido blanco. Se trataron 700 mg of G3 en THF anhidro (15 ml) con NaH (225 mg de una suspensión al 60% en aceite mineral). 30 min más tarde, la reacción

ES 2 242 291 T3

se detuvo mediante la adición de 1,25 ml de ácido acético, y la mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano, se lavó con NaHCO₃ y agua, y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, con gradiente 0,5-3% metanol/DCM. Rendimiento: 400 mg (75%) of 50.

5 Ejemplo 53

(*7S,3R,4R,7S*)-7-Hidroxi-1-hidroximetil-3-(2-*N*-isobutirilguanin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (51)

Una mezcla del nucleósido 50 (717 mg, 1,31 mmol) y de paladio al 10% sobre carbón (500 mg) se suspendió en metanol (8 cm³) a temperatura ambiente. La mezcla se desgasó varias veces bajo presión reducida y se colocó en una atmósfera de hidrógeno. Después de agitarla durante 24 h, la mezcla se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol/diclorometano (8-20%, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 51 como un sólido parecido al vidrio (440 mg, 92%). δ_{H} (CD₃OD) 8,12 (1H, br s, 8-H), 5,86 (1H, s, 1'-H), 4,50 (1H, s, 2'-H), 4,30 (1H, s, 3'-H), 4,05 (1H, d, J 8,0, 1''-H_a), 3,95 (2H, s, 5'-H), 3,87 (1H, d, J 7,9, 1''-H_b), 2,74 (1H, m, CHCO), 1,23 (6H, d, J 6,9, CH₃ CH). δ_{C} (CD₃OD, señales de la parte carbohidrato) 90,2, 87,6 (C-1', C-4'), 81,1 (C-3'), 72,9, 71,3 (C-2', C-5'), 58,2 (C-1''), 37,1 (COCH), 19,5 (CH₃ CH). FAB-MS m/z 366 [M+H]⁺.

Ejemplo 54

20 (*1R,3R,4R,7S*)-1-(4,4'-Dimetoxitritiloximetil)-7-hidroxi-3-(2-*N*-isobutirilguanin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (52)

Una mezcla del compuesto 51 (440 mg, 1,21 mmol) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (573 mg, 1,69 mmol) se disolvió en piridina anhidra (7 cm³) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se evaporó bajo presión reducida para rendir un aceite. La extracción se realizó en un sistema de diclorometano/agua (1:1, v/v, 40 cm³). Se separó la fase orgánica y se concentró para rendir una solución en un volumen mínimo de diclorometano que contenía un 0,5% de piridina (v/v), la cual se aplicó a una columna de gel de sílice equilibrada con el mismo solvente. El producto se eluyó en un gradiente de concentraciones de metanol (0,6-2%, v/v) en diclorometano conteniendo un 0,5% de piridina (v/v) para rendir el compuesto 52 como un material sólido blanco (695 mg, 86%). δ_{H} (CDCl₃) 12,17 (1H, br s, NHCO), 10,09 (1H, br s, NH), 7,87 (1H, s, 8-H), 7,42-6,72 (13H, m, DMT), 5,69 (1H, s, 1'-H), 4,59 (1H, s, 2'-H), 4,50 (1H, s, 3'-H), 3,98 (1H, d, J 8,1, 1''-H_a), 3,69-3,39 (9H, m, DMT, 5'-H, 1''-H_b), 2,72 (1H, m, CHCO), 1,17 (6H, d, J 6,8, CH₃ CH). δ_{C} (CDCl₃) 179,8 (COCH), 158,8, 144,5, 135,6, 135,5, 130,1, 128,1, 127,7, 126,9, 113,2 (DMT), 155,8, 147,9, 147,5, 137,0, 120,8 (guanina), 87,6, 86,4, 86,1 (C-1', C-4', DMT), 79,7 (C-3'), 72,6, 71,4 (C-2', C-5'), 59,8 (C-1''), 55,2 (DMT), 36,1 (COCH), 19,1, 18,8 (CH₃ CH). FAB-MS m/z 668 [M+H]³⁰.

35 Ejemplo 55

(*1R,3R,4R,7S*)-7-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxil)-1-(4,4'-dimetoxi-tritiloximetil)-3-(2-*N*-isopropionilguanin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (53)

40 Se disolvió el compuesto 52 (670 mg, 1,0 mmol) a temperatura ambiente en diclorometano anhidro (5 cm³) conteniendo N,N-diisopropiletilamina (0,38 cm³, 4 mmol). Se añadió 2-Cianoetil N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,36 cm³, 2,0 mmol) gota a gota con agitación. Transcurridas 5 h, se añadió metanol (2 cm³) y la mezcla se diluyó hasta 100 cm³ mediante la adición de diclorometano, y se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio (50 cm³). Se separó la fase orgánica y se retiró el solvente mediante evaporación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en la mínima cantidad de diclorometano/éter de petróleo (1:1, v/v) conteniendo un 0,5% de piridina (v/v) y se aplicó a una columna rellena con gel de sílice equilibrada con la misma mezcla de solventes. Se lavó la columna con diclorometano/petroleo/piridina (75:25:0,5, v/v/v, 250 cm³) y el producto se eluyó usando un gradiente de metanol en diclorometano (0-1%, v/v) conteniendo un 0,5% de piridina (v/v). Las fracciones que contenían el producto principal se evaporaron y co-evaporaron con tolueno. El residuo se disolvió en diclorometano anhidro (5 cm³) y se precipitó desde éter de petróleo (100 cm³) para rendir el compuesto 53 como un material sólido blanco (558 mg, 64%) después de su filtración y secado. δ_{P} (CDCl₃) 148,17, 146,07. FAB-MS m/z 868 [M+1]⁺.

Ejemplo 56

55

1-(2-*O*-Acetil-4-*C*-acetoximetil-3,5-di-*O*-bencil- β -*D*-ribofuranosil)-4-*N*-benzoil-citosina (54)

A una solución agitada de la mezcla anomérica 33 (4,0 g, 8,22 mmol) y 4-*N*-benzoilcitosina (2,79 g, 13,0 mmol) se le añadió N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (8,16 cm³, 33,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se enfrió hasta 0°C. Se añadió trimetilsilil triflato (3,0 cm³, 16,2 mmol) gota a gota y la mezcla se agitó a 60°C durante 2 h. Se añadieron sucesivamente soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×20 cm³) y salmuera (2×20 cm³), y la fase orgánica separada se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el compuesto 54 como un material sólido blanco (3,9 g, 74%). δ_{H} (CDCl₃) 8,28 (1H, d, J 7,5, 6-H), 7,94-7,90 (2H, m, Bz), 7,65-7,25 (13H, m, Bn, Bz), 7,16 (1H, d, J 7,1, 5-H), 6,22 (1H, d, J 2,8, 1'-H), 5,51 (1H, dd, J 2,8, 5,8, 2'-H), 4,62 (1H, d, J 11,6, Bn), 4,51 (1H, d, J 12,3, 1''-H_a), 4,49-4,34 (4H, m, 3'-H, Bn), 4,21 (1H, d, J 12,3, 1''-H_b), 3,85 (1H, d, J 10,3, 5'-H_a), 3,47 (1H, d, J 10,3, 5'-H_b), 2,13 (3H, s, COCH₃), 2,06 (3H, s, COCH₃). δ_{C} (CDCl₃) 170,52, 169,61 (C=O), 166,83, 162,27 (C-4, C=O), 154,26 (C-2), 145,26 (C-6), 137,25,

ES 2 242 291 T3

136,93, 133,18, 129,0, 128,75, 128,51, 128,45, 128,18, 128,10, 127,89, 127,71 (Bn, Bz), 96,58 (C-5), 89,42, 86,52 (C-1', C-4'), 76,21, 75,10, 74,17, 73,70, 69,70, 63,97 (C-2', C-3', Bn, C-5', C-1''), 20,82 (COCH₃). FAB-MS m/z 664 [M+Na]⁺, 642 [M+H]⁺. Hallado: C, 65,0; H, 5,7, N, 6,5; C₃₅H₃₅N₃O₉ requiere: C, 65,5; H, 5,5; N, 6,5%.

5 Ejemplo 57

1-(3,5-di-O-Bencil-4-C-hidroximetil-β-D-ribofuranosil)-4-N-benzoilcitosine (55)

A una solución agitada del nucleósido 54 (3,4 g, 5,3 mmol) en metanol (20 cm³) se le añadió metóxido sódico (0,663 g, 11,66 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y se neutralizó a continuación con ácido clorhídrico acuoso al 20%. El solvente se evaporó parcialmente y el residuo se extrajo con diclorometano (3×50 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×20 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98,5:1,5, v/v) como eluyente para rendir el compuesto 55 como un material sólido blanco (1,6 g, 54%). δ_H (CDCl₃) 9,95 (1H, br s, NH), 8,33 (1H, d, J 7,4, 6-H), 7,98 (2H, m, Bz), 7,60-7,12 (14H, m, Bn, Bz, 5-H), 6,17 (1H, d, J 1,6, 1'-H), 4,78 (1H, d, J 11,8, Bn), 4,48-4,27 (5H, m, Bn, 2'-H, 3'-H), 3,85 (1H, d, J 11,8, 5'-H), 3,66-3,61 (2H, m, 5'-H_b, 1''-H), 3,47 (1H, d, J 10,4, 1''-H_b). δ_C (CDCl₃) 167,5, 162,31 (C-4, C=O), 155,36 (C-2), 145,34 (C-6), 137,49, 137,08, 133,09, 133,01, 128,94, 128,67, 128,48, 128,30, 128,01, 127,90, 127,80 (Bn, Bz), 96,53 (C-5), 93,97, 89,35 (C-1', C-4'), 76,06, 75,28, 73,70, 72,76, 70,26, 62,44 (C-2', C-3', Bn, C-5', C-1''). FAB-MS m/z 558 [M+H]⁺.

Ejemplo 58

Intermedio 56

Se agitó una solución del nucleósido 55 (2,2 g, 3,94 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (60 cm³) a -20°C y se añadió una suspensión de hidruro sódico al 60% en aceite mineral (p/p, 0,252 g, 6,30 mmol) en siete porciones durante 45 min. Se agitó la solución durante 15 min a -20°C seguida por la adición de cloruro de p-toluenosulfonilo (0,901 g, 4,73 mmol) en pequeñas porciones. Se agitó la solución durante 4 h a -20°C. Se añadió hidruro sódico (0,252 g, 6,30 mmol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (0,751 g, 3,93 mmol) adicional. La mezcla de reacción se mantuvo a -20°C durante 48 h. La reacción se detuvo mediante la adición de hielo-agua fría (50 cm³), después de lo cual se realizó la extracción con diclorometano (3×60 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×20 cm³) y se secó (Na₂SO₄). El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el intermedio 56 (1,80 g).

Ejemplo 59

(1S,3R,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-(4-N-benzoilcitosin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (57)

Se disolvió el intermedio 56 (1,80 g) en DMF anhidro (30,0 cm³) y se añadió una suspensión de hidruro sódico al 60% en aceite mineral (p/p, 0,16 g, 3,9 mmol) en cinco porciones durante 30 min a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 36 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de hielo-agua fría (70 cm³) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (3×50 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×30 cm³) y se secó (Na₂SO₄). Los solventes se retiraron bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99,5:0,5, v/v) como eluyente para rendir el compuesto 57 como un material sólido blanco (1,08 g, 79%). δ_H (CDCl₃) 8,95 (1H, br s, NH), 8,20 (1H, d, J 7,5, 6-H), 7,95-7,92 (2H, m, Bz), 7,66-7,22 (14H, m, Bn, Bz, 5-H), 5,78 (1H, s, 1'-H), 4,70-4,65 (3H, m, 2'-H, Bn), 4,60 (1H, d, J 11,6, Bn), 4,47 (1H, d, J 11,6, Bn), 4,05-3,78 (5H, m, 3'-H, 5'-H_a, 1''-H_a, 5'-H_b, 1''-H_b). δ_C (CDCl₃) 167,0, 162,36 (C-4, C=O), 154,5 (C-2), 144,58 (C-6), 137,46, 136,93, 133,35, 132,93, 129,11, 128,67, 128,50, 128,16, 128,11, 127,68, 127,60 (Bn), 96,35 (C-5), 88,38, 87,67 (C-1', C-4'), 76,14, 75,70, 73,79, 72,27, 72,09, 64,34 (Bn, C-5', C-1'', C-2', C-3'). FAB-MS m/z 540 [M+H]⁺. Hallado: C, 68,0; H, 5,5, N, 7,5; C₃₁H₂₉N₃O₆ requiere: C, 69,0; H, 5,4; N, 7,8%.

55 Ejemplo 60

(1S,3R,4R,7S)-7-Hidroxil-1-hidroximetil-3-(citosin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (57A)

A una solución del nucleósido 57 (0,3 g, 0,55 mmol) en metanol anhidro (22 cm³) se le añadieron 1,4-ciclohexadiene (5,0 cm³) y paladio al 10% sobre carbón (0,314 g). La mezcla se agitó bajo reflujo durante 18 h. Se añadieron paladio al 10% sobre carbón (0,380 g) y 1,4-ciclohexadiene (5,5 cm³) adicionales y la mezcla se hizo refluir durante 54 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice que subsiguientemente se lavó con metanol (1 500 cm³). El filtrado combinado se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (92,5:7,5, v/v) como eluyente para rendir el compuesto 57A como un material sólido blanco (0,051 g, 36%). δ_H ((CD₃)₂SO) 7,73 (1H, d, J 7,7, 6-H), 7,12-7,20 (2H, br s, NH₂), 5,74 (1H, d, J 7,7, 5-H), 5,61 (1H, br s, 3'-OH), 5,39 (1H, s, 1'-H), 5,12 (1H, m, 5'-OH), 4,08 (1H, s, 2'-H), 3,80 (1H, d, J 7,7, 1''-H), 3,81 (1H, s, 3'-H), 3,74 (2H, m, 5'-H_a, 5'-H_b), 3,63 (1H, d, J 7,7, 1''-H_b). δ_C ((CD₃)₂

ES 2 242 291 T3

SO) 165,66 (C-4), 154,58 (C-2), 139,68 (C-6), 93,19 (C-5), 88,42, 86,73 (C-1', C-4'), 78,87, 70,85, 68,32, 56,04 (C-2', C-1'', C-3', C-5'). FAB-MS m/z 256 [M+H]⁺.

Ejemplo 61

5

Intermedio 57B

A el nucleósido 57A (0,030 g, 0,11 mmol) suspendido en piridina anhidra (2,0 cm³) se le añadió cloruro de trimetilsililo (0,14 cm³, 1,17 mmol) y la agitación se continuó durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió cloruro de benzoilo (0,07 cm³, 0,58 mmol) a 0°C y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de enfriar la mezcla de reacción hasta 0°C, se añadió agua (3,0 cm³). Después de agitar durante 5 min, se añadió una solución acuosa de amoníaco (1,5 cm³, 32%, p/p) y la agitación se continuó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se evaporó bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (97,5:2,5, v/v) como eluyente para rendir intermedio 57B material sólido blanco (0,062 g).

15

Ejemplo 62

(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-Dimetoxitritiloximetil)-7-hidroxi-3-(4-N-benzoilcitosina-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (57C)

20

A una solución del intermedio 57B (0,042 g, 0,11 mmol) en piridina anhidra (1,5 cm³) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,06 g, 0,17 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 h, se enfrió hasta 0°C, y se añadió una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (20 cm³). La extracción se realizó usando diclorometano (3×10 cm³). La fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄) y se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol/piridina (98,0:1,5:0,5, v/v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 57C como un material sólido blanco (0,031 g, ~63% from 57A). δ_H (C₅ D₅ N) 12,32 (1H, br s, NHCO), 8,75-7,06 (20H, m, DMT, Bz, H-5, H-6), 6,24 (1H, s, 1'-H), 5,11 (1-H, s, 2'-H), 4,90 (1H, s, 3'-H), 4,38 (1H, d, J 7,6, 1''-H_a), 4,10 (1H, d, J 7,6, 1''-H_b), 4,02 (1H, d, J 10,6, 5'-H_a), 3,87 (1H, d, J 10,6, 5'-H_b), 3,77, 3,76 (2×3H, 2×s, 2×OCH₃). δ_C (C₅ D₅ N) 169,00 (NHCO), 164,24 (C-2), 159,39 (DMT), 150,5, 145,62 (DMT), 5 144,31, 132,89, 130,82, 130,72, 129,09, 128,89, 128,60, 113,96 (DMT), 96,96, 89,01, 87,18, 79,91, 72,56, 70,25 (C-5, C-1', C-4', C-2', C-1'', -3'), 59,51 (C-5'), 55,33 (OCH₃). FAB-MS m/z 662 [M+H]⁺.

30

Ejemplo 63

35

(1R,3R,4R,7S)-7-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-N-benzoilcitosina-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (57D)

A una solución del nucleósido 57C (0,025 g, 0,03 mmol) en diclorometano anhidro (1,5 cm³) se le añadió N,N-diisopropiletilamina (0,03 cm³, 0,17 mmol) seguida por la adición gota a gota de 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridato (0,02 cm³, 0,09 mmol). Después de agitar durante 5 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, se añadió diclorometano/piridina (10,0 cm³, 99,5:0,5, v/v), y se lavó usando una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×8 cm³). se separó la fase orgánica, se secó (Na₂SO₄) y se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol/piridina (99,0:0,5:0,5, v/v/v) como eluyente para rendir el amidito 57D como un aceite amarillo pálido (0,038 g). δ_p (CDCl₃) 147,93.

45

Ejemplo 64

50

9-(2-O-Acetil-4-C-acetyloximetil-3,5-di-O-bencil-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoil-adenina (58)

A una suspensión agitada de la mezcla anomérica 33 (5,0 g, 10,3 mmol) y 6-N-benzoiladenina (3,76 g, 15,7 mmol) en diclorometano anhidro (200 cm³) se le añadió N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (15,54 cm³, 61,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 1 h y a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió trimetilsilil triflato (7,0 cm³, 38,7 mmol) gota a gota y la mezcla se hizo refluir durante 20 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y el volumen de la mezcla se redujo hasta 1/4 bajo presión reducida. Se añadió diclorometano (250 cm³), y la solución se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×50 cm³) y agua (50 cm³). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99,5:0,5, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 58 como material sólido blanco (3,65 g, 52%). δ_H (CDCl₃) 9,25 (1H, br s, NH), 8,71 (1H, s, 8-H), 8,24 (1H, s, 2-H), 8,0 (2H, d, J 7,5, Bz), 7,60-7,23 (13H, m, Bn, Bz), 6,35 (1H, d, J 4,6, 1'-H), 5,99 (1H, dd, J 4,9, 5,3, 2'-H), 4,78 (1H, d, J 5,6, 3'-H), 4,64-4,42 (5H, m, Bn, 1'-H_a), 4,25 (1H, d, J 12,1, 1''-H_b), 3,72 (1H, d, J 10,1, 5'-H_a), 3,56 (1H, d, J 10,1, 5'-H_b), 2,07 (3H, s, COCH₃), 2,02 (3H, s, COCH₃). δ_C (CDCl₃) 170,42, 169,72 (COCH₃), 164,60 (NHCO), 152,51 (C-6), 151,45 (C-2), 149,46 (C-4), 141,88 (C-8), 137,04, 137,00, 133,50, 132,60, 128,86, 128,66, 128,53, 128,41, 128,38, 128,18, 128,06, 127,91, 127,88, 127,79, 127,63, 123,26 (Bz, Bn, C-5), 86,38 (C-1'), 86,25 (C-4'), 77,74, 74,74, 74,44, 73,48 (C-2', C-3', 2xBn), 70,11 (C-1''), 63,42 (C-5'), 20, 70, 20,54 (COCH₃). FAB-MS m/z 666 [M+H]⁺.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 65

9-(3,5-Di-O-bencil-4-C-hidroximetil-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoiladenina (59)

5 A una solución agitada del nucleósido 58 (4,18 g, 6,28 mmol) en metanol (50 cm³) se le añadió metóxido sódico (0,75 g, 13,8 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h, y se añadió hielo. La mezcla se neutralizó usando una solución acuosa al 20% de HCl. La extracción se realizó usando diclorometano (3×75 cm³), se separó la fase orgánica, se secó (Na₂SO₄) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (98,5:1,5, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 59
10 como un material sólido blanco (2,68 g, 73%). δ_H (CDCl₃) 9,42 (1H, br s, NH), 8,58 (1H, s, H-8), 8,16 (1H, s, 2-H), 7,96 (2H, d, J 7,2, Bz), 7,52-7,08 (13H, m, Bn, Bz), 6,18 (1H, d, J 2,5, 1'-H), 4,85-4,38 (4H, m, Bn, 2'-H, 3'-H), 4,33 (2H, s, Bn) 3,90 (1H, d, J 11,9, 1''-H_a), 3,71 (1H, d, J 11,8, 1''-H_b), 3,50-3,39 (2H, m, 5-H). δ_C (CDCl₃) 164,98 (NHCO), 152,19 (C-6), 151,00 (C-2), 149,34 (C-4), 142,28 (C-8), 137,32, 137,25, 133,46, 132,70, 128,69, 128,49, 128,40, 128,11, 128,03, 127,94, 127,83, 127,62, (Bz, Bn), 122,92 (C-5), 90,94, 88,75 (C-1', C-4'), 77,65,
15 74,08, 73,44, 73,20, 71,12, 62,39 (C-1'', C-5', C-2', C-3', 2×Bn). FAB-MS m/z 582 [M+H]⁺. Hallado: C, 65,6; H, 5,5; N, 11,7; C₃₂H₃₁N₅O₆ requiere: C, 66,1H, 5,4; N, 12,0%.

Ejemplo 66

20 *Intermedio 60*

Una solución del nucleósido 59 (2,43 g, 4,18 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (25 cm³) se agitó a -20°C y se añadió una suspensión de hidruro sódico al 60% en aceite mineral (p/p, 0,28 g, 7,0 mmol) en cuatro porciones durante 30 min. Después de agitar durante 1 h, se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (1,34 g, 7,0 mmol) en pequeñas
25 porciones. La mezcla se agitó a -10°C durante 15 h, se añadió hielo-agua fría (50 cm³) y se realizó la extracción con diclorometano (3×50 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×25 cm³), se secó (Na₂SO₄) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el intermedio 60 (1,95 g).

30 *Ejemplo 67*

(1S,3R,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-(6-N-benzoiladenin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (61)

35 El intermedio 60 (1,90 g) se disolvió en DMF anhidro (20 cm³) y se añadió una suspensión de hidruro sódico al 60% en aceite mineral (p/p, 0,16 g, 3,87 mmol) en pequeñas porciones a 0°C. La mezcla se agitó durante 10 h a temperatura ambiente y a continuación se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (75 cm³), se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×25 cm³), se secó (Na₂SO₄), y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol
40 (99:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 61 como material sólido blanco (1,0 g, ~ 44% from 59). δ_H (CDCl₃) 8,71 (H, s, 8-H), 8,23 (1H, s, 2-H), 8,02 (2H, m, J 7,0, Bz), 7,99-7,19 (13H, m, Bn, Bz), 6,08 (1H, s, 1'-H), 4,78 (1H, s, 2'-H), 4,61-4,50 (4H, m, 2×Bn), 4,24 (1H, s, 3'-H), 4,12 (1H, d, J 7,8, 1''-H_a), 4,00 (1H, d, J 7,9, 1''-H_b), 3,85-3,78 (2H, m, 5'-H_a, 5'-H_b). δ_C (CDCl₃) 164,61 (NHCO), 152,32 (C-6), 150,61 (C-2), 149,35 (C-4), 140,67 (C-8), 137,24, 136,76, 133,33, 132,66, 128,68, 128,39, 128,29, 127,94, 127,77, 127,51 (Bn, Bz), 123,43 (C-5), 87,14, 86,52 (C-1', C-4'), 77,21, 76,77, 73,56, 72,57, 72,27, 64,65 (C-2', C-3', C-1'', 2×Bn, C-5'). FAB-MS m/z 564 [M+H]⁺. Hallado: C, 66,2; H, 5,5; N, 11,4; C₃₂H₂₉N₅O₅ requiere: C, 66,2; H, 5,2; N, 12,4%.

Ejemplo 68

50 *(1S,3R,4R,7S)-7-Hidroxil-1-hidroximetil-3-(adenin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (61A)*

A una solución agitada del nucleósido 61 (0,80 g, 1,42 mmol) en diclorometano anhidro (30 cm³) a -78 °C se le añadió gota a gota durante 30 min BCl₃ (solución 1 M en hexano; 11,36 cm³, 11,36 mmol). La mezcla se agitó durante 4 h a -78°C, se añadió gota a gota BCl₃ adicional (solución 1 M en hexano, 16,0 cm³, 16,0 mmol), y la mezcla se agitó
55 a -78°C durante 3 h. A continuación, la temperatura de la mezcla de reacción se elevó lentamente hasta la temperatura ambiente y la agitación se continuó durante 30 min. Se añadió metanol (25,0 cm³) a -78°C, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla se evaporó bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (92:8, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 61A como un material sólido blanco (0,332 g, 84%). δ_H ((CD₃)₂SO) 8,22 (1H, s, 8-H), 8,15 (1H, s, 2-H), 7,33 (2H, s, NH₂), 5,89 (1H, s, 1'-H), 5,83 (1H, d, J 4,2, 3'-OH), 5,14 (1H, t, J 5,9, 5'-OH), 4,14 (1H, s, 2'-H), 4,25 (1H, d, J 4,2, 3'-H), 3,92 (1 H, d, J 7,8, 1''-H_a), 3,81-3,41 (3H, m, 5'-H_a, 5'-H_b, 1''-H_b). δ_C ((CD₃)₂SO) 155,90 (C-6), 152,64 (C-2), 148,35 (C-4), 137,72 (C-8), 118,94 (C-5), 88,48, 85,17 (C-1', C-4'), 79,09, 71,34, 69,83, 56,51 (C-2', C-3', C-1'', C-5'). FAB-MS m/z 280 [M+H]⁺.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 69

(1S,3R,4R,7S)-7-Hidroxi-1-hidroxitetil-3-(6-N-benzooladenin-9-il)-2,5-dioxabi-ciclo[2.2.1]heptano (61B)

5 A una solución agitada del nucleósido 61A (0,32 g, 1,15 mmol) en piridina anhidra (1 cm³) se le añadió cloruro de trimetilsililo (0,73 cm³, 5,73 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadió cloruro de benzoilo (0,67 cm³, 5,73 mmol) a 0°C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió hielo-agua fría (15,0 cm³). Después de agitar durante 5 min, se añadió una solución acuosa al 32% (p/p) de amoníaco (1,5 cm³) y la mezcla se agitó durante 30 min. La mezcla se evaporó hasta
10 la sequedad y el residuo se disolvió en agua (25 cm³). Después de la evaporación de la mezcla bajo presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando diclorometano/metanol (97:3, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 61B como un material sólido blanco (0,55 g). FAB-MS m/z 384 [M+H]⁺.

Ejemplo 70

15 *(1R,3R,4R,7S)-7-Hidroxi-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(6-N-benzooladenin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (61C)*

A una solución agitada del compuesto 61B (0,50 g) en piridina anhidra (20 cm³) se le añadió cloruro de 4,4'-
20 dimetoxitritilo (0,71 g, 2,09 mmol) y 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,1 g). Después de agitar durante 2 h a temperatura ambiente y durante 1 h a 50°C, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (100 cm³). Después de la extracción usando diclorometano (3×50 cm³), la fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con diclorometano/metanol/piridina (98,0:1,5:0,5) para rendir el nucleósido 61C
25 como un material sólido blanco (0,36 g, 50% desde 61A). δ_H (C₅ D₅ N) 12,52 (NHCO), 9,10 (2H, d, J 7,7, Bz), 8,88 (1H, s, 8-H), 8,50-7,11 (17H, m, DMT, Bz, 2-H), 6,65 (1H, s, H-1'), 5,25 (2H, s, H-2', H-3'), 4,71 (1H, d, J 7,8, 1''-H_a), 4,56 (1H, d, J 7,8, 1''-H_b), 4,20 (1H, d, J 10,8, 5'-H_a), 4,07 (1H, d, J 10,8, 5'-H_b), 3,82, 3,81 (2×3H, 2×s, 2×OCH₃). δ_C (C₅ D₅ N) 167,56 (NHCO), 159,24 (C-6), 152,50, 152,08, 151,81, 145,84, 141,45, 136,52, 136,28, 132,55, 130,76, 130,70, 129,32, 128,85, 128,76, 128,46, 127,38, 126,33 (DMT, Bz, C-2, C-4, C-8), 113,84 (C-5), 88,64, 87,20, 86,85,
30 80,52, 73,13, 72,16, 60,86 (C-1', C-4', DMT, C-2', C-3', C-1'', C-5''), 55,24 (OCH₃). FAB-MS m/z 686 [M+H]⁺. Hallado: C, 68,3; H, 5,0; N, 9,7; C₃₉H₃₅N₅O₇ requiere: C, 68,3; H, 5,1; N, 10,2%.

Ejemplo 71

35 *(1R,3R,4R,7S)-7-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(6-N-benzooladenin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (61D)*

A una solución del compuesto 61C (190 mg, 0,277 mmol) en diclorometano anhidro (1,5 cm³) se le añadieron N,N-
40 diisopropiletilamina (0,16 cm³, 0,94 mmol) y 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,07 cm³, 0,42 mmol) a 0°C. La mezcla se dejó atemperar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 5 h. La solución se diluyó con diclorometano (50 cm³), se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×30 cm³) y evaporó bajo presión reducida. Los productos aislaron mediante HPLC en gel de sílice (cartucho PrepPak, 25×100 mm, relleno de Prep Nova-Pak[®] HR Silica 6 μm 60.ANG.; gradiente de la solución B en solución A (desde el 0% hasta el 15% durante 25 min y desde el 15% hasta el 100% durante otros 25 min, solución A: petróleo/diclorometano/piridina, 60/39,6/0,4,
45 v/v/v, solución B: etilacetato. La fracciones que contenían los dos productos principales (tiempo de retención 30-40 min) se juntaron, se concentraron bajo presión reducida, se co-evaporaron con tolueno anhidro (2×40 cm³) y se secaron durante la noche con vacío. El residuo de disolvió en diclorometano anhidro (4 cm³) y se precipitó añadiendo esta solución a éter de petróleo anhidro (80 cm³) con agitación energética. El precipitado se recogió mediante filtración, se lavó con éter de petróleo (2×20 cm³) y se secó bajo presión reducida para rendir el compuesto 61D (178 mg, 73%)
50 como un material sólido blanco. 5p (CD₃CN) 148,42, 147,93.

Ejemplo 72

1-(2,3-O-isopropilideno-4'-C-(4-toluenosulfoniloximetil)-β-D-ribofuranosil)uridina (62)

55 A una solución agitada de 1-(2,3-O-isopropilideno-4'-C-hidroxitetil-β-D-ribofuranosil)uridina (2,0 g, 6,4 mmol) (R. Youssefyeh, D. Tegg, J.P.H. Verheyden, G.H. Jones y J.G. Moffat, *Tetrahedron Lett.* 5:435 (1977); G.H. Jones, M. Taniguchi, D. Tegg y J.G. Moffat, *J. Org. Chem.* 44:1309 (1979)) en piridina anhidra (28 cm³) se le añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (1,46 g, 7,3 mmol) disuelto en piridina anhidra (10 cm³) a -30°C. Transcurridos 30 min, se dejó que
60 la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se detuvo con metanol (4 cm³), se añadió gel de sílice (2 g) y se retiró el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente de 0-3% de metanol en diclorometano (v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 62 como un material sólido rojizo pálido (1,8 g, 60%). δ_H (CDCl₃) 9,80 (1H, br s, NH), 7,80 (2H, d, J 8,3, Ts), 7,46 (1H, d, J 8,1, 6-H), 7,35 (2H, d, J 8,01, Ts), 5,72 (1H, d, J 8,0, 5-H), 5,54 (1H, d, J 3,5, 1'-H), 5,08 (1H, dd, J 3,5, 6,4, 2'-H), 4,94 (1H, d, J 6,4, 3'-H), 4,18 (2H, s, 1''-H),
65 3,82-3,70 (2H, m, 5'-H), 2,45 (3H, s, Ts), 1,46, 1,29 (6 H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 163,6 (C-4), 150,4 (C-2), 145,2 (C-6), 142,9, 132,5, 129,9, 128,0 (Ts), 114,7 (OCO), 102,6 (C-5), 94,9, 87,6, 83,9, 81,5 (C-4', C-1', C-3', C-2'), 68,7, 63,5 (C-1'', C-5'), 26,4, 24,7 (CH₃), 21,7 (Ts). FAB-MS m/z 469 [M+H]⁺.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 73

1-(4-C-(p-Toluenosulfoniloximetil-β-D-ribofuranosil)uridina (63)

5 El nucleósido 62 (1,33 g, 2,83 mmol) se disolvió en ácido acético al 80% (25 cm³) y se agitó a 80°C durante 3 h, después de lo cual se retiró el solvente bajo presión reducida. El residuo se co-evaporó con etanol (10 cm³) y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente del 0-2% de metanol en diclorometano (v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 63 como un material sólido blanco (391 mg, 33%). δ_H (CD₃OD) 7,81 (1H, d, J 8,1, 6-H), 7,77 (1H, d, J 8,4, Ts), 7,40 (2H, d, J 8,6, Ts), 5,74 (1H, d, J 6,6, 1'-H), 5,69 (1H, d, J 8,1, 5-H), 4,17-4,33 (2H, m, 2'-H, 3'-H), 3,67-3,62 (2H, m, 1''-H), 3,26-3,20 (2H, m, 5'-H), 2,43 (3H, s, Ts). δ_C (CD₃OD) 166,0 (C-4), 153,0 (C-2), 146,5 (C-6), 142,5, 130,9, 129,15 (Ts), 103,1 (C-5), 89,0, 87,2 (C-1', C-4'), 75,1, 72,7, 71,3, 63,8 (C-1'', C-3', C-2', C-5'), 21,6 (Ts).

Ejemplo 74

15 *(1S,3R,4R,7S)-7-Hidroxi-1-hidroximetil-3-(uracil-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]-heptano (44)*

A una solución agitada del nucleósido 63 (64 mg, 0,14 mmol) en DMF anhidro (2 cm³) se le añadió lentamente hidruro sódico (8,4 mg, 21 mmol, suspensión al 60% en aceite mineral, p/p) en DMF anhidro (2 cm³) a 0°C. La mezcla de reacción se calentó entonces hasta 120°C durante 6 h. Después de detener la reacción con agua (2 cm³), se retiraron los solventes bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente del 5-7% de metanol en diclorometano (v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 44 como un material sólido blanco (9 mg, 29%). Los datos de RMN concordaban con los mencionados anteriormente para el compuesto 44.

Ejemplo 75

(1S,3R,4R,7S)-7-Acetoxi-1-acetoximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]-heptano (64)

30 A una solución agitada del nucleósido 37 (209,8 mg, 0,78 mmol) en piridina anhidra (2,5 cm³) se le añadió anhídrido acético (0,3 cm³, 3,23 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP (5 mg). Después de agitar durante 2 h, se añadió etanol (4 cm³) y la mezcla se evaporó bajo presión reducida. El residuo se redisolvió en diclorometano y se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (7 cm³). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (97:3, v/v) como eluyente rindiendo 64 como un material sólido blanco (249 mg, 90%). δ_C (CDCl₃) 169,59, 163,20, 149,50, 133,55, 110,64, 87,05, 85,38, 77,84, 71,70, 71,02, 58,60, 20,62, 20,53, 12,78. FAB-MS m/z 355 [M+H]⁺.

Ejemplo 76

40 *(1S,3R,4R,7S)-1-Hidroximetil-3-(5-metil-4-N-benzoilcitosina-1-il)-7-hidroxi-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (65)*

A una solución del nucleósido 64 (232,7 mg, 0,66 mmol) en acetonitrilo anhidro (3 cm³) se le añadió una solución de 1,2,4-triazola (420 mg, 6,1 mmol) y POCl₃ (0,12 cm³, 1,3 mmol) en acetonitrilo anhidro (5 cm³). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió trietilamina anhidra (0,83 cm³), después de lo cual la mezcla se mantuvo durante 90 min a temperatura ambiente. Se añadió trietilamina (0,54 cm³) y agua (0,14 cm³), y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min y evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×9 cm³) y agua (9 cm³). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (3×20 cm³). La fase orgánica combinada se evaporó bajo presión reducida y el residuo se redisolvió en dioxano (4 cm³), después de lo cual se añadió amoníaco acuoso al 32% (0,7 cm³). Después de agitar durante 3 h, la mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida y se co-evaporó con piridina anhidra. El residuo se disolvió en piridina anhidra (3,6 cm³) y se añadió cloruro de benzoilo (0,42 cm³, 3,6 mmol). Después de agitar durante 2 h, la reacción se detuvo con agua (1 cm³) y la mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida. A continuación se redisolvió el residuo EtOAc y se lavó con agua (3×7 cm³). La fase orgánica se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida, y el residuo se disolvió en piridina/metanol/agua (13:6:1, v/v/v, 14 cm³) a 0°C, y se añadió una solución 2M de NaOH en piridina/metanol/agua (13:6:1, v/v/v, 7 cm³). Después de agitar durante 20 min, la mezcla de reacción se neutralizó usando una solución 2M de HCl en dioxano, y la mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando diclorometano/metanol (95:5, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 65 como una espuma amarilla (94,6 mg, 38%). δ_H (CD₃OD) 8,21 (1H, br, s), 8,02 (1H, m), 7,84-7,9 (1H, m), 7,41-7,58 (4H, m), 5,61 (1H, s), 4,36 (1H, s), 4,10 (1H, s), 3,98 (1H, d, J 8,0), 3,94 (2H, s), 3,78 (1H, d, J 7,9), 2,11 (3H, d, J 1,0). δ_C (CD₃OD, selected signals) 133,66, 132,90, 130,63, 129,50, 129,28, 128,65, 90,71, 88,86, 80,57, 72,47, 70,22, 57,53, 14,01. FAB-MS m/z 374 [M+H]⁺.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 77

(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-Dimetoxitritiloximetil)-3-(5-metil-4-N-benzoilcitosina-1-il)-7-O-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (66)

5 A una solución agitada del nucleósido 65 (82 mg, 0,22 mmol) en piridina anhidra (1,5 cm³) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (80 mg, 0,24 mmol) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo adicional (80 mg, 0,24 mmol), y la agitación se continuó durante otras 12 h. Se añadió metanol (0,5 cm³) y la mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol/piridina (98,5:1,0:0,5, v/v/v). El intermedio resultante (FAB-MS m/z 676) (50,2 mg) se co-evaporó con acetonitrilo anhidro y se disolvió en diclorometano anhidro (0,62 cm³). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (0,1 cm³) seguida por la adición de 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,3 cm³, 0,11 mmol). Después de agitar durante 3 h a temperatura ambiente, se añadió agua (1 cm³) y la mezcla resultante se diluyó con etilacetato (10 cm³), se lavó con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×6 cm³) y salmuera (3×6 cm³). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC en columna de gel de sílice. La precipitación tal como se describió para el compuesto 53 rindió el compuesto 66 como un material sólido blanco (29,5 mg, 0,03 mmol, 14%). 8p (CH₃CN) 148, 46, 147, 49.

Ejemplo 78

9-(4-(Hidroximetil)-2,3-O-isopiridene-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoiladenina (67)

20 Una mezcla de cloruro de oxalilo (0,93 ml, 10,75 mmol) y diclorometano (25 ml) se enfrió hasta -70°C. Se añadió dimetil sulfóxido (DMSO, 1,7 ml, 22 mmol) gota a gota bajo agitación intensa. La mezcla se agitó durante 10 min a -70°C y se añadió una solución de 9-(2,3-O-isopropilideno-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoiladenina (3,4 g, 8,27 mmol) en dimetilsulfoxide/diclorometano (1:9 v/v, 20 ml) durante 5 min. La mezcla se agitó a -60°C durante 30 min. Se añadió trietilamina (7 ml, 50,3 mmol) y la mezcla se dejó atemperar hasta temperatura ambiente. La solución se diluyó con diclorometano (50 ml) y se lavó con agua (3×100 ml). La fracciones de agua se lavaron adicionalmente con 100 ml of diclorometano. La fase orgánica se concentró hasta obtener una masa aceitosa, se co-evaporó con dioxano (50 ml) y redisolvió en 30 ml de dioxano. Se añadieron formaldehído aq. al 37% (2,95 ml, 33,4 mmol) y NaOH aq. 2M (8,26 ml); la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y se enfrió hasta 0°C. Se añadió borohidruro de sodio (640 mg, 16,9 mmol) y la mezcla de reacción se dejó atemperar hasta temperatura ambiente during 15 min. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido acético (5 ml), y a la mezcla se le añadió diclorometano y una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (100 ml each). La fase orgánica se lavó con agua (100 ml), se concentró con vacío y el producto se aisló mediante cromatografía en columna (2,5×25 cm) de gel de sílice, mediante el uso de 2-3,2% de metanol en diclorometano (v/v) como eluyente. Rendimiento: 1,85 g (50,7%) del compuesto 67 como un material sólido blanco. δ_H (CDCl₃) 8,72 (1H, s), 8,14 (1H, s), 8,03-8,00 (2H, m), 7,60-7,57 (1H, m), 7,56-7,46 (2H, m), 6,00 (1H, d, J 4,9), 5,35 (1H, dd, J' 5,8, J'' 5,0), 5,13 (1H, d, J 5,8), 3,87-3,78 (4H, m), 1,65 (3H, s), 1,38 (3H, s). 5c (CDCl₃) 164,8, 152,2, 150,4, 150,2, 142,6, 133,3, 132,9, 128,8, 128,0, 124,1, 114,7, 93,3, 90,2, 83,8, 82,5, 65,3, 62,9, 27,3, 25,1. FAB-MS: m/z 442 [M+H]⁺, 464 [M+Na]⁺.

Síntesis alternativa del 67

45 A una solución de 2',3'-O-isopropilidenoadenosina (15 g) en piridina anhidra (250 ml) se le añadió cloruro de trimetilsililo (15,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 min y se enfrió hasta 0°C. Se añadió cloruro de benzoilo (17 ml) gota a gota y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 2-3 h. Se añadieron agua (50 ml) e hidróxido amónico aq. al 25% (100 ml), y la agitación se continuó durante 3 h. A continuación, la mezcla se concentró bajo presión reducida, se co-evaporó con tolueno (2×200 ml) y diclorometano (DCM) y se añadió hidrógeno carbonato sódico saturado. La fase orgánica se evaporó hasta la sequedad para rendir un sólido amarillo. La recrystalización des de etanol resultó en 12,5 g (ca 80%) como un material intermedio sólido blanco. Se enfrió cloruro de oxalilo (4,68 ml) en DCM seco (120 ml) hasta -70°C. Se añadió DMSO (8,5 ml) durante la agitación intensa. Más tarde (10 min) se añadió gota a gota (20 min) una solución del intermedio cuya síntesis se describe más arriba (17 g) en 10% DMSO/DCM (100 ml). Se dejó incrementar la temperatura hasta -50°C a lo largo de un período de 30 min, transcurridos los cuales se detuvo la reacción con trietilamina (35 ml). A la mezcla se le añadió DCM (200 ml), el cual se lavó con agua (3×200 ml). El intermedio se concentró con vacío, se co-evaporó con dioxano, y se redisolvió en dioxano (1 20 ml). Se añadieron formaldehído (37%) y hidróxido sódico aq. 2M (40 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La mezcla se neutralizó con ácido acético (6 ml) y DCM (400 ml) y se le añadió hidrógeno carbonato sódico saturado (400 ml). Se concentró la fase orgánica. El producto 67 se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 1,5-5,0% metanol/ DCM). Rendimiento: 8,5 g (46%) de 67. Los datos fueron tal como se han detallado más arriba en este ejemplo.

Ejemplo 79

9-(2,3-O-Isopropilideno-4-(p-toluenosulfoniloxi-metil)-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoiladenina (68) y 9-(4-hidroximetil-2,3-O-isopropilideno-5-O-(p-toluenosulfonil)-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoiladenina

Una mezcla del compuesto 67 (1,95 g, 4,42 mmol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (1,26 g, 6,63 mmol) se disolvió en 10 ml de piridina anhidra a 0°C La mezcla de reacción se agitó durante 4 h y a continuación se diluyó con diclo-

ES 2 242 291 T3

rometano (100 ml), se lavó con agua (2×100 ml) y se concentró bajo presión reducida. La purificación de la mezcla mediante cromatografía en columna (2,5×20 cm) de gel de sílice con un gradiente (1-4%) de metanol en diclorometano permitió el aislamiento del material de partida 67 (360 mg, 18,5%) y de dos isómeros estructurales, a saber, el 68 (isómero menos polar; 971 mg, 36,7%) y 9-(4-hidroximetil-2,3-O-isopropilideno-5-O-(4'-toluenosulfonyl)-β-D-ribofuranosil)-N⁶-benzoidadenina (isómero más polar; 352 mg, 13,1%) como materiales sólidos blancos. 68: δ_H (CDCl₃) 8,69 (1H, s), 8,11 (1H, s), 8,00 (2H, m), 7,79 (2H, m), 7,58-7,55 (1H, m), 7,50-7,46 (2H, m), 7,34-7,32 (2H, m), 5,88 (1H, d, J 4,9), 5,35 (1H, dd, J'5,8, J''5,0), 5,13 (1H, d, J 5,8), 3,87-3,78 (4H, m), 1,65 (3H, s), 1,38 (3H, s). δ_C (CDCl₃) 164,7, 152,0, 150,2, 150,1, 144,9, 142,5, 133,2, 132,7, 132,3, 129,6, 128,6, 127,9, 127,8, 123,9, 114,6, 93,1, 87,9, 83,4, 81,6, 68,3, 64,4, 27,1, 25,0, 21,5. FAB-MS: m/z 596 [M+H]⁺.

10 Ejemplo 80

9-(4-(p-Toluenosulfonyloximetil)-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoidadenina (69)

15 Una solución del compuesto 68 (940 mg, 1,58 mmol) en 10 ml de trifluoroácido acético aq. al 90% se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente y concentró con vacío hasta obtener una masa aceitosa. Después de la co-evaporación con metanol (2×20 ml) y tolueno (20 ml), la mezcla se purificó mediante cromatografía en columna (2×25 cm) de gel de sílice, en un gradiente de metanol (2-5,0%) en diclorometano como eluyente para rendir el compuesto 69 (825 mg, 94%) como material sólido blanco. δ_H (metanol-d₄) 8,67 (1H, s), 8,53 (1H, s), 8,05 (2H, d, J 7,7), 7,75 (2H, d, J 8,2), 7,63 (1H, m), 7,53 (2H, m), 7,32 (2H, d, J 8,0), 5,94 (1H, d, J 7,1), 4,92 (1H, dd, J'7,1, J''5,3), 4,41 (1H, d, J 5,1), 4,38 (1H, d, J 10,2), 4,28 (1H, d, J 10,2), 3,80 (1H, d, J 12,0), 3,68 (1H, d, J 12,0), 2,35 (3H, s). δ_C (metanol-d₄) 168,2, 152,9, 150,8, 151,2, 146,4, 144,9, 134,7, 134,1, 134,0, 130,8, 129,7, 129,4, 129,1, 125,1, 90,0, 88,4, 75,3, 73,1, 71,1, 64,2, 21,6. FAB-MS: m/z 556 [M+H]⁺.

25 Ejemplo 81

9-(4-(p-Toluenosulfonyloximetil)-3,5-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoidadenina (70)

30 A una solución del compuesto 69 (780 mg, 1,40 mmol) en piridina anhidra (7 ml) se le añadió 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (500 μL, 1,57 mmol) a 0°C. Después de agitar la durante 2 h a 0°C, se añadió 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano adicional (50 μL, 0,16 mmol). La mezcla de reacción se dejó atemperar hasta temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano (100 ml) y se lavó con agua (2×100 ml). La fase orgánica se concentró, y el residuo se purificó mediante el uso de HPLC preparativa (cartucho PrepPak, Porasil 15-20 μm 125. ANG.; eluyente: 0-3% de metanol en diclorometano (v/v) en 120 min; velocidad de flujo: 60 ml/min). La concentración con vacío rindió 870 mg (78%) de compuesto 70 como un material sólido blanco. δ_H (CDCl₃) 8,65 (1H, s), 8,03 (2H, m), 8,00 (1H, s), 7,83 (2H, d, J 8,4), 7,58 (1H, m), 7,49 (2H, m), 7,34 (2H, d, J 8,4), 5,87 (1H, s), 5,70 (1H, d, J 6,2), 4,68 (1H, d, J 6,2), 4,59 (1H, d, J 10,8), 4,31 (1H, d, J 11,0), 3,91 (2H, s), 2,45 (3H, s), 1,03-0,84 (28H, m). δ_C (CDCl₃) 164,9, 152,2, 150,5, 150,0, 144,7, 142,9, 133,5, 132,9, 132,8, 129,7, 128,8, 128,1, 128,0, 123,6, 90,3, 85,3, 76,0, 75,0, 68,7, 65,2, 21,6, 17,5, 17,4, 17,2, 17,1, 17,0, 16,9, 13,1, 13,0, 12,5, 12,4. FAB-MS: m/z 798 [M+H]⁺.

Ejemplo 82

9-(2-O,4-C-Metilene-3,5-O-(tetraisopropylidissiloxa-1,3-diil)-β-D-ribofuranosil)-6-N-benzoidadenina (71)

45 Una solución del compuesto 70 (540 mg, 0,68 mmol) en THF anhidro (20 ml) se enfrió hasta 0°C y se añadió hidruro sódico (130 mg of 60% suspension en mineral oil, 3,25 mmol) bajo agitación. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y se neutralizó a continuación mediante la adición de 750 μL de ácido acético. Se añadió diclorometano (50 ml), la mezcla se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×50 ml) y se concentró bajo presión reducida. El residuo se aplicó a una columna (2,5×25 cm) de gel de sílice y el producto se eluyó en un gradiente de concentración (de 0,5 al 1,2%) de metanol en diclorometano como eluyente para rendir el compuesto 71 (356 mg, 84%) como una espuma blanca. δ_H (CDCl₃) 8,77 (1H, s), 8,28 (1H, s), 8,03 (2H, m), 7,59 (1H, m), 7,50 (2H, m), 6,08 (1H, s), 4,86 (1H, s), 4,56 (1H, s), 4,14 (1H, d, J 13,2), 4,06 (1H, d, J 7,7), 3,97 (1H, d, J 13,2), 3,89 (1H, d, J 7,7), 1,12-0,95 (28H, m). δ_C (CDCl₃) 164,8, 152,6, 150,5, 149,6, 140,7, 133,6, 132,7, 128,7, 127,9, 123,1, 89,4, 86,5, 78,9, 71,7, 71,2, 56,7, 17,3, 17,1, 17,0, 16,9, 16,8, 13,3, 13,1, 12,5, 12,2. FAB-MS: m/z 626 [M+H]⁺.

Ejemplo 83

7-Hidroxi-1-hidroximetil-3-(6-N-benzoidadenin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]-heptano (61B)

60 Se añadió trietilamina tris-hidrofluoruro (300 μL, 1,84 mmol) a una solución del compuesto 71 (420 mg, 0,067 mmol) en THF anhidro (7 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h y se concentró hasta un aceite, el cual se purificó mediante cromatografía en columna (2×25 cm) de gel de sílice eluyéndose con 4-10% de metanol en diclorometano (v/v). Rendimiento: 232 mg (92%) del compuesto 61B como un material sólido blanco. Los datos de RMN fueron idénticos a los mencionados previamente para 61B.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 84

1-(3,5-Di-O-bencil-4-C-(p-toluenosulfoniloximetil)-2-O-p-toluenosulfonil-β-D-ribofuranosil)timina (72)

5 Una solución de la 1-(3,5-di-O-bencil-4-C-(hidroximetil)-β-D-ribofuranosil)timina 35 (1,48 g, 3,16 mmol), DMAP (1,344 g, 0,011 mol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (1,45 g, 7,6 mmol) en diclorometano (20 ml) se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (30 ml) y se lavó con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×20 ml) y cloruro sódico (2×25 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y evaporó bajo presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol:diclorometano (1:99, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 72 (1,95 g, 80%) como un material sólido blanco. FAB-MS m/e 776. δ_C (CDCl₃) 162,9, 149,8 (C-2, C-4), 145,8, 145,2 (2×Ts), 136,9, 136,8 (2×Bn), 134,3 (C-6), 132,1, 132,0, 130,0, 129,9, 129,0 128,9, 128,4, 128,3, 128,2, 128,0, 127,7 (2×Ts, 2×Bn), 111,2 (C-5), 85,3, 84,0 (C-1', C-4'), 78,9, 78,3, 75,2, 74,3, 72,7, 69,1 (C-2', C-3', C-5', C-1'', 2×Bn), 21,7 (2×CH₃), 11,9 (CH₃). Anal. Calculado para: C₃₉H₄₀N₂S₂O₁₁: C, 60,30; H, 5,19; N, 3,61. Hallado: C, 59,95; H, 5,11, N 3,81.

15 Ejemplo 85

1-(2-Bencilamino-2-deoxi-3,5-di-O-bencil-2-N,4-C-metilene-β-D-ribofuranosil)timina (73)

20 Una solución de 72 (8,6 g, 11,1 mol) en bencilamina (10 ml) se agitó a 130°C durante 36 h. La mezcla de reacción se sometió directamente a cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol:diclorometano (1:99, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 73 (1,79 g, 30%) como un material sólido blanco. FAB-MS m/e 540. δ_C (CDCl₃) 30 163,9, 149,8 (C-2, C-4), 139,2, 137,6, 137,3 (3×Bn), 135,6 (C-6), 128,5, 128,4, 128,3, 128,2, 128,0, 127,7, 127,0 (3×Bn), 109,6 (C-5), 88,2, 86,3 (C-1', C-4'), 76,7, 73,8, 72,0, 66,0, 63,8, 57,9, 57,8 (C-2', C-3', C-5', C-1'', 3×Bn), 25 12,2 (CH₃). Anal. Calculado para C₃₂H₃₃N₃O₅ × 0,5 H₂: C, 70,06; H, 6,25; N, 7, 66. Hallado: C, 70,00; H, 6,06; N, 7,50.

Ejemplo 86

30 *1-(2-Amino-2-deoxi-2-N,4-C-metilen-β-D-ribofuranosil)timina (74)*

A una solución del nucleósido 73 (1,62 g, 0,003 mol) en etanol (150 ml) se le añadió hidróxido de paladio al 20% sobre carbón (3 g) y la suspensión se agitó durante 5 días bajo hidrógeno. El catalizador se eliminó mediante filtración (gel de sílice) y se lavó con metanol (20 ml). El filtrado combinado se concentró bajo presión reducida para rendir un material sólido blanco que se eliminó mediante filtración y se lavó con metanol:diclorometano (1:4, v/v) para rendir un intermedio monobencilado (0,82 g, 76%). FAB-MS: m/e 360 (M+H)⁺. ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz): 163,7, 149,8 (C-2, C-4), 138,2 (Bn), 134,9 (C-6), 128,2, 127,5, 127,4 (Bn), 107,8 (C-5), 87,8, 87,6 (C-1', C-4'), 72,7, 68,9, 65,9, 61,7, 49,4 (C-2', C-3', C-5', C-1'', Bn), 11,9 (CH₃). Anal. Calculado para C₁₉H₂₁N₃O₅: C, 60,16; H, 5,89; N, 11,69. Hallado: C, 59,86; H, 5,61; N, 11,56. Una mezcla de este intermedio (0,1 g, 0,29 mmol), de formato de amonio (0,085 g, 1,35 mmol), y de paladio al 10% sobre carbón (130 mg) en metanol anhidro (7 ml) se calentó bajo reflujo durante 2 h. El catalizador se eliminó mediante filtración (gel de sílice) y se lavó con metanol (15 ml), y el filtrado combinado se concentró hasta su sequedad bajo presión reducida. El residuo se sometió a una cromatografía en gel de sílice usando metanol:diclorometano (1:9, v/v) como eluyente para rendir el compuesto del título 74 (0,053 g, 71%) como un material sólido blanco. FAB-MS m/e 270. δ_H (DMSO-d₆) 11,29 (bs, 1H, NH), 7,73 (d, 1H, J 1,1, 6-H), 5,31 (s, 1H, 1'-H), 5,29 (br s, 1H, 3'-OH), 5,13 (m, 1H, 5'-OH), 3,81 (s, 1H, 3'-H), 3,69 (m, 2H, 5'-H), 3,23 (s, 1H, 2'-H), 45 2,88 (d, 1H, J 9,8, 1''-H_a), 2,55 (d, 1H, J 9,8, 1''-H_b), 1,77 (d, 3H, J 0,8, CH₃). δ_C (DMSO-d₆) 164,0, 150,1 (C-2, C-4), 135,6 (C-6), 107,8 (C-5), 89,5, 87,9 (C-1', C-4'), 68,7, 61,9, 57,1, 49,4, (C-2', C-3', C-5', C-1''). Anal. Calculado para C₁₁H₁₅N₃O₅ × 0,5H₂O: C, 47,48; H, 5,80; N, 15,10. Hallado: C, 47,54; H, 5,30; N, 14,79.

50 *Procedimiento alternativo para la conversión de 73 a 74*

A una solución de 73 (0,045 g, 0,0834 mmol) en metanol (6 ml) se le añadió Pd al 10% sobre carbón (0,118 g) y, en tres porciones durante 3 horas, formato de amonio (0,145 g, 0,0023 mol). La suspensión se hizo refluir durante 4,5 h. El catalizador se eliminó mediante filtración (gel de sílice) y se lavó con metanol (4×3 ml). El filtrado combinado se concentró y el residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol:diclorometano (1:9, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 74 (0,015 g, 67%). Los datos espectrales concordaban con los descritos previamente en el ejemplo para el 74.

Ejemplo 87

60 *1-(2-Amino-2-deoxi-2-N,4-C-metilene-2-N-trifluoroacetil-β-D-ribofuranosil)timina (74-COCF₃)*

A una suspensión del nucleósido 74 (0,050 g, 0,186 mmol) en metanol (2 ml) se le añadieron DMAP (0,013 mg, 0,106 mmol) y etil trifluoroacetato (0,029 ml, 0,242 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se sometió a cromatografía en columna, sobre gel de sílice usando metanol:diclorometano (2,5:97,5, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 74-COCF₃ del título como un material sólido blanco, después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida (0,055 g, 81%). FAB-MS m/z 366 [M+H]⁺ ¹³C RMN (CD₃OD, 62,9 MHz) δ 166,5, 157,7 (q, ²J_C, F 37,5 Hz, COCF₃), 157,6 (q, ²J_C, F 37,2 Hz,

ES 2 242 291 T3

COCF₃), 151,8, 136,8, 136,8, 117,6 (d, ¹J_C, F 287,5 Hz, CF₃), 117,5 (d, ¹J_C, F 286,5 Hz, CF₃), 110,8, 110,8, 90,7, 89,3, 87,7, 87,3, 70,1, 68,6, 66,2, 66,2, 64,5, 57,9, 53,3, 12,7. Anal. Calculado para C₁₃H₁₄N₃O₆F₃. C, 42,8; H, 3,9; N, 11,5. Hallado: C, 42,5; H, 4,0; N, 11,2.

5 Ejemplo 88

1-(2-Amino-2-deoxi-5-O-4,4'-dimetoxitritil-2-N,4-C-metileno-2-N-trifluoroacetil-β-D-ribofuranosil)timina (74-DMT)

A una solución del nucleósido 74-COCF₃ (0,030 g, 0,082 mmol) en piridina anhidra (0,6 ml) a 0°C se le añadió gota a gota (durante 20 min) cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,054 g, 0,159 mmol) disuelto en piridina anhidra:diclorometano (0,6 ml, 1:1, v/v) y la mezcla se agitó durante 10 h a temperatura ambiente. Se añadió una mezcla de hielo y agua (5 ml) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (3×5 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×2 ml), se secó (Na₂SO₄) y filtró. El filtrado se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida y el residuo se sometió a cromatografía en columna en gel de sílice usando metanol:diclorometano:piridina (1,5:98,0:0,5, v/v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 74-DMT como un material sólido blanco, después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida (0,051 g, 93%). FAB-MS m/z 667 [M]⁺, 668 [M+H]⁺. FAB-HRMS calcd. for C₃₄H₃₂N₃O₈F₃⁺: 667,2142. Hallado: 667,2146. ¹³C RMN (C₅D₅ N, 100,6 MHz) δ 165,1, 165,0, 159,5, 159,5, 151,4, 145,7, 136,3, 136,1, 134,8, 134,6, 130,9, 130,9, 130,9, 128,9, 128,9, 128,7, 128,7, 128,4, 127,7, 123,2, 114,1, 114,1, 114,0, 110,4, 89,4, 87,9, 87,5, 87,4, 87,2. 70,8, 69,0, 66,0, 64,4, 60,5, 60,2, 55,5, 53,6, 53,4, 49,9, 13,2, 13,1.

Ejemplo 89

1-(2-Amino-3-O-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)phosphino-2-deoxi)-5-O-4,4'-dimetoxitritil-2-N,4-C-metileno-2-N-trifluoroacetil-β-D-ribofuranosil)timina (74A)

A una solución del nucleósido 74-DMT (0,121 g, 0,181 mmol) en diclorometano anhidro (2 ml) se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (0,093 ml, 0,54 mmol) y 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,057 ml, 0,26 mmol) a 0°C y la mezcla se agitó durante 10 h a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con diclorometano (20 ml), se extrajo con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×10 ml), se secó (Na₂SO₄) y filtró. El filtrado se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida y el residuo se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice usando metanol:diclorometano:piridina (1,5:98,0:0,5, v/v/v) como eluyente para rendir producto crudo (0,107 g) después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano anhidro (1 ml), y el nucleótido 74A se precipitó mediante la adición gota a gota a éter de petróleo agitado enérgicamente (60-80°C, 30 ml) a -30°C, para rendir una material sólido blanco después de la filtración (0,090 g, 57%). FAB-MS m/z 868 [M+H]⁺, 890 [M+Na]⁺. ³¹P RMN (CD₃CN, 121,5 MHz) δ 150,4, 150,2, 148,8, 149,1.

Ejemplo 90

1-(2-Amino-2-N,4-C-metileno-3,5-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-β-D-ribofuranosil)timina (74B)

A una solución del nucleósido 74 (0,20 g, 0,74 mmol) en piridina anhidra (3 ml) a -15°C se le añadió gota a gota (durante 3 h) 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (0,305 ml, 0,0011 mol) y la mezcla se agitó durante 10 h a temperatura ambiente. Se añadió MeOH (3 ml) y la mezcla se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol:diclorometano (1:99, v/v) para rendir el nucleósido 74B como un material sólido blanco después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida (0,370 mg, 97%). FAB-MS m/z 512 [M+H]⁺. ¹H RMN ((CD₃)₂SO, 400 MHz) δ 11,37 (bs, 1H), 7,48 (s, 1H), 5,32 (s, 1H), 4,06 (d, 1H, J 13,5 Hz), 4,00 (s, 1H), 3,84 (d, 1H, J 13,5 Hz), 3,41 (s, 1H), 2,92 (d, 1H, J 10,2 Hz), 2,64 (d, 1H, J 10,2 Hz), 1,74 (s, 3H), 1,10-0,92 (m, 28 H). ¹³C RMN ((CD₃)₂SO, 62,9 MHz) δ 163,8, 149,8, 134,1, 107,9, 89,5, 87,9, 70,1, 61,1, 57,9, 49,3, 17,2, 17,2, 17,0, 16,9, 16,8, 16,7, 12,6, 12,2, 11,7. Anal. calculado para: C₂₃H₄₁N₃O₆Si₂: C, 54,0; H, 8,1; N, 8,2. Hallado: C, 54,0; H, 8,3; N, 7,8.

Ejemplo 91

1-(2-Deoxi-2-metilamino-2-N,4-C-metileno-3,5-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-β-D-ribofuranosil)timina (74C)

A una solución del nucleósido 74B (0,33 g, 0,64 mmol) en THF anhidro:diclorometano (4:1, v/v) a -10°C se le añadió gota a gota (durante 30 min) 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU, 0,125 ml, 0,836 mmol) y yoduro de metilo (0,05 ml, 0,79 mmol) y la mezcla se agitó durante 48 h a 10°C. Se añadió gota a gota DBU (0,05 ml, 0,33 mmol) y yoduro de metilo (0,020 ml, 0,32 mmol) adicional (durante 15 min) a la mezcla de reacción y se continuó la agitación a 10°C durante 24 h. La mezcla se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida y el residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol:diclorometano (1:99, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 74C como un material sólido blanco después de la evaporación de los solventes (0,25 g, 740%). FAB-MS m/z 526 [M+H]⁺. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,19 (bs, 1H), 7,65 (d, 1H, J 1,3 Hz), 5,59 (s, 1H), 4,11 (s, 1H), 4,05 (d, 1H, J 13,2 Hz), 3,87 (d, 1H, J 13,2 Hz), 3,44 (s, 1H), 2,98 (d, 1H, J 9,5 Hz), 2,71 (d, 1H, J 9,5 Hz), 2,72 (s, 3H), 1,91 (d, 1H, J 1,1 Hz), 1,12-0,96 (m, 28 H). ¹³C RMN (CDCl₃, 62,9 MHz) δ 163,7, 149,6, 135,2, 109,7, 90,9, 85,7, 71,4, 67,3, 58,6, 58,2, 41,2, 17,5, 17,4, 17,3, 17,2, 17,1, 16,9, 13,3, 13,1, 13,0, 12, 6, 12,1. Anal. calculado para: C₂₄H₄₄N₃O₆Si₂, 0,25H₂O: C, 54,4; H, 8,3; N, 7,9. Hallado: C, 54,4; H, 8,1; N, 7,7.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 92

1-(2-Deoxi-2-metilamino-2-N,4-C-metilen-β-D-ribofuranosil)timina (74D).

5 A una solución del nucleósido 74C (0,40 g, 0,76 mmol) en THF a temperatura ambiente se le añadió una solución de fluoruro de tetrabutilamonio en THF (1,0 M, 2,2 ml, 2,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 min, después de lo cual se añadió piridina:agua:metanol (6 ml, 3:1:1, v/v/v). La mezcla se añadió a resina Dowex 50×200 (2,2 g, forma H⁺ (piridinio), 100-200 mesh) suspendida en piridina:agua:metanol (6 ml, 3:1:1, v/v/v) y la mezcla resultante se agitó durante 20 min. Después de la filtración, el residuo se lavó con piridina:agua:metanol (3×3 ml, 3:1:1, v/v/v) y el filtrado combinado se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida para rendir un residuo aceitoso después de la co-evaporación con metanol (2×5 ml). La cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol:diclorometano (1:49, v/v) como eluyente proporcionó el nucleósido 74D como un material sólido blanco después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida (0,17 g, 79%). FAB-MS m/z 284 [M+H]⁺. FAB-HRMS calculado para C₁₂H₁₈N₃O₅⁺: 284,12465. Hallado: 284,12402. ¹H RMN ((CD₃)₂SO, 400 MHz) δ 11,3 (bs, 1H, NH), 7,70 (d, 1H, J 1,1 Hz, 6-H), 5,50 (s, 1H, 1'-H), 5,26 (d, 1H, J 4,9 Hz, 3'-OH), 5,12 (t, 1H, J 5,7 Hz, 5'-OH), 3,87 (d, 1H, J 4,8 Hz, 3'-H), 3,67 (d, 2H, J 5,5 Hz, 5'-H), 3,12 (s, 1H, 2'-H), 2,87 (d, 1H, J 9,3 Hz, 5''-H_a), 2,56 (s, 3H, NCH₃), 2,52-2,49 (1H, m, 5''-H_b), 1,77 (s, 3H, CH₃). ¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ 7,80 (d, 1H, J 1,3 Hz, 6-H), 5,71 (s, 1H, 1'-H), 4,07 (s, 1H, 3'-H), 3,83 (s, 2H, 5'-H), 3,36 (s, 1H, 2'-H), 3,08 (d, 1H, J 9,9 Hz, 5''-H_a), 2,68 (s, 3H, NCH₃), 2,57 (d, 1H, J 9,9 Hz, 5''-H_b), 1,88 (d, 3H, J 1,1 Hz, CH₃). ¹³C RMN (CD₃OD, 62,9 MHz) δ 166,6, 151,9, 20 137,4, 110,4, 91,3, 85,2, 71,4, 69,1, 59,4, 58,7, 40,2, 12,2.

Ejemplo 93

1-(2-Deoxi-5-O-4,4'-dimetoxitritil-2-metilamino-2-N,4-C-metilen-β-D-ribofuranosil)timina (74E)

25 A una solución del nucleósido 74D (0,135 g, 0,477 mmol) en piridina anhidra (1,5 ml) a 0°C se le añadió gota a gota (durante 20 min) una solución de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,238 g, 0,702 mmol) en piridina anhidra:diclorometano (1,0 ml, 1:1, v/v) y la mezcla resultante se agitó durante 10 h a RT. Se añadió una mezcla de hielo y agua (5 ml) y se reextrajo la mezcla con diclorometano (3×10 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×5 ml), se secó (Na₂SO₄) y se filtró. El filtrado se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida y el residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol:diclorometano:piridina (1:98:1, v/v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 74E como un material sólido blanco después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida (0,20 g, 72%). FAB-MS m/z 586 [M+H]⁺. ¹H RMN (C₅D₅N, 400 MHz) δ 13,2 (bs, 1H), 7,98 (d, 1H, J 1,3 Hz), 7,98-7,00 (m, 13H), 6,12 (s, 1H), 4,78 (d, 1H, J 3,7 Hz), 3,88-3,79 (m, 4H), 3,71 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 3,29 (d, 1H, J 9,3 Hz), 2,84 (d, 1H, J 9,3 Hz), 2,81 (s, 3H), 1,85 (d, 3H, J 0,9 Hz). ¹³C RMN (C₅D₅N, 62,9 MHz) δ 165,1, 159,2, 151,4, 145,9, 136,5, 136,4, 130,8, 130,7, 128,7, 128,4, 127,4, 113,8, 109,6, 89,8, 86,8, 85,1, 72,0, 68,7, 60,9, 59,4, 55,2, 40,1, 13,1. Anal. Calculado para: C₃₃H₃₅N₃O₇, 0,25H₂O: C, 67,2; H, 6,1; N, 7,1. Hallado: C, 67,2; H, 6,2; N, 6,9.

Ejemplo 94

1-(3-O-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)posphino)-5-O-4,4'-dimetoxitritil-2-metilmino-2-N,4-C-metilen-2-deoxi-β-D-ribofuranosil)timina (74F)

45 A una solución del nucleósido 74E (0,130 g, 0,222 mmol) en diclorometano anhidro (2 ml) a 0°C se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (0,088 ml, 0,514 mmol) y 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,065 ml, 0,291 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 h a temperatura ambiente. Se añadió diclorometano (30 ml) y se reextrajo la mezcla con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (3×10 ml), se secó (Na₂SO₄) y filtró. El filtrado se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida y el residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol:diclorometano:piridina (0,5:98,5:1,0, v/v/v) como eluyente para rendir el producto crudo (0,120 g) después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano anhidro (1 ml) y mediante la adición gota a gota a éter de petróleo agitado enérgicamente (60-80°C, 30 ml) a -30°C se precipitó el nucleótido 74F para rendir un material sólido blanco después de la filtración (0,090 g, 52%). ³¹P RMN (CD₃CN, 121,5 MHz) δ 147,7.

Ejemplo 95

1-(3,5-Di-O-bencil-4-C-(p-toluenosulfoniloximetil)-2-O-p-toluenosulfonoil-β-D-ribofuranosil)uracilo (75)

60 A una solución agitada de 1-(3,5-di-O-bencil-4-C-hidroxiometil-β-D-ribofuranosil)uracilo 41 (3,55 g, 7,81 mmol) en diclorometano (50 cm³) se le añadieron DMAP (3,82 g) y cloruro de p-toluenosulfonilo (4,47 g, 23,5 mmol) a temperatura ambiente. La agitación se continuó durante 2 h, y se añadió diclorometano (100 cm³). La mezcla de reacción se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (2×75 cm³) y se secó (Na₂SO₄). La fase orgánica se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99,5:0,5, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 75 (4,65g, 78%) como un material sólido blanco. δ_H (CDCl₃) 8,49 (1H, br s, NH), 7,67 (1H, d, J 8,3, 6-H), 7,51-7,03 (18H, m, Bn, Ts), 6,0 (1H, d, J 7,6, 1'-H), 5,05 (1H, m, 2'-H), 4,91 (2H, m, 5-H, Bn), 4,56 (2H, m, Bn), 4,42 (1H, d, J 10,4, Bn), 4,31 (1H, d, J 4,9, 3'-H), 4,05 (2H, m, 1''-H), 3,75-3,64 (2H, m, 5'-H), 2,41 (3H, s, CH₃), 2,34 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 162,2 (C-

ES 2 242 291 T3

4), 149,5 (C-2), 146,0, 145,3 (Ts), 139,0 (C-6), 136,7, 131,9, 130,0, 129,9, 128,9, 128,7, 128,5, 128,4, 128,3, 128,2, 128,0, 127,6 (Bn, Ts) 102,7 (C-5), 85,5 (1'-C), 84,4 (4'-C), 79,2, 78,3, 75,1, 74,3, 72,4, 69,1 (Bn, 3'-C, 2'-C, 5'-C, 1''-C), 21,7, 21,6 (Ts). FAB-MS m/z 763. Hallado: C, 61,2; H, 4,4; N, 3,3; C₃₈H₃₈N₂O₁₁S₂ requiere: C, 59,8; H,5,0; N,3,6.

5

Ejemplo 96

1-(2-Desoxi-3,5-di-O-bencil-2-S,4-C-metilene-2-mercapto-β-D-fibofuranosil)timina (76)

10 A una solución agitada del nucleósido 75 (3,70g, 4,86 mmol) en DMF (40 cm³) se le añadió tioacetato potásico (0,83 g, 7,28 mmol). La mezcla se agitó y calentó hasta 110°C durante 80 h. Después de la evaporación bajo presión reducida, se añadió H₂O (100 cm³). La extracción se realizó con diclorometano (4×50 cm³) y la fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), filtró y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando diclorometano/metanol (99,6:0,4, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 76 (1,65 g, 75%) como un material sólido blanco. δ_H (CDCl₃) 9,08 (1H, br s, NH), 7,98 (1H, d, J 8,1, 6-H), 7,39-7,20 (10H, m, Bn), 5,85 (1H, s, 1'-H), 5,26 (1H, d, J 8,1, 5-H), 4,61 (1H, d J 11,4, 5'-H), 4,56 (2H, s, Bn), 4,45 (1H, d, J 11,4, Bn), 4,14 (1H, d, J 1,7, 3'-H), 3,82 (2H, m, Bn), 3,72 (1H, d, J 1,9, 2'-H), 3,02 (1H, d, J 9,9, 1''-H), 2,78 (1H, d, J 9,9, 1''-H_b). δ_C (CDCl₃) 163,4 (C-4), 150,0 (C-2), 139,9 (C-6), 137,2, 136,8, 128,6, 128,5, 128,2, 127,9, 127,7 (Bn), 100,8 (C-5), 90, 8, 88,8 (C-1', C-4'), 76,5, 73,8, 72,0, 70,0 (2×Bn, C-3', C-5'), 49,52 (C-2'), 35,63 (C-1''). FAB-MS m/z 453. Hallado: 20 C, 63,4; H, 5,1; N, 5,9; C₂₄H₂₄N₂O₅S requiere: C, 63,7; H, 5,3; N, 6,1.

Ejemplo 97

1-(2-O-p-toluenosulfonil-4-C-(p-toluenosulfoniloximetil)-β-D-ribofuranosil)uracilo (76A)

25

A una solución del compuesto 75 (0,80 g, 1,0 mmol) en etanol absoluto (2 cm³) se le añadió hidróxido de paladio al 20% sobre carbón (0,80 g) y la mezcla se desgasó varias veces con hidrógeno y se continuó la agitación bajo hidrógeno durante 48 h. El catalizador se eliminó mediante filtración, y el filtrado se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 76A (0,30 g, 49%) como un material sólido blanco. δ_H (CD₃ OD) 7,67 (4H, m), 7,45 (1H, d, J 8,2 Hz), 7,34 (4H, m), 5,86 (1H, d, J 8,0 Hz), 5,40 (1H, d, J 8,1 Hz), 4,95 (1H, m), 4,35 (1H, d, J 5,0 Hz), 4,17 (2H, m), 3,61 (2H, s), 2,40 (6H, s). δ_C (CD₃OD) 165,4, 151,6, 147,5, 146,6, 141,3, 134,0, 133,8, 131,4, 130,9, 129,2, 128,9, 103,7, 88,0, 85,4, 80,7, 72,4, 71,0, 64,3, 21,7, 21,6. FAB-MS m/z 583 [M+H]⁺.

35 Ejemplo 98

1-(3,5-O-(Tetraisopropildisiloxa-1,3-diil)-2-O-p-toluenosulfonil-4-C-(p-toluenosulfonil-oximetil)-β-D-ribofuranosil)uracilo (76B)

40 A una solución agitada del nucleósido 76A (0,27 g, 0,46 mmol) en piridina anhidra (4 cm³) se le añadió 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano (0,22 cm³, 0,70 mmol). Después de agitar durante 48 h, la mezcla se enfrió hasta 0°C y se añadió una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (15 cm³). Se reextrajo la mezcla con diclorometano (3×10 cm³) y la fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄) y filtró. El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando diclorometano/metanol (99,5:0,5, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 76B (0,37 g, 97%) como un material sólido blanco. δ_H (CDCl₃) 8,70 (1H, br s), 7,80 (4H, m), 7,36 (4H, m), 6,98 (1H, d, J 8,1Hz), 5,64 (1H, d, J 8,0Hz), 5,18 (2H, m), 4,98 (1H, d, J 7,0 Hz), 4,39-4,32 (2H, m), 3,92-3,76 (2H, s), 2,45 (6H, s), 1,27-0,66 (28H, m). δ_C (CDCl₃) 162,9, 149,3, 145,6, 144,8, 143,9, 132,9, 130,1, 129,9, 128,2, 128,1, 102,2, 94,6, 84,7, 80,4, 72,8, 67,8, 64,6, 21,7, 17,3, 17,2, 17,1, 16,9, 16,8, 13,1, 12,8, 12,3. FAB-MS m/z 825 [M+H]⁺.

50

Ejemplo 99

1-(2-Deoxi-2-mercapto-2-S,4-C-metilen-3,5-O-(tetraisopropildisiloxa-1,3-diil)-β-D-ribofuranosil)uracilo (76C)

55 A una solución agitada del nucleósido 76B (0,26 g, 0,32 mmol) en DMF (5 cm³) se le añadió tioacetato de potasio (0,054 g, 0,47 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 110°C durante 20 h. Después de la evaporación de la mezcla bajo presión reducida, se añadió H₂O (20 cm³). La extracción se realizó con diclorometano (3×10 cm³) y la fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), filtró y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (99,25:0,75, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 76C (0,125 g, 77%) como un material sólido blanco. δ_H (CDCl₃) 8,55 (1H, br s), 8,02 (1H, d, J 8,1Hz), 5,82 (1H, s, 1'-H), 5,65 (1H, d, J 8,1 Hz), 4,37 (1H, d, J 2,1 Hz), 4,10 (1H, d, J 13,2 Hz), 3,90 (1H, d, J 13,1 Hz), 3,53 (1H, d, J 2,1 Hz), 2,92 (1H, d, J 10,1 Hz), 2,74 (1H, d, J 10,0 Hz), 1,30-0,80 (28H, m). δ_C (CDCl₃) 163,2, 149,8, 139,6, 100,9, 91,4, 90,7, 71,5, 59,8, 51,5, 34,4, 17,5, 17,3, 17,1, 16,9, 15,5, 13,6, 13,3, 13,1, 12,9, 12,3. FAB-MSm/z 515 [M+H]⁺.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 100

1-(2-Deoxi-2-mercapto-2-S,4-C-metilen-β-D-ribofuranosil)uracilo (76D)

5 A una solución agitada del nucleósido 76C (25 mg, 0,049 mmol) en THF (1,0 cm³) se le añadió una solución de fluoruro de tetrabutilamonio (0,20 cm³ de una solución 1M en THF, 0,20 mmol) a 0°C. Después de agitar la mezcla a 0°C durante 1 h, se añadió H₂O (5 cm³) y la mezcla se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (97:3, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 76D (9,0 mg, 69%) como un material sólido blanco. δ_H (CD₃OD) 8,19 (1H, d, J 8,1 Hz, 6-H), 5,77 (1H, s, 1'-H), 5,65 (1H, d, J 8,1 Hz, 5-H), 4,31 (1H, d, J 2,1 Hz, 3'-H), 3,86 (2H, s, 5'-H), 3,53 (1H, d, J 2,2 Hz, 2'-H), 2,93 (1H, d, J 10,3 Hz, 1''-H_a), 2,73 (1H, d, J 10,3 Hz, 1''-H_b). δ_C (CD₃OD) 166,5, 152,0, 141,7, 101,2, 92,1, 92,0, 71,4, 59,9, 53,6, 35,4. FAB-MS m/z 273 [M+H]⁺.

Ejemplo 101

15 *1-(2-Deoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-mercapto-2-S,4-C-metilen-β-D-ribofuranosil)uracilo (76E)*

A una solución de 76D (0,2 g, 0,37 mmol) en piridina anhidra (5 cm³) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,186 g, 0,55 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la solución durante 5 h, después de lo cual la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (30 cm³) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (3×50 cm³). La fase orgánica combinada se separó y se secó (Na₂SO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice con diclorometano/metanol/piridina (98,5:1,0:0,5 v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 76E como un material sólido blanco marronoso (0,175 g, 83%). δ_C (CDCl₃) 164,5, 159,4, 151,6, 145,7, 139,9, 136,4, 136,0, 135,6, 130,9, 130,8, 128,8, 128,5, 128,4, 127,5, 127,4, 122,7, 113,9, 101,5, 91,7, 90,2, 87,6, 71,8, 61,9, 55,3, 53,7, 36,2, 30,6. FAB-MS m/z 574 [M]⁺, 575 [M+H]⁺ (Hallado: C, 65,2; H, 5,4; N, 5,0; C₃₁H₃₀N₂O₇S requiere: C, 64,8; H, 5,3; N, 4,9%).

Ejemplo 102

30 *1-(3-O-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino)-(2-deoxi-5-O-(4,4'-dimetoxi-tritil)-2-mercapto-2-S,4-C-metilen-β-D-ribofuranosil)uracilo (76F)*

A una solución de 76E (0,160 g, 0,28 mmol) en diclorometano anhidro (2 cm³) a 0°C se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (0,27 cm³) y 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosfor-amidocloridito (97 mg, 0,42 mmol). Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (30 cm³). La extracción se realizó usando diclorometano (3×20 cm³) y la fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄) y se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol/piridina (99:0,5:0,5 v/v) como eluyente para rendir una espuma blanca. Este residuo se disolvió en diclorometano (2 cm³) y el producto se precipitó desde petróleo ligero (100 cm³, enfriado hasta -40°C) bajo agitación vigorosa. El precipitado se recogió mediante filtración, y se secó finalmente para rendir el nucleósido 76F como un material sólido blanco (95 mg, 44%). δ_p (CDCl₃) 148,9, 149,0.

Ejemplo 103

45 *3,5-Di-O-bencil-1,2-O-isopropilideno-4-C-(p-toluenosulfoniloximetil)-β-D-ribo-furanosa (77)*

Una solución de 3,5-di-O-bencil-4-C-hidroximetil-1,2-O-isopropilideno-α-D-ribofuranosa 31 (15,38 g, 38,4 mmol), piridina anhidra (20 cm³) y diclorometano anhidro (80 ml) se agitó a -5°C. Se disolvió cloruro de p-toluenosulfonilo (8,75 g, 46,0 mmol) en diclorometano anhidro (8 cm³) y se añadió durante 15 min. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 17 h. La reacción se detuvo con hielo-H₂O fría (200 cm³). La extracción se realizó con diclorometano (5×150 cm³) y la fase orgánica combinada se lavó con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×100 cm³) y salmuera (3×100 cm³), se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano:metanol (98,5:1,5, v/v) como eluyente para rendir 77 como un aceite claro (17,4 g, 82%). δ_H (CDCl₃) 7,79-7,19 (14H, m, Bn), 5,66 (1H, d, J 3,6, 1-H), 4,69-4,20 (8H, m, Bn, 5-H_a, 5-H_b, 3-H, 2-H), 3,53 (1H, d, J 10,3, 1'-H_a), 3,46 (1H, d, J 10,3, 1'-H_b), 2,40 (3H, s, CH₃), 1,29 (3H, s, CH₃), 1,26 (3H, s, CH₃). δ_C (CDCl₃) 144,6, 137,9, 137,3, 133,0, 129,8, 128,4, 128,3, 128,1, 128,0, 127,9, 127,7, 127,6 (aromatic), 113,6 (C(CH₃)₂), 104,2, (C-1), 84,7 (C-4), 79,0, 78,7, 73,7, 72,7, 70,7, 70,2, (Bn, C-2, C-3, C-5, C-1'), 26,3, 26,0 (C(CH₃)₂), 21,6 (CH₃). FAB-MS m/z 555 [M+H]⁺. (Hallado: C, 64,8; H, 6,2; C₃₀H₃₄O₈S requiere: C, 64,9; H, 6,1%).

Ejemplo 104

65 *1,2-Di-O-acetil-3,5-di-O-bencil-4-C-(p-toluenosulfoniloximetil)-α,β-D-ribofuranosa(78)*

Una solución de la furanosa 77 (17,4 g, 31,4 mmol) en ácido acético al 80% (250 cm³) se agitó a 60°C durante 20 h. Se retiró el solvente en vacuo y el residuo se co-evaporó con tolueno (3×20 cm³). El residuo se redisolvió en piridina anhidra (100 cm³). Se añadió anhídrido acético (14,2 cm³) y se agitó la solución durante 15 h a temperatura ambiente.

ES 2 242 291 T3

La reacción se detuvo mediante la adición of hielo-H₂O fría (200 cm³), y la mezcla se extrajo con diclorometano (4×150 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (2×125 cm³) y salmuera (3×150 cm³), se secó (Na₂SO₄), filtró y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano:metanol (98,5:1,5, v/v) como eluyente para rendir 78 ($\alpha,\beta \sim 1:1$) como un aceite claro (13,5 g, 72%). δ_C (CDCl₃) 169,8, 169,6, 69,4, 168,8 (C=O), 144,7, 137,7, 137,5, 132,8, 129,7, 129,6, 128,5, 128,4, 128,3, 128,2, 128,0, 127,8, 127,7, 127,6 (Bn), 97,4, 94,2 (C-1), 86,4, 84,2 (C-4), 78,9, 77,5, 74,5, 74,1, 73,7, 73,5, 71,8, 70,6, 70,5, 69,6, 69,5 (Bn, C-2, C-3, C-1'), 21,6, 21,0, 20,8, 20,6, 20,4 (COCH₃, C(CH₃)₂). FAB-MS m/z 599 [M+H]⁺.

10 Procedimiento alternativo para la preparación del compuesto 78

3-*O*-Bencil-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -*D*-glucofuranosa (30B). A una solución de 1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -*D*-alofuranosa (30A) (obtenida de Pfanstiehl Laboratories Inc.) (40 g) en dimetilformamida a 0°C se le añadió hidruro sódico en pequeñas porciones. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h, se añadió bromuro de bencilo gota a gota a lo largo de un período de 1 h. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió metanol para detener la reacción y se retiró la dimetilformamida bajo presión. El jarabe se extrajo con acetato de etilo y se lavó con salmuera. La evaporación de la capa de acetato de etilo rindió un semisólido (93%). Homogéneo mediante TLC.

20 3-*O*-Bencil-1,2-*O*-isopropilideno- α -*D*-glucofuranosa (30C). Se consiguió la hidrólisis parcial de 30B (50 g) en ácido acético al 75% en un período de 20 h. La concentración a un volumen menor y la extracción con acetato de etilo rindieron 30C, 40 g, (90%). Homogéneo mediante TLC.

25 3-*O*-Bencil-1,2-*O*-isopropilideno- α -*D*-ribo-pentodialdofuranosa (30D). Una solución de 30C (40 g) en agua/metanol (1:1) se añadió lentamente con agitación a una solución de periodato sódico en agua a 0°C La reacción se agitó durante 2 h, se añadió etilenglicol y se reextrajo la mezcla con acetato de etilo. Se evaporó el extracto seco para obtener 30D, 32 g, (89%). Homogéneo mediante TLC. En este paso, la adición de metanol es esencial para completar la reacción.

30 3-*O*-Bencil-4-(hidroximetil)-1,2-*O*-isopropilideno- α -*D*-eritro-pentofuranosa (30E). Se añadieron formaldehído acuoso al 37% e hidróxido sódico 1 N a 0°C a una solución agitada de 30D (32 g) en agua y tetrahidrofurano (1:1), se continuó la reacción durante 16 h, se extrajo en acetato de etilo y se lavó con salmuera. La evaporación de la capa orgánica rindió un jarabe que cristalizó a partir de éter/éter de petróleo como un sólido blanco, 23 g, the filtrate fue un aceite que se solidificó como un sólido con bajo punto de fusión, 10 g. Rendimiento total de 30E, 92%. [23 g (el sólido blanco era más del 99% puro mediante TLC), 10 g de sólido con bajo punto de fusión (tenía impurezas que se movían rápidamente es TLC, aproximadamente un 75% puro)]. En este paso la adición de tetrahidrofurano es muy importante para el curso y consecución de la reacción.

40 3,5-Di-*O*-bencil-4-*C*-hidroximetil-1,2-*O*-isopropilideno- α -*D*-ribofuranosa (31). La bencilación de 30E (20 g) con NaH 60% y BnBr a -10°C rindió una mezcla de dos isómeros. La *flash*-cromatografía en columna rindió 31 como el isómero principal, 14 g, (54%). Homogéneo mediante TLC.

45 3,5-Di-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilideno-4-*C*-tosil- α -*D*-ribofuranosa (77). Una solución de 31 (12,5 g) en piridina a 0°C se trató con cloruro de *p*-toluenosulfonilo y se prosiguió la reacción a temperatura ambiente durante 14-16 h. La supresión de la piridina, la extracción con cloruro de metileno y solución saturada de bicarbonato rindieron 77, 14 g, (80%). Homogéneo mediante TLC.

50 1,2-di-*O*-acetil-3,5-di-*O*-bencil-4-*C*-tosil-*D*-ribofuranosa (78). La hidrólisis de 77 (14 g) se realizó en ácido acético al 75% a 65°C durante 18 h. Se retiró el solvente bajo presión y se trató el residuo con etanol (3×100), tolueno (3×50) y piridina anhidra (2×50). (Este compuesto 78 cristalizó a partir de éter de petróleo como un sólido blanco fino.) El residuo se disolvió en piridina seca y se trató con anhídrido acético a temperatura ambiente durante 8 h. La extracción con acetato de etilo y bicarbonato saturado, seguida por lavado con salmuera rindió 78 como una mezcla de anómeros α y β , 12 g, (83%). Una comparación directa con una muestra auténtica de 78 (TLC, HPLC, RMN) confirmó su identidad y pureza.

55 Ejemplo 105

1-(2-*O*-Acetil-3,5-di-*O*-bencil-4-*C*-(*p*-toulenesulfoniloximetil)- β -*D*-ribofuranosil)-timina (79)

60 A una solución agitada de la mezcla anomérica 78 (12,8 g, 21,4 mmol) y timina (5,38 g, 42,7 mmol) en acetonitrilo anhidro (182 cm³) se le añadió N,*O*-bis(trimetilsilil)acetamida (31,68 ml, 128,23 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, y se continuó la agitación a 60°C durante 1,5 h. Después de enfriarla hasta 0°C, se añadió gota a gota trimetilsilil triflato (6,57 ml, 30,33 mmol), y la mezcla se agitó a 60°C durante 10 h. La mezcla de reacción se neutralizó con hielo-solución acuosa saturada y fría de hidrógeno carbonato sódico (90 ml). La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró bajo presión reducida hasta medio volumen. La extracción se realizó usando diclorometano (4×200 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×150 cm³) y salmuera (3×150 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano:metanol

ES 2 242 291 T3

(99:1 to 98:2, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 79 como un material sólido blanco (13,1 g, 92%). δ_{H} (CDCl₃) 9,04 (s, 1H, NH), 7,73-7,19 (15H, m, 6-H, aromático), 5,94 (1H, d, J 5,5, 1'-H), 5,37 (1H, d, J 5,6, 2'-H), 4,57-4,40 (5H, m, 31-H, 5'-H_a, 5'-H_b, Bn), 4,14 (2H, s, Bn), 3,75 (1H, d, J 10,2, 1''-H_a), 3,57 (1H, d, J 10,2, 1''-H_b), 2,41 (3H, s, CH₃ C₆ H₅), 2,02 (3H, s, COCH₃), 1,54 (3H, s, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 169,8 (C=O), 163,5 (C-4), 150,2 (C-2), 145,0, 136,8, 135,6, 132,1, 129,7, 128,5, 128,0, 127,9, 127,8, 127,5 (aromatic), 113,5 (C-5), 86,8, 85,3, 77,6, 74,6, 74,3, 73,6, 70,8, 68,8 (Bn, C-1', C-3', C-2', C-4'), 21,3 (CH₃), 20,5 (COCH₃), 11,8 (CH₃). FAB-MS in/z 665 [M+H]⁺ (Hallado: C, 61,2; H, 5,3; N, 4,1; S, 4,7, C₃₄H₃₆O₁₀N₂S requiere: C, 61,4; H, 5,4; N, 4,2; S, 4,8).

Ejemplo 106

1-(3,5-Di-O-bencil-4-C-(p-toulenesulfoniloximetil)-β-D-ribofuranosil)timina (80)

El nucleósido 79 (13,1 g, 19,7 mmol) se disolvió en una solución de amoníaco en metanol (200 cm³, preparada diluyendo amonio metanólico saturado en un volumen igual de metanol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se evaporó subsiguientemente, y el residuo se disolvió en diclorometano (400 cm³). Se lavó la fase orgánica con salmuera (3×150 cm³), se secó (Na₂SO₄), filtró y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano:metanol (99,5:0,5, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 80 como un material sólido blanco (10,7 g, 87%). δ_{H} (CDCl₃) 9,66 (s, 1H, NH), 7,71-7,21 (15H, m, 6-H, aromatic), 5,72 (1H, d, J 5,1, 1'-H), 4,75, 4,55 (2H, each d, J 11,5, Bn), 4,51 (2H, s, Bn), 4,37 (1H, t, J 5,4, 2'-H), 4,30-4,12 (3H, m, 3'-H, Bn), 3,76 (1H, d, J 10,2, 1''-H_a), 3,59 (1H, d, J 10,2, 1''-H_b), 2,39 (3H, s, CH₃ C₆ H₅), 1,48 (3H, s, CH₃). δ_{C} (CDCl₃) 163,8 (C-4), 150,9 (C-2), 145,0, 137,0, 136,9, 135,9, 132,3, 129,8, 128,7, 128,6, 128,2, 128,1, 128,0, 127,6 (aromatic), 111,0 (C-5), 89,6, 85,3, 78,4, 74,5, 73,8, 71,1, 69,7, (Bn, C-1', C-3', C-2', C-4', C-1''), 21,6 (CH₃), 12,0 (CH₃). FAB-MS m/z 623 [M+H]⁺ (Hallado: C, 61,5; H, 5,2; N, 4,4; S, 5,2, C₃₂H₃₄O₉N₂S requiere: C, 61,7; H, 5,4; N, 4,5; S, 5,1).

Ejemplo 107

(1S,3R,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benzoiloximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo-[2.2.1]heptano (36)

A una solución agitada del nucleósido 80 (10,65 g, 17,1 mmol) en DMF anhidro (150 cm³) se le añadió una suspensión al 60% de hidruro sódico en aceite mineral (0,9 g, 22,2 mmol) en pequeñas porciones a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 15 h, después de lo cual se añadió hidruro sódico al 60% adicional (0,205 g, 5,12 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante 22 h adicionales a 0°C. Se añadió metanol (20 cm³) y la mezcla de reacción se concentró subsiguientemente bajo presión reducida hasta medio volumen. Se añadió hielo-H₂O fría (300 cm³) y se realizó la extracción con diclorometano (5×150 cm³). Se lavó la fase orgánica combinada con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3×40 cm³) y salmuera (3×40 cm³), se secó (Na₂SO₄), filtrada y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano:metanol (99,5:0,5, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 36 como un material sólido blanco (7,1 g, 92%). Los datos espectroscópicos estaban de acuerdo con los datos proporcionados anteriormente para 36 (Hallado: C, 66,2; H, 5,8; N, 6,1; C₂₅H₂₆N₂O₆ requiere: C, 66,6; H, 5,8; N, 6,2).

Ejemplo 108

3,5-Di-O-bencil-1,2-O-isopropilideno-4-C-metanosulfoniloximetil-α-D-ribofuranosa (200)

A una solución agitada de la furanosa 31 (2,16 g, 5,39 mmol) en piridina anhidra (3 ml) a 0°C se le añadió gota a gota cloruro de metanosulfonil (0,61 ml, 16,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a temperatura ambiente, se detuvo con hielo-agua fría (300 ml) y se extrajo con diclorometano (2×300 ml). Los extractos combinados se lavaron con hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (300 ml) y a continuación se secaron (MgSO₄). Se retiró el solvente mediante destilación bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano como eluyente para rendir el producto 200 como un aceite claro (2,55 g, 99%); ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,37-7,24 (10H, m, Bn), 5,78 (1H, d, J 3,8 Hz, H-1), 4,85 (1H, d, J 11,7 Hz, Bn), 4,73 (1H, d, J 11,9 Hz, Bn), 4,64 (1H, dd, J 4,0, 5,3 Hz, H-2), 4,54 (1H, d, J 11,9 Hz, H-5'), 4,52 (1H, d, J 11,9 Hz, Bn), 4,46 (1H, d, J 11,9 Hz, H-5'), 4,41 (1H, d, J 11,8 Hz, Bn), 3,60 (1H, d, J 10,4 Hz, H-5), 3,50 (1H, d, J 10,5 Hz, H-5), 3,06 (3H, s, SO₂ CH₃), 1,68 (3H, s, CH₃), 1,34 (3H, s, CH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 137,79, 137,31, 128,54, 128,48, 128,16, 128,01, 127,87, 127,79 (Bn), 113,66 (C(CH₃)₂), 104,46 (C-1), 84,88 (C-4), 78,48, 78,41 (C-2, C-3), 73,65, 72,63, 70,78, 70,16 (Bn, C-5, C-5'), 37,84 (SO₂ CH₃), 26,20 (CH₃), 25,69 (CH₃); MS FAB: 501 (M+Na, 100%). Hallado: C, 60,37; H, 6,29; S, 6,53; C₂₄H₃₀O₈S requiere: C, 60,24; H, 6,32; S, 6,70%.

Ejemplo 109

Metil 3,5-di-O-bencil-4-C-metanosulfoniloximetil-α-D-ribofuranosido (201)

Una solución de la furanosa 200 (1,133 g, 2,37 mmol) en ácido clorhídrico metanólico (20% p/p, 31,7 ml) y agua (4,4 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de su neutralización con hidrógeno carbonato sódico (s), se extrajo la solución con diclorometano (2×150 ml). Los extractos combinados se lavaron con agua (150 ml) y a continuación se secaron (MgSO₄). Se retiró el solvente mediante destilación bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano:metanol (99:1) como eluyente para rendir el

ES 2 242 291 T3

producto 201 ($\beta:\alpha \sim 2:1$) como un aceite claro (1,018 g, 95%); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 7,39-7,22 (m, Bn), 4,86 (br s, Bn), 4,69-3,99 (m, Bn, H-5', H-1, H-2, H-3), 3,68 (d, J 8,9 Hz, H-5 β), 3,51 (d, J 9,8 Hz, H-5 α), 3,46 (s, $\text{OCH}_3\alpha$), 3,34 (d, J 9,1 Hz, H-5 β), 3,32 (d, J 9,7 Hz, H-5 α), 3,28 (s, $\text{OCH}_3\beta$), 2,97 (3H, s, $\text{SO}_2 \text{CH}_3\beta$), 2,93 (3H, s, $\text{SO}_2 \text{CH}_3\alpha$); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3): δ 137,74, 136,98, 128,70, 128,64, 128,58, 128,56, 128,37, 128,21, 128,15, 128,09, 127,98, 127,86, 127,83 (Bn), 107,54 (C-1 β), 103,39 (C-1 α), 84,65, 83,18, 81,90, 78,87 (C-4, C-3), 75,04, 74,07, 73,73, 73,70, 73,38, 72,56, 72,11, 70,85, 70,55, 70,20 (C-2, Bn, C-5, C-5'), 55,90 ($\text{OCH}_3\alpha$), 54,96 ($\text{OCH}_3\beta$), 37,18 ($\text{SO}_2 \text{CH}_3\beta$), 37,07 ($\text{SO}_2 \text{CH}_3\alpha$); MS FAB: 475 (M+Na, 25%). Hallado: C, 58,40; H, 6,33; $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{S}$ requiere: C, 58,39; H, 6,24%.

Ejemplo 110

(3R)- y (3S)-(1S,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-metoxi-2,5-dioxabi-ciclo[2.2.1]heptano (202 y 203)

Una solución de 201 (3,32 g, 7,34 mmol) en DMF anhidro (25 ml) se agitó a 0°C y se añadió una dispersión en aceite al 60% de hidruro sódico (700 mg, 16,9 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 90 min, se detuvo con agua (300 ml) y se extrajo con dietileter (2x300 ml). El extracto combinado se lavó con agua (200 ml) y se secó (MgSO_4). Se retiró el solvente bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano como eluyente para rendir los dos productos 202 y 203 como aceites claros (1,571 g, 60% y 0,777 g, 30% respectivamente).

(1S,3R,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-metoxi-2,5-dioxabi-ciclo[2.2.1]heptano (202). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 7,36-7,26 (10H, m, Bn), 4,81 (1H, s, H-1), 4,65 (1H, d, J 11,9 Hz, Bn), 4,61 (2H, s, Bn), 4,56 (1H, d, J 11,9 Hz, Bn), 4,11 (1H, s, H-2), 4,09 (1H, s, H-3), 4,01 (1H, d, J 7,5 Hz, H-5'), 3,80-3,77 (3H, m, H-5', H-5), 3,39 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3): δ 138,05, 137,36, 128,47, 128,44, 127,88, 127,73, 127,63 (Bn), 104,97 (C-1), 85,13 (C-4), 79,16 (C-3), 77,18 (C-2), 73,64 (Bn), 72,26, 72,10 (Bn, C-5'), 66,50 (C-5), 55,34 (OCH_3); MS FAB: 379 (M+Na, 28%). Hallado: C, 70,55; H, 6,97; $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$ requiere: C, 70,77; H, 6,79%.

(1S,3R,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-metoxi-2,5-dioxabiciclo-[2.2.1]heptano (203). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 7,36-7,26 (10H, m, Bn), 5,00 (1H, s, H-1), 4,67-4,54 (4H, m, Bn), 4,18 (1H, s, H-2), 3,99 (1H, s, H-3), 3,99-3,90 (2H, m, H-5'), 3,75-3,68 (2H, m, H-5), 3,49 (3 H, s, OCH_3); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3): δ 137,83, 137,53, 128,51, 128,48, 127,96, 127,82, 127,71, 127,62 (Bn), 104,05 (C-1), 88,44 (C-4), 79,54 (C-3), 77,16 (C-2), 73,68 (Bn), 72,61 (C-5'), 72,24 (Bn), 65,73 (C-5), 56,20 (OCH_3); MS FAB: 379 (M+Na, 100%).

Ejemplo 111

(1R,2S,3S)-2-Benciloxi-3-benciloximetil-1-(metoxi(timin-1-il)metil)-3-trimetilsililoxitetrahidrofurano (204)

A una solución de 202 (216 mg, 0,606 mmol) y timina (153 mg, 1,22 mmol) en acetonitrilo anhidro (9,3 ml) se le añadió BSA (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida, 0,90 ml, 3,6 mmol) y se agitó bajo reflujo durante 15 min. Se enfrió la solución hasta 0°C y se añadió gota a gota trimetilsilil triflato (0,153 ml, 0,777 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 18 h y a 60°C durante 24 h, la reacción se detuvo con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (20 ml), y la extracción se realizó usando diclorometano (2x50 ml). El extracto combinado se lavó con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (50 ml) y se secó (MgSO_4). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano:metanol (98:2) como eluyente para rendir el producto 204 (mezcla de diastereómeros $\sim 1,7:1$) como un sólido (196 mg, 67%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 7,36-7,14 (m, Bn, H-6), 5,77 (1H, d, J 7,9 Hz, H-1'), 5,57 (1H, d, J 5,8 Hz, H-1'), 4,68-4,43 (m, Bn, H-2'), 4,12-3,68 (m, H-5', H-5', H-3'), 3,32 (s, OCH_3), 3,24 (s, OCH_3), 1,93 (d, J 0,9 Hz, CH_3), 1,86 (d, J 1,1 Hz, CH_3), 0,14 (s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0,12 (s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ 163, 68, 163,55 (C-4), 151,58, 151,07 (C-2), 137,84, 137,74, 137,32 (Bn), 135,93, 135,10 (C-6), 128,57, 128,42, 128,41, 128,10, 127,95, 127,85, 127,77, 127,74 (Bn), 111,38, 111,01 (C-5), 86,89, 85,61, 85,40, 84,72, 83,40, 83,31, 82,10 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 75, 20, 73, 98, 73, 62, 73, 59, 72, 55, 72, 13, 71,04, 70,74 (Bn, C-5', C-5''), 56,82, 56,54 (OCH_3), 12,47, 12,38 (CH_3), 1,72, 1,69 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); MS FAB: 555 (M+H, 65%), 577 (M+Na, 70%). Hallado: C, 62,76; H, 6,88; N, 4,94; $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}$ requiere: C, 62,79; H, 6,90; N, 5,05%.

Ejemplo 112

(1R,2S,3S)-2-Benciloxi-3-benciloximetil-1-(metoxi(6-N-benzoiladenin-9-il)metil)-3-trimetilsilil-oxitetrahidrofurano (205)

A una solución de 202 (240 mg, 0,673 mmol) y 6-N-benzoiladenina (301 mg, 1,26 mmol) en acetonitrilo anhidro (8,2 ml) se le añadió BSA (0,67 ml, 2,7 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se enfrió la solución hasta 0°C y se añadió gota a gota trimetilsilil triflato (0,25 ml, 1,33 mmol). Después de agitar a 65°C durante 18 h, la reacción se detuvo con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (50 ml), se extrajo con diclorometano (2x50 ml). El extracto combinado se secó (MgSO_4). Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano:metanol (98:2) como eluyente para rendir el producto 205 (mezcla de diastereómeros $\sim 1,8:1$) como un sólido (185 mg, 41%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 8,78 (s, H-8), 8,21 (s, H-2), 8,17 (s, H-2), 8,03-8,00 (m, Bz), 7,61-7,49 (m, Bz), 7,36-7,23 (m, Bn), 7,07-7,04 (m, Bz), 5,85 (1H, d, J 7,9 Hz, H-1'), 5,76 (1H, d, J 6,0 Hz, H-1'), 4,74-4,40 (m, Bn, H-2'), 4,22-3,62 (m, H-5', H-5', H-3'), 3,33 (s, OCH_3), 3,24 (s, OCH_3), 0,15 (s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0,14 (s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3): δ 164,68 (HNC=O), 153, 17, 152,99 (C-

ES 2 242 291 T3

6), 149,47 (C-2), 141,82, 141,66 (C-8), 137,74, 137,71, 137,65 (Bn), 133,87, 132,87, 132,78 (Bz), 128,97, 128,93, 128,45, 128,42, 128,38, 128,14, 127,97, 127,88, 127,82, 127,78 (Bn, Bz), 123,66, 122,85 (C-5), 86,41, 86,23, 85,70, 85,24, 84,78, 83,73, 83,58, 82,79 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 75,32, 74,55, 73,61, 72,18, 71,98, 70,85, 70,59 (Bn, C-5', C-5''), 57,23, 57,04 (OCH₃), 1,78 (Si(CH₃)₃); MS FAB: 668 (M+H, 50%), 690 (M+Na, 100%). Hallado: C, 64,07; H, 6,01; N, 9,94; C₂₉H₃₈N₂O₇Si, 0,5H₂O requiere: C, 63,88; H, 6,25; N, 10,34%.

Ejemplo 113

(1R,2R,3R)-2-Benciloxi-3-benciloximetil-3-hidroxitetrahydrofurfural (206)

Una solución de 202/203 (252 mg, 0,707 mmol) en ácido acético al 80% (3,8 ml) se agitó a 90°C durante 2 h, después de lo cual se retiró el solvente mediante destilación bajo presión reducida. El residuo se co-evaporó en tolueno (3×10 ml) para rendir el producto 206 como un aceite (242 mg, 100%). ¹H RMN (CDCl₃): δ 9,66 (1H, d, J 0,8 Hz, H-1), 7,36-7,25 (10H, m, Bn), 4,68 (1H, d, J 11,9 Hz, Bn), 4,60-4,39 (5H, m, Bn, H-2, H-3), 3,98-3,92 (2H, m, H-5), 3,85 (1H, d, J 9,3 Hz, H-5'), 3,52 (1H, d, J 9,2 Hz, H-5''); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 203,64 (C-1), 137,39, 137,19, 128,61, 128,54, 128,29, 128,12, 127,87, 127,83 (Bn), 87,17, 87,05 (C-4, C-2), 80,98 (C-3), 75,00, 73,70, 71,86 30 (Bn, C-5'), 67,84 (C-5); MS FAB: 707 (2×M+Na, 100%).

Ejemplo 114

(1S,3S,4R,7S)-3-Acetoxi-7-benciloxi-1-benciloximetil-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]-heptano (207)

A una solución agitada de 206 (230 mg, 0,672 mmol) en piridina anhidra (2,0 ml) se le añadió anhídrido acético (0,18 ml, 1,91 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 23 h a temperatura ambiente, se añadió agua (0,13 ml), y se retiró el solvente mediante destilación bajo presión reducida. El residuo se co-evaporó en tolueno (3×10 ml) y se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano:metanol (99:1) como eluyente para rendir el producto 207 como un aceite claro (56,7 mg, 23%); ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,38-7,26 (10H, m, Bn), 6,00 (1H, s, H-1), 4,68 (1H, d, J 12,0 Hz, Bn), 4,62 (1H, d, J 12,2 Hz, Bn), 4,60 (1H, d, J 12,4 Hz, Bn), 4,56 (1H, d, J 12,2 Hz, Bn), 4,17 (1H, s, H-2), 4,14 (1H, s, H-3), 4,01 (1H, d, J 7,7 Hz, H-5'), 3,81-3,78 (3H, m, H-5', H-5), 20,06 (3H, s, COCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 169,18 (C=O), 137,92, 137,48, 128,52, 128,45, 128,03, 127,77, 127,73, 127,68 (Bn), 95,95 (C-1), 86,49 (C-4), 78,27, 76,58 (C-3, C-2), 73,65 (Bn), 72,26, 71,96 (Bn, C-5'), 65,49 (C-5), 20,98 (COCH₃); MS FAB: 407 (M+Na, 55%). Hallado: C, 68,80; H, 6,11; C₂₂H₂₄O₆ requiere: C, 68,74; H, 6,29%.

Ejemplo 115

(1S,3S,4R,7S)-3-(6-N-Benzoiladenin-9-il)-7-benciloxi-1-benciloximetil-2,5-dioxabi-ciclo[2.2.1]heptano (208)

A una solución de furanosa 207 (167 mg, 0,434 mmol) y 6-N-benzoiladenina (194 mg, 0,813 mmol) en acetonitrilo anhidro (5,3 ml) se le añadió BSA (0,43 ml, 1,76 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se enfrió la solución hasta 0°C y se añadió gota a gota trimetilsilil triflato (0,16 ml, 0,86 mmol). Después de agitar a 65°C durante 2 h, la reacción se detuvo con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (40 ml) y se reextrajo la mezcla con diclorometano (2×50 ml). El extracto combinado se secó (MgSO₄). Se retiró el solvente bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano:metanol (98:2) como eluyente para rendir el producto 208 como un sólido (111 mg, 45%); ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,82 (1H, s, H-8), 8,14 (1H, s, H-2), 7,59-7,26 (15H, m, Bz, Bn), 6,74 (1H, s, H-1'), 4,92 (1H, s, H-2'), 4,74-4,39 (4H, m, Bn), 4,42 (1H, s, H-3'), 4,19-4,10 (2H, m, H-5''), 3,92 (1H, d, J 11,8 Hz, H-5'), 3,88 (1H, d, J 11,5 Hz, H-5'); MS FAB: 564 (M+H, 100%).

Ejemplo 116

Metil 2-O-acetil-3,5-di-O-bencil-4-C-metanosulfoniloximetil-D-ribofuranosido (209)

A una solución agitada de 201 (687 mg, 1,52 mmol) en piridina anhidra (4 ml) a 0°C se le añadió gota a gota anhídrido acético (0,43 ml, 4,56 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 días a temperatura ambiente, se detuvo con 1 hidrógeno carbonato sódico acuoso saturado (75 ml) y se extrajo con diclorometano (150+75 ml). El extracto combinado se secó (MgSO₄), se retiró el solvente mediante destilación bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano como eluyente para rendir el producto 209 como un aceite claro (β:α ~ 3:1, 750 mg, 100%/); MS FAB: 463 (M-OCH₃, 100%), 517 (M+Na, 28%); Hallado: C, 58,53; H, 6,16; C₂₄H₃₀O₉S requiere: C, 58,29; H, 6,11%.

Metil 2-O-acetil-3,5-di-O-bencil-4-C-metanosulfoniloximetil-β-D-ribofuranosido (209β). ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,36-7,18 (10H, m, Bn), 5,27 (1H, d, J 4,9 Hz, H-2), 4,88 (1H, s, H-1), 4,55-4,44 (6H, m, H-5', Bn), 4,35 (1H, d, J 5,0 Hz, H-3), 3,73 (1H, d, J 9,2 Hz, H-5), 3,38 (1H, d, J 9,3 Hz, H-5), 3,30 (3H, s, OCH₃), 2,95 (3H, s, SO₂ CH₃), 2,11 (3H, s, OCCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 169,91 (C=O), 137,83, 137,28, 128,49, 128,44, 127,99, 127,87, 127,77 (Bn), 105,40 (C-1), 82,65, 81,05, 74,55, 73,62, 73,56, 71,86, 70,22 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-5', Bn), 55,03 (OCH₃), 37,14 (SO₂CH₃), 20,73 (OCCH₃).

Metil 2-O-acetil-3,5-di-O-bencil-4-C-metanosulfoniloximetil-α-D-ribofuranosido (209α). ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,36-7,18 (10H, m, Bn), 5,09 (1H, d, J 4,5 Hz, H-1), 4,95 (1H, dd, J 4,5, 6,8 Hz, H-2), 4,65-4,44 (6H, m, H-5',

ES 2 242 291 T3

Bn), 4,27 (1H, d, J 6,6 Hz, H-3), 3,49 (1H, d, J 9,9 Hz, H-5), 3,46 (3H, s, OCH₃), 3,36 (1H, d, J 9,9 Hz, H-5), 2,92 (3H, s, SO₂ CH₃), 2,14 (3H, s, OCCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 170,41 (C=O), 137,59, 137,28, 128,56, 128,51, 128,49, 128,44, 127,98, 127,88 (Bn), 102,35 (C-1), 84,25, 77,53, 74,66, 73,67, 72,12, 70,39, 70,28 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-5', Bn), 56,07 (OCH₃), 36,94 (SO₂CH₃), 20,63 (OCCH₃).

5

Ejemplo 117

Fenil-2-O-acetil-3,5-di-O-bencil-4-C-metanosulfoniloximetil-1-tio-β-D-ribofuranosido (210)

10 Procedimiento a

A una solución agitada de 209 (738 mg, 1,49 mmol) en diclorometano anhidro (6,4 ml) se le añadió feniltiotrimetilsilano (2,42 ml, 12,8 mmol) y se enfrió hasta 0°C. Se añadió gota a gota trimetilsilil triflato (0,67 ml, 3,67 mmol) y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 4 h. La reacción se detuvo con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (100 ml) y se extrajo con diclorometano (2×200 ml). El extracto combinado se secó (MgSO₄) y el solvente se retiró mediante destilación bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano como eluyente para rendir el producto 210 como un aceite claro (564 mg, 66%) y material de partida sin reaccionar (191 mg, 26%).

20 Procedimiento b

A una solución agitada de 211 (86 mg, 0,165 mmol) en diclorometano anhidro (0,49 ml) se le añadió feniltiotrimetilsilano (0,16 ml, 0,825 mmol) y se enfrió hasta 0°C. Se añadió trimetilsilil triflato (0,037 ml, 0,206 mmol) y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se detuvo con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (15 ml) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (2×25 ml). El extracto combinado se secó (MgSO₄) y el solvente se retiró mediante destilación bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano como eluyente para rendir el producto 210 como un aceite claro (75 mg, 79%); ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,47-7,19 (15H, m, Bn, SPh), 5,48 (1H, d, J 3,6 Hz, H-2), 5,34 (1H, dd, J 3,7, 5,2 Hz, H-1), 4,54-4,36 (7H, m, H-3, H-5', Bn), 3,66 (1H, d, J 9,7 Hz, H-5), 3,48 (1H, d, J 9,5 Hz, H-5), 2,89 (3H, s, SO₂ CH₃), 2,09 (3H, s, OCCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 169,93 (C=O), 137,69, 137,08, 132,65, 132,45, 129,15, 128,53, 128,52, 128,18, 128,14, 128,08, 127,91, 127,85 (Bn, SPh), 87,99, 84,35, 80,34, 75,33, 74,20, 73,67, 70,83, 69,34 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-5', Bn), 37,27 (SO₂ CH₃), 20,68 (OCCH₃); MS FAB: 463 (M-SPh, 100%), 595 (M+Na, 24%); Hallado: C, 61,17; H, 5,55; C₂₉H₃₂O₈S₂ requiere: C, 60,82; H, 5,63%.

35 Ejemplo 118

1,2-Di-O-acetil-3,5-di-O-bencil-4-C-metanosulfoniloximetil-D-ribofuranosa (211)

Una solución de 201 (150 mg, 0,313 mmol) en ácido acético acuoso al 80% (1,5 ml) se agitó a 90°C durante 3 h. Se retiró el solvente mediante destilación bajo presión reducida y se co-evaporó el residuo en etanol (3×5 ml), tolueno (3×5 ml) y piridina (2×5 ml). El residuo se redisolvió en piridina anhidra (0,62 ml) y se añadió anhídrido acético (0,47 ml), y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 16 h. La reacción se detuvo con agua (50 ml) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (2×50 ml). El extracto combinado se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (50 ml) y se secó (MgSO₄). El solvente se evaporó y el residuo se purificó con cromatografía en columna de gel de sílice con diclorometano como eluyente para rendir el producto 211 como un aceite (99 mg, 60%); ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,39-7,21 (m, Bn), 6,38 (d, J 4,6 Hz, H-1 β), 6,15 (s, H-1 α), 5,35 (d, J 4,9 Hz, H-2 α), 5,17 (dd, J 6,3, 4,9 Hz, H-2 β), 4,69-4,23 (m, H-3, Bn), 3,64 (d, J 9,7 Hz, H-5 α), 3,52 (d, J 10,1 Hz, H-2 β), 3,45 (d, J 9,7 Hz, H-5 α), 3,39 (d, J 9,9 Hz, H-2 β), 2,99 (s, SO₂ CH₃ α), 2,96 (s, SO₂ CH₃ β), 2,14, 2,13, 2,06, 1,90 (4xs, COCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 169,68, 169,00 (C=O), 137,68, 137,05, 128,60, 128,55, 128,50, 128,21, 128,12, 128,04, 127,94, 127,82, 127,79 (Bn), 99,35 (C-1 α), 94,24 (C-1 β), 86,36 (C-4 β), 84,28 (C-4 α), 79,15, 77,47, 74,58, 74,06, 73,73, 73,56, 71,67, 70,57, 70,19, 69,84 (Bn, C-2, C-3, C-5, C-5'), 37,61 (SO₂ CH₃ β), 37,48 (SO₂ CH₃ α), 21,07, 20,74, 20,63, 20,39 (COCH₃); MS FAB: 545 (M+Na, 13%). Hallado: C, 57,70; H, 5,56; C₂₅H₃₀O₁₀S requiere: C, 57,46; H, 5,79%.

55 Ejemplo 119

(3R)- y (3S)-(1S,4R,7S)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-feniltio-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (212)

Una solución de 210 (553 mg, 0,966 mmol) en metanol saturado con amoníaco (35 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, después de lo cual el solvente se retiró mediante destilación bajo presión reducida. El residuo se redisolvió en DMF anhidro (3,5 ml) y la solución se agitó a 0°C. Se añadió una suspensión al 60% de hidruro sódico (118 mg, 2,88 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se detuvo con una solución saturada de hidrógeno carbonato sódico (100 ml) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (2×100 ml). El extracto combinado se secó (MgSO₄) y se retiró el solvente mediante destilación bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con diclorometano como eluyente para rendir el producto 212 como un aceite claro (404 mg, 96%). MS FAB: 435 (M+H, 35%), 457 (M+Na, 16%); Hallado: C, 71,76; H, 6,18; C₂₆H₂₆O₄S requiere: C, 71,86; H, 6,03%.

ES 2 242 291 T3

(*1S,3R,4R,7S*)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-feniltio-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (212 β). ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,46-7,26 (15H, m, Bn, SPh), 5,35 (1H, s, H-1), 4,68-4,56 (4H, m, Bn), 4,31 (1H, s, H-2), 4,10 (1H, s, H-3), 4,09 (1H, d, J 7,3 Hz, H-5'), 3,93 (1H, d, J 7,8 Hz, H-5''), 3,79 (2H, m, H-5); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 138,03, 137,45, 133,42, 132,36, 129,19, 128,55, 128,46, 128,05, 127,84, 127,83, 127,76 (Bn, SPh), 89,96 (C-1), 87,18 (C-4), 79,71 (C-2), 79,40 (C-3), 73,64 (Bn), 73,23 (C-5'), 72,30 (Bn), 66,31 (C-5).

(*1S,3S,4R,7S*)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-feniltio-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (212 α). ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,52-7,19 (15H, m, Bn, SPh), 5,52 (1H, s, H-1), 4,70-4,50 (4H, m, Bn), 4,41 (1H, s, H-2), 4,18 (1H, d, J 7,8 Hz, H-5'), 4,08 (1H, d, J 8,4 Hz, H-5''), 4,07 (1H, s, H-3), 3,78 (1H, d, J 11,3 Hz, H-5), 3,72 (1H, d, J 11,5 Hz, H-5); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 137,89, 137,46, 135,29, 130,93, 129,13, 128,99, 128,57, 128,48, 127,81, 127,76, 127,58, 126,95 (Bn, SPh), 91,87 (C-1), 88,59 (C-4), 80,07, 79,14 (C-2, C-3), 73,65, 73,40, 72,04 (Bn, C-5'), 65,62 (C-5).

Ejemplo 120

(*3R*)- y (*3S*)-(1*S,4R,7S*)-7-Benciloxi-1-benciloximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (36+213)

Se agitó timina (175 mg, 1,38 mmol) en hexametildisilazano (6,8 ml) con reflujo y se añadió sulfato amónico (5 mg). Después de agitar durante 16 h, se enfrió la solución clara hasta 40°C y se retiró el solvente mediante destilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadió una solución de 212 (201 mg, 0,463 mmol) en diclorometano anhidro (4,6 ml) y tamicos moleculares de 4. ANG. (180 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 min, se añadió NBS (107 mg, 0,602 mmol) y la mezcla se agitó durante otros 30 min. La reacción se detuvo con una solución saturada de tiosulfato sódico (25 ml) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (2x50 ml). El extracto combinado se secó (MgSO₄) y evaporó, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con diclorometano:metanol (97:3) como eluyente para rendir el producto 36+213 y como una mezcla anomérica (β : α ~ 1:2) (127 mg, 61%); ¹H NMR (CDCl₃): δ 7,49 (d, J 0,9 Hz, H-6 β), 7,46 (d, J 1,0 Hz, H-6 α), 7,39-7,25 (m, Bn), 5,94 (s, H-1' α), 5,64 (s, H-1' β), 4,71-4,50 (m, Bn, H-2'), 4,23 (s, H-3' α), 4,16 (d, J 8,6 Hz, H-5'' α), 4,09-3,78 (m, H-5', H-5'', H-3' β), 1,94 (d, J 0,9 Hz, CH₃ α), 1,62 (d, J 1,2 Hz, CH₃ β); MS FAB: 551 (M+H, 96%).

Ejemplo 121

(*3R*)- y (*3S*)-(7*S,4R,7S*)-7-Hidroxi-1-hidroxiimetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (37+214)

Una solución de 36+213 (175 mg, 0,39 mmol) en etanol (2,7 ml) se agitó a temperatura ambiente y se añadió hidróxido de paladio al 20% sobre carbón (50 mg). La mezcla se desgasó varias veces con argón y se colocó en una atmósfera de hidrógeno. Después de agitar durante 18 h, la mezcla se purificó con cromatografía en columna sobre gel de sílice con diclorometano:metanol (95:5) como eluyente para rendir una mezcla de 37 y 214 (1:1,2) (26 mg, 25%); ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,78 (d, J 1,3 Hz, H-6 α), 7,73 (d, J 1,2 Hz, H-6 β), 5,88 (s, H-1' α), 5,53 (s, H-1' β), 4,38 (s, H-2' α), 4,34 (s, H-3' α), 4,26 (s, H-2' β), 4,08-3,69 (m, H-5', H-5'', H-3' β), 1,92 (d, J 1,2 Hz, CH₃ α), 1,88 (d, J 1,1 Hz, CH₃ β); ¹³C RMN (CD₃OD): δ 138,00 (C-6 α), 136,96 (C-6 β), 110,80 (C-5 β), 110,08 (C-5 α), 92,49, 89,01 (C-4', C-1' α), 90,46, 88,37 (C-4', C-1' β), 80,89, 74,27, 73,34 (C-2', C-3', C-5' α), 80,59, 72,47, 70,39 (C-2', C-3', C-5' β), 59,29 (C-5'' α), 57,61 (C-5'' β), 12,52 (CH₃ α), 12,39 (CH₃ β); MS EI: 270 (M⁺, 100%).

Preparation of LNA Fosforamiditos

Ejemplo 122

4-N-Benzoil-LNA-C [(1*R,3R,4R,7S*)-3-(4-N-benzoilcitosina-1-il)-1-(hidroximetil)-7-hidroxi-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano

Se tomó LNA-C (fórmula Z) en etanol absoluto y se calentó bajo reflujo. A la solución refluendo, se le añadió anhídrido benzoico (2 equivalentes) y la reacción se siguió mediante HPLC (Eluyente: 20% de acetonitrilo en 0,1M TEAA, pH 7,0, velocidad de flujo: 1 ml/min., columna analítica Novapak C-18). Se añadió anhídrido adicional a intervalos de 0,5-2 h hasta que no se observó más incremento en el producto mediante HPLC. La mezcla de reacción se concentró en un rotavapor. El residuo se lavó repetidamente con éter, se filtró y secó para rendir un sólido blanco. Rendimiento: 45%.

Procedimiento general para la dimetoxitritilación de nucleósidos LNA con la base protegida (LNA-C^{Bz}, LNA-T, LNA-G^{IBu}, LNA-A^{Bz})

El nucleósido de LNA con la base protegida se co-evaporó con piridina (2x) y se agitó con cloruro de dimetoxitritilo (1,5 equivalentes) en piridina (-10 ml/g de nucleósido). La reacción se siguió mediante HPLC (50% de acetonitrilo en 0,1M TEAA, pH 7,0, durante 5 min., 50-100% acetonitrilo en 10 min. y 100% acetonitrilo durante 5 min., velocidad de flujo: 1 ml/min., columna Novapak C-18). Cuando >95% del material de partida había reaccionado, se enfrió la mezcla de reacción en hielo. La reacción se detuvo mediante la adición de NaHCO₃ frío saturado (~15 mlxvol. de piridina). Se reextrajo la mezcla con diclorometano (3x mitad del vol. de bicarbonato sódico). Se combinaron las extracciones orgánicas, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y concentraron en un rotavapor. El residuo se secó con vacío y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando 0,5% de piridina y 0-2% de metanol

ES 2 242 291 T3

en diclorometano como eluyente. Las fracciones que contenían productos puros se combinaron y concentraron en un rotavapor. El residuo se co-evaporó con acetonitrilo anhidro (3×) y se secó con vacío.

Procedimiento general para la fosfitilación de nucleósidos LNA protegidos

5 El nucleósido dimetoxitritil-LNA con la base protegida se co-evaporó con diclorometano anhidro (2×) y se disolvió en diclorometano anhidro (10 ml/g de nucleósido para A,G y T, y ~30 ml/g for C). A esto se le añadió bis(diisopropilamino)(2-cianoetil)fosfito (1,05-1,10 equivalentes), seguidos por tetrazolio (0,95 equivalentes). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se siguió la reacción mediante HPLC (70% de acetonitrilo en 0,1M TEAA, pH 7, 2 min., 10 70-100% de acetonitrilo en 8 min., y 100% acetonitrilo en 5 min., velocidad de flujo: 1 ml/min., columna Novapak C-18). Una vez la reacción había progresado hasta >90% y no se observó más incremento en la formación de amidito a partir de la agitación adicional, se enfrió la mezcla en hielo. Se diluyó con diclorometano (~15-20 veces el volumen original) y se lavó con bicarbonato sódico saturado frío (2×) seguido por salmuera fría (1×). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró en un rotavapor. El residuo se co-evaporó con acetonitrilo anhidro 15 (3×) y se secó con vacío durante la noche. La pureza mediante HPLC oscilo entre 93-98%.

Preparation de nucleósidos LNA 5'-trifosfatos

Ejemplo 123

Síntesis de nucleósidos LNA 5'-trifosfatos

(*Tetrahedron Letters* 29:4525 1988). En un tubo de polipropileno de 13×100 mm, se suspendieron los nucleósidos 37, 44, 51, 4-N-benzoilado 57A o 61B (93,8 pmol) en 1 ml de piridina (secada con CaH₂). La solución se evaporó en un SpeedVac, bajo vacío elevado, hasta la sequedad. El residuo se resuspendió dos veces en acetonitrilo (secado con CaH₂) y se evaporó hasta la sequedad. El nucleósido se suspendió en 313 μL de trimetilfosfato (secado con tamices moleculares de 4. ANG.), al cual se añadieron 30,1 mg de Proton SpongeTM (1,5 equivalentes). La mezcla se selló, se agitó, y se enfrió hasta 0°C. Se añadió POCl₃ (9,8 μL, 1,1 equivalentes) con agitación. La reacción se dejó progresar a 0°C durante 2,5 horas. Durante este intervalo, se disolvieron 469 μmols de pirofosfato sódico (5 equivalentes) en 30 5 ml de agua y se pasaron a través de 5 ml de una resina de intercambio fónico Dow 50 H⁺. Cuando el eluyente se volvió ácido, se recolectó en 220 μL de tributilamina y se evaporó hasta obtener un jarabe. El pirofosfato de TBA se co-evaporó tres veces con acetonitrilo seco. Finalmente, el pirofosfato seco se disolvió en 1,3 ml de DMF (tamices de 4. ANG.). Transcurridas 2,5 horas de tiempo de reacción, se añadieron el pirofosfato de TBA y 130 μl de tributilamina a la solución de nucleósido con agitación enérgica. Transcurrido 1 minuto, se detuvo la reacción añadiendo 3 ml de acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,5. El ensayo mediante cromatografía en Mono-Q mostró un 49% de nucleósido 35 5'-trifosfato. La mezcla de reacción se diluyó hasta 100 ml con agua y se adsorbió sobre una columna Q Sepharose de intercambio fónico, se lavó con agua, y se eluyó con un gradiente lineal desde 0 a 700 mM NaCl en fosfato sódico 5 mM, pH 7,5. Las fracciones que contenían trifosfato se ensayaron mediante cromatografía de intercambio iónico con Mono-Q. Las fracciones que contenían trifosfato se juntaron y concentraron hasta el punto de saturación del NaCl. El producto se desaló en un cartucho C₁₈. El trifosfato se cuantificó mediante espectroscopia de UV y se ajustó a una 40 solución 10 mM. rendimientos fueron 17-44%. Los nucleósidos LNA preparados mediante este procedimiento fueron, U, T, A, G, y C.

Preparación de oligonucleótidos modificados con LNA

Ejemplo 124

Síntesis de oligonucleótidos que contienen LNA con la fórmula V, X, Y y Z^T, Z^U, Z^G, Z^C, Z^A, Z^{Mec}

50 Los análogos 3'-O-fosforamidito de nucleósido bicíclicos 8, 19, 30, 39, 46, 53, 57D, 61D, y 66 así como 3'-O-fosforamiditos comerciales se usaron para sintetizar oligonucleótidos de LNA de ejemplo de la invención (escala de 0,2 a 5 μmol) conteniendo uno o más de los LNA de los tipos V, X, Y y Z^T, Z^U, Z^G, Z^C, Z^A, y Z^{Mec}. La pureza y composición de los oligonucleótidos de LNA se verificó mediante electroforesis en gel capilar, y/o HPLC, y/o MALDI-MS. En general, se obtuvieron eficiencias de acoplamiento satisfactorias para todos los monómeros. Las 55 mejores eficiencias de acoplamiento (~95-100%) se obtuvieron con los LNA 39, 46, 53, 57D, 61D y 66 (conducen a monómeros LNA con la fórmula Z) dando resultados muy satisfactorios cuando se sintetizaban oligonucleótidos de LNA completamente modificados, o cuando se incorporaban LNA en hebras de ADN o ARN no modificadas de otro modo, o LAN en oligonucleótidos completamente fosforotioatos. Los oligonucleótidos de LNA se disolvieron en agua pura y la concentración se determinó como OD₂₆₀. Las solubilidades fueron excelentes en todos los casos. 60 Para la síntesis sencilla de ADN/ARN y de oligómeros parcialmente modificados, se usó un soporte CPG estándar o un soporte de poliestireno. Para la síntesis de oligómeros de LNA completamente modificados (por ejemplo 5'-d(GTGATATGC)-3'), se usó un soporte BioGenex Universal CPG (BioGenex, U.S.A.), o se usaron soportes derivados con LNA.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 125

Síntesis de oligonucleótidos de fosforotioato LNA

- 5 El “todo” fosforotioato LNA (Tabla 7) se sintetizó en un sintetizador de ADN automatizado usando condiciones similares a las descritas anteriormente (Ejemplo 124). Se usó el reactivo de Beaucages como agente sulfurizante. Los rendimientos del acoplamiento paso a paso fueron >98%. Después de completar la síntesis, se efectuó el desprotección y separación del soporte sólido usando amoníaco concentrado (55°C, 14 h).

10 Ejemplo 126

Síntesis de oligonucleótidos de 2'-Tio-LNA

- 15 Los oligonucleótidos de 2'-tio-LNA (conteniendo el monómero U^s (fórmula Z (variante tio) de la Figura 2), Figura 37, Tabla 8) se sintetizaron en un sintetizador de ADN automatizado usando condiciones estándar (Ejemplo 124). El rendimiento del acoplamiento paso a paso para el amidito 76F fue aproximadamente del 85% (12 min de acoplamiento; se espera que la pureza mejorada del amidito 76F resulte en un rendimiento del acoplamiento incrementado). Después de completar la síntesis, la desprotección y la separación del soporte sólido se efectuó usando amoníaco concentrado (55°C, 8 h).

20 Ejemplo 127

Síntesis de oligonucleótidos de 2'-Amino-LNA

- 25 Mediante procedimientos similares a los descritos en el Ejemplo 126, se obtuvieron eficientemente oligonucleótidos de 2'-Amino-LNA (conteniendo el monómero T^{NH} y monómero T^{NMe} (fórmula Z (variantes amino) de la Figura 2), Figuras 35 y 36) en un sintetizador de ADN automatizado usando los amiditos 74A y 74F (rendimientos del acoplamiento paso a paso >98%).

30 Ejemplo 128

Marcaje con fluoresceína de los oligómeros de LNA

- 35 Los oligómeros de LNA (fórmula Z de la Figura 2) AL16 (5'-d(**TGTGTGAAATTGTTAT**)-3'; los nucleótidos LNA están en negrita) y AL17 (5'-d(**ATAAAGTGTAAG**)-3'; los nucleótidos LNA están en negrita) se marcaron exitosamente con fluoresceína usando el FluoroAmp T4 Kinase Green Oligonucleotide Labeling System tal como describe el fabricante (Promega). En resumen, 16 nmoles de cada LNA-oligómero AL16 o AL17 se marcó en 5'-tiofosfato en 50 μ l de tampón de reacción que contenía la quinasa T4 y γ -S-ATP. Las reacciones se incubaron durante 2 h a 37°C. Los oligos de LNA tio-fosforilados se precipitaron mediante la adición de 5 μ l de precipitante de oligonucleótido (Promega) y 165 μ l de etanol al 95% enfriado en hielo (-20°C). Después de la centrifugación se lavaron los precipitado con 500 μ l de etanol al 70% enfriado en hielo (-20°C) y se redisolviéron en 25 μ l de tampón PBSE. Se añadió una solución recién preparada de 5-maleimida-fluoresceína (50 μ g en 5 μ l DMSO) a los oligos de LNA tiofosforilados, y la mezcla de reacción se incubó a 68°C durante 30 min. Se añadió 5-maleimida-fluoresceína adicional (50 μ g en 5 μ l DMSO) a cada oligo de LNA y la mezcla de reacción se incubó durante 60 minutos adicionales. Después de la incubación, se añadieron 10 μ l de precipitante de oligonucleótidos a cada mezcla de reacción, seguidos por 180 μ l de [...] enfriado en hielo (-20°C) y 100 μ l de N,N-dimetilformamida. Los oligos de LNA marcados con fluoresceína se aislaron mediante centrifugación seguida por aspiración del sobrenadante. Los oligómeros de LNA marcados con fluoresceína se purificaron mediante HPLC en fase reversa como sigue: columna Delta-Pack C-18, 300A, 0,4x30 cm; eluyente 0-50% acetonitrilo en tampón trietilamonio 0,04 M (pH 7,0); velocidad de flujo 1,5 ml/min. Las fracciones que contenían LNA-oligos se juntaron y se evaporaron bajo presión reducida (bomba de aceite y sistema SpeedVac) durante 12 h.

Datos de hibridación

55 Ejemplo 129

Termoestabilidad de los oligonucleótidos que contienen monómeros con la fórmula V, X, Y y Z^T, Z^U, Z^G, Z^C, Z^A, Z^{MeC}

- 60 La termoestabilidad de los oligonucleótidos modificados con LNA se determinó espectrofotométricamente usando un espectrofotómetro equipado con un elemento termoregulado Peltier. Se prepararon mezclas de hibridación de 1 ml que contenían cualquier de 3 tampones diferentes (10 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA; 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 0,1 mM EDTA; 3M cloruro de tetrametilamonio (TMAC), 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 0,1 mM EDTA) y cantidades equimolares (1 μ M o 1,5 μ M) de los diferentes oligonucleótidos modificados con LNA y sus oligonucleótidos de ADN o ARN complementarios o desemparejados. Se prepararon mezclas de hibridación usando los oligonucleótidos no modificados como referencias. Las T_m se obtuvieron como la primera derivada de las curvas de fusión. Las Tablas 1-4 resumen los resultados (los LNA están marcados en negrita). La Figura 2 ilustra los LNA monoméricos usados. La nomenclatura V, X, Y y Z^T, Z^U, Z^G, Z^C, Z^A, Z^{MeC} se refiere a las estructuras V, X, Y y Z de la Figura 2. En las tablas, se indican las nucleobases de los monómeros de LNA. Además, para las variantes tio y amino

de la estructura Z de LNA de las dos últimas tablas, la nomenclatura usada es, por ejemplo, respectivamente Z^TS y Z^TNH.

Los LNA que contenían estructura Z fueron examinados particularmente a conciencia (ver Tabla 1). Cuando se incorporaron tres residuos Z^T a un oligonucleótido de secuencia mixta, las T_m obtenidas en tampón NaCl con ambos oligonucleótidos complementarios de ADN (10) y ARN (16) fueron sustancialmente superiores (ARN: aproximadamente 7°C y ADN: aproximadamente 5°C por modificación) que la T_m de los correspondientes duplexes con oligonucleótidos no modificados (1 y 8). Se obtuvieron resultados similares con LNA que contenían dos residuos Z^T y uno de los residuos Z^G (21 y 24B) o Z^U (25), Z^C (69), Z^{Mec} (65), y Z^A (58). Cuando se introdujeron desemparejamientos en los oligonucleótidos diana de ADN o ARN, la T_m de los oligonucleótidos modificados con LNA en todos los casos disminuyó significativamente (11-15A y 17; 18-20 y 22-24A; 26-31; 57 y 59-60; 63-64 y 66, y 67), demostrando de forma no ambigua que los oligonucleótidos modificados con LNA se hibridan con sus secuencias diana obedeciendo la reglas de enlaces de hidrógeno de Watson-Crick. En todos los casos, la disminución en la T_m de los oligonucleótidos modificados con LNA a partir de la introducción de desemparejamientos fue igual o superior a la de los correspondientes oligonucleótidos no modificados (2-7 y 9; 33-38), mostrando que los oligonucleótidos modificados con LNA son al menos tan específicos como sus contrapartidas naturales. Una disminución de la fuerza iónica del tampón de hibridación (desde 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA hasta 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 0,1 mM EDTA) disminuye la T_m de los oligonucleótidos modificados con LNA por sus oligos de ADN (40, 41) u oligonucleótidos de RNA (40A, 41A) complementarios. Un efecto similar se observó con los oligonucleótidos sin modificar y sus oligos de ADN (39) u oligos de ARN (39A) complementarios.

La adición de cloruro de tetrametilamonio 3 M (TMAC) al tampón de hibridación incrementa significativamente la T_m de los oligonucleótidos modificados con LNA por sus oligos de ADN complementarios (10, 21, 25). Más aún, el TMAC igual las diferencias en las T_m de los diferentes oligonucleótidos que se observan en el tampón NaCl (T_m más baja en el tampón NaCl a 44°C y la más elevada a 49°C, en oposición a 56°C y 57°C en TMAC). La introducción de desemparejamientos disminuye sustancialmente la T_m de los oligonucleótidos modificados con LNA por sus dianas de ADN (11-13, 18-20, y 26-28). Una gráfica similar surge con los oligonucleótidos de referencia no modificados (1-4 y 32-35).

Los datos con el tampón con poca sal muestran que los oligonucleótidos modificados con LNA presentan una sensibilidad a la fuerza fónica del tampón de hibridación similar a la de los oligonucleótidos normales. A partir de los datos de T_m con el tampón TMAC, inferimos que el TMAC exhibe un efecto igualador de la T_m sobre los oligonucleótidos modificados con LNA similar al efecto observado con oligonucleótidos de ADN normales. Los oligonucleótidos modificados con LNA retienen su exquisita especificidad en ambos tampones de hibridación.

Los oligonucleótidos de LNA completamente modificado conteniendo la totalidad de los cuatro monómeros (71 y 75), el oligonucleótido de LNA casi completamente modificado (excepto por un nucleósido de ADN 3'-terminal) conteniendo ambos Z^G y Z^T (41 y 41A), y el oligonucleótido parcialmente modificado conteniendo un bloque central de Z^T y Z^G (40 y 40A) también presentaron una afinidad sustancialmente incrementada en comparación con el oligonucleótido de control no modificado (39 y 39A; 1 y 8). Esto muestra que los LNA con la fórmula Z son muy útiles en la producción de ambos, oligómeros completa y parcialmente modificados. Destacamos que el oligómero casi completamente modificado (41 y 41A) exhibe una elevada afinidad sin precedentes por ambos, el ARN (>93°C) y ADN (83°C) complementarios. Una similar afinidad extrema (por ambos, el ARN y ADN) se observó con el oligómero de LNA casi completamente modificado que contenía exclusivamente Z^T (Tabla 1: 52 y 53) y el oligómero de LNA completamente modificado (71 y 75). La afinidad del oligonucleótido poli-T parcialmente modificado depende de las posiciones y el número de monómeros Z^T incorporados (44-51). Mientras que las T_m con ARN diana (45, 47, 49 y 51) en todos los casos fueron más elevadas que con los correspondientes oligonucleótidos no modificados (43), uno dio una T_m inferior con el ADN diana (46). Puesto que los oligonucleótidos de secuencia mixta que contienen 3 residuos Z^T exhiben una afinidad sustancialmente incrementada por sus dianas de ADN (10) y ARN (16) en comparación con los oligonucleótidos de referencia no modificados (1 y 8), esto sugiere que otros motivos unidores distintos de los Watson-Crick (tales como, por ejemplo, el motivo unidos de Hoogsteen) están abiertos para los oligonucleótidos poli-T, y que estos motivos unidores son algo sensibles a la arquitectura exacta del oligonucleótido modificado. En todos los casos, la introducción de un único desemparejamiento de base en el complejo entre el oligonucleótido poli-T completamente modificado con Z^T y un ADN diana (54-56) resultó en una caída significativa en la T_m.

Los oligonucleótidos que contenían bien LNA con estructuras V (Tabla 2, X (Tabla 3) e Y (Tabla 4) se analizaron en el contexto de secuencias poli-T completa o parcialmente modificadas. Los oligonucleótidos completamente modificados de las estructuras V e Y exhibieron un incremento en la T_m (aunque mucho menor que en los oligonucleótidos modificados con ZT) con ambas dianas, de ARN (Tabla 2, 14 y Tabla 4, 14) y de ADN (Tabla 2, 13, y Tabla 4, 13) en comparación con los oligonucleótidos no modificados (Tabla 1, 42 y 43). Los oligonucleótidos parcialmente modificado conteniendo monómeros con la estructura V e Y se comportaron similarmente a los oligonucleótidos parcialmente modificados conteniendo Z^T y, probablemente, esto se debe a la naturaleza homopolimérica de las secuencia, tal como se esbozó más arriba. Los oligonucleótidos conteniendo X^T en todos los casos presentaron un T_m mucho más reducida en comparación con los oligonucleótidos de ADN de referencia.

Ejemplo 130

Un oligonucleótido de LNA completamente modificado forma híbridos estables con ADN complementario tanto en la orientación anti-paralela como en la orientación paralela

5

Se hibridó un oligonucleótido de LNA completamente modificado con su ADN complementario tanto en la orientación anti-paralelo como en la paralela. Las soluciones de hibridación (1 ml) contenían Na_2HPO_4 10 mM (pH 7), NaCl 100 mM y EDTA 0,1 mM y 1 μM de cada uno de los dos oligonucleótidos. Tal como se muestra en la Tabla 1, ambas orientaciones de unión, la antiparalela (71) y la paralela (77) producen duplexes estables. La antiparalela es claramente la más estable de las dos. Sin embargo, incluso el dúplex en paralelo es significativamente más estable que el correspondiente dúplex antiparalelo de los oligonucleótidos no modificados (Tabla 1, 1).

Ejemplo 131

15 *Los monómeros de LNA pueden usarse para incrementar la afinidad de los oligómeros de ARN por sus ácidos nucleicos complementario*

La termoestabilidad de los complejos entre un oligonucleótido de ARN 9-mero que contiene 3 monómeros de LNA-T (Z^T) y los oligonucleótidos complementarios de ADN o ARN se midió espectrofotométricamente. Las soluciones de hibridación (1 ml) contenían Na_2HPO_4 10 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM y 1 μM de cada uno de los dos oligonucleótidos. Como referencia se midieron mezclas de hibridación idénticas usando los oligonucleótidos de ARN no modificados. Tal como se muestra en la Tabla 5 el oligonucleótido de ARN modificado con LNA se hibrida con ambos de sus oligonucleótidos de ADN (1) y ARN (3) complementarios. Tal como se observó previamente para los oligonucleótidos de ADN modificados con LNA, la afinidad de unión del oligonucleótido de ARN modificado con LNA es la más intensa por el ARN complementario (3). En ambos casos, la afinidad del oligonucleótido de ARN modificado con LNA es sustancialmente superior a la de los controles no modificados (2 y 4). La Tabla 6 muestra también que la especificidad hacia ambas, las dianas de ARN y ADN se retiene en los oligonucleótidos de ARN modificados con LNA.

30 Ejemplo 132

Pares de bases LNA-LNA

Se hibridaron oligonucleótidos de ARN o ADN que contenían tres monómeros de LNA Z^T o un oligonucleótido compuesto totalmente por monómero LNA Z a oligonucleótidos de ADN no modificados o oligonucleótidos de ADN que contenían tres monómeros de LNA Z^T y se midió la T_m de los híbridos espectrofotométricamente. Las soluciones de hibridación (1 ml) contenían Na_2HPO_4 10 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM y 1 μM de cada uno de los dos oligonucleótidos. Tal como se muestra en la Tabla 6, todos los oligonucleótidos modificados con LNA se hibridan a sus oligonucleótidos de ADN no modificados complementarios (2 y 3) así como a los oligonucleótidos modificados con LNA complementarios (4, 5 y 6). Tal como se observó previamente, la presencia de los monómeros de LNA en una hebra de un híbrido (2 y 3) incrementa la T_m significativamente en comparación con el híbrido control no modificado (1). La presencia de pares de bases LNA-LNA en el híbrido incrementa la T_m aún más (4 y 5). Más aún, puede formarse un híbrido estable entre un oligonucleótido de LNA completamente modificado y un oligonucleótido de ADN parcialmente modificado con LNA- Z^A (6). Este constituye el primer ejemplo de pares de bases LNA-LNA en un híbrido.

Ejemplo 133

50 *Un oligonucleótido de LNA todo fosforomonotioato muestra una termoestabilidad relativamente menos disminuida hacia los ADN y ARN complementarios que el correspondiente oligonucleótido de ADN todo fosforotioato*

La termoestabilidad de un oligonucleótido de ADN todo fosforomonotioato conteniendo tres monómeros de LNA Z^T (oligonucleótido de LNA), y el correspondiente oligonucleótido de ADN todo-fosforomonotioato de referencia, hacia ADN y ARN complementarios se evaluó en las mismas condiciones descritas en el Ejemplo 132, sin embargo, sin EDTA (Tabla 7). Se observó que el oligonucleótido de LNA todo-fosforomonotioato que contenía tres monómeros de LNA Z^T mostraba una termoestabilidad sólo débilmente disminuida (Tabla 7, 3 y 4) cuando se compara con el correspondiente oligonucleótido de LNA de referencia (Tabla 1, 10 y 16). El correspondiente oligonucleótido de ADN todo-fosforomonotioato (Tabla 7, 1 y 2) mostró una termoestabilidad significativamente disminuida cuando se comparó con el correspondiente oligonucleótido de ADN de referencia (Tabla 1, 1 y 8). Esto tiene posibles implicaciones importantes en el uso de oligonucleótidos de LNA total o parcialmente fosforomonotioato en las aplicaciones terapéuticas antisentido y otras. Por tanto, se ha demostrado la compatibilidad de los monómeros de LNA y los monómeros no modificados en un oligonucleótido de fosforomonotioato. Puede anticiparse que tales construcciones presentarán ambas, actividad RNAasaH y resistencia a la nucleasa, además de las características de hibridación mejoradas.

65

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 134

Los 2'-Tio-LNA muestran propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos comparables a las del LNA (Monómero Z)

5 Las condiciones de hibridación fueron como se describieron en el Ejemplo 132, sin embargo sin EDTA. Los resultados para los 2'-tio-LNAs (Tabla 8) indican claramente un efecto positivo sobre la estabilidad térmica de los duplexes hacia ambos, el ADN y ARN, mediante la introducción de monómeros 2'-tio-LNA U^s (Los monómeros corresponden a la fórmula Z de la Figura 2, en donde el puente metilenoxi se ha sustituido con un puente metilenotio). Este efecto ($\Delta T_m \sim +5^\circ\text{C}$ /modificación hacia el ADN; $\Delta T_m \sim +8^\circ\text{C}$ /modificación hacia el ARN) es comparable con el observado para los LNA progenitores. La situación se complica por la introducción simultánea de dos modificaciones (la funcionalidad 2'-tio y el uracilo en vez de la timina). Sin embargo, la comparación es relevante, puesto que antes hemos observado temperaturas de fusión idénticas para los monómeros de timina y uracilo de LNA, y puesto que las referencias contienen 2'-desoxiuridina en vez de timidina, si se esperase algo, se esperaría observar valores de T_m inferiores.

Ejemplo 135

20 *Los 2'-Amino-LNA (Monómero Z^{NH}) y 2'-Metilamino-LNA (Monómero Z^{NMe}) presentan propiedades de reconocimiento de ácido nucleico comparables a las del LNA progenitor (Monómero Z)*

25 Las condiciones de hibridación fueron como se describieron en el Ejemplo 132, sin embargo sin EDTA. Los resultados de fusión para los 2'-amino-LNAs (Tabla 9) indican claramente un efecto positivo sobre la estabilidad térmica de los duplexes hacia el ADN y ARN mediante la introducción de cualquiera de los monómeros 2'-amino-LNA T^{NH} o T^{NMe} (Los monómeros corresponden a la fórmula Z de la Figura 2, en donde el puente metilenoxi se ha sustituido respectivamente con un puente metilnamino o con un puente metilen-(N-metil)amino). Este efecto ($\Delta T_m \sim +3^\circ\text{C}$ /modificación hacia el ADN; $\Delta T_m \sim +6$ a $+8^\circ\text{C}$ /modificación hacia el ARN) es comparable con el observado para los LNA progenitores. Es digno de mención, que la afinidad térmica incrementada se observa también con un oligo compuesto por una mezcla de monómeros 2'-alquilamino-LNA y monómeros 2'-amino-LNA no alquilados.

Ejemplo 136

Estabilidad 3'-exonucleolítica de los oligómeros 5'-V^T₁₃T y 5'-Z^T₁₃T

35 Se digirió una solución de oligonucleótidos (0,2 OD) en 2 ml del siguiente tampón (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,6, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 14 mM) a 25°C con 1,2 U SVPDE (fosfodiesterasa de veneno de serpiente). Durante la digestión, se siguió el incremento en absorbancia a 260 nm. Mientras que el T₁₄ control no modificado estaba completamente degradado después de 10 minutos de degradación, los 5'-Z^T₁₃T y 5'-V^T₁₃T permanecieron intactos durante 60 minutos.

Ejemplo 137

Oligos modificados con LNA como sustratos de la quinasa de polinucleótido T4

45 Se mezclaron 20 pmoles de cada cebador (FP2: 5'-GGTGGTTTGGTTTG-3'; sonda de ADN), (AL2: 5'-GGTGGT **TTGTTTG**-3', los nucleósidos de LNA están en negrita) y (AL3: 5'-GGTGGTTTGGTTTG-3', los nucleósidos de LNA están en negrita) con la quinasa de polinucleótidos de T4 (5 Unidades; New England Biolabs) y 6 μl γ -³²P ATP (3000 Ci/mmol, Amersham) en un tampón que contenían Tris-HCl 70 mM (pH 7,6), MgCl₂ 10 mM, ditiotretiol 5 mM (volumen final de 20 μl). Las muestras se incubaron 40 minutos a 37°C y después se calentaron hasta 65°C durante 5 min. A cada una de las reacciones se les añadieron 2 μl de ARNt (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 29 μl de acetato amónico 3 M y 100 μl de etanol. Las reacciones se incubaron a -20°C durante 30 min, y los oligos marcados se precipitaron mediante centrifugación a 15.000 g durante 30 minutos. Se resuspendió el precipitado en 20 μl de H₂O. La muestras (1 μl) se mezclaron con un tampón de carga (formamida (pH 8,0), xileno cianol FF 0,1%, azul de bromofenol 0,1% y EDTA 10 mM) y se electroforaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (solución al 16% de acrilamida/bisacrilamida, urea 7 M, 1 \times TBE y EDTA 0,1 mM) en un tampón de carrera TBE (Tris-HCl 90 mM (pH 8,3), ácido bórico 90 mM y EDTA disodio-2H₂O 2,5 mM). Se secó el gel en un secador de geles (BioRad modelo 583) y se autoradiografió en una película para rayos X (película CL-XPosure, Pierce 34075) durante 20 min. El resultado se muestra en la Figura 6 (FP2: carriles 1 y 2; AL2: carriles 3 y 4; AL3: carriles 5 y 6). En base a este experimento se pueden extraer tres conclusiones. En primer lugar, se puede concluir que los oligos de LNA parcial y totalmente modificados son imitadores excelentes de los ácidos nucleasa naturales en su capacidad para actuar como sustrato para un enzima específico para ácidos nucleicos como la quinasa de polinucleótidos. En segundo lugar se puede concluir que los oligos modificados con LNA pueden precipitarse eficientemente mediante procedimientos normales empleados para precipitar ácidos nucleicos estándares. De hecho, la intensidades relativas de las señales de los oligos no modificados (carril 1, 2), parcial (carril 3, 4) y completamente modificados (carril 5, 6) en los autoradiogramas sugiere que cuantos más nucleósidos LNA contiene un oligo de ADN estándar, más eficientemente puede precipitarse mediante procedimientos de sal/alcohol. En tercer lugar, las posiciones similares de las señales en los autoradiogramas de oligos no modificados, parcial y completamente modificados muestra que los nucleósidos de LNA en un oligo de ADN no alteran su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 138

Marcaje del extremo 3' de oligonucleótidos conteniendo LNA con desoxinucleotidil transferasa terminal

5 Se marcaron en el extremo 3' oligonucleótidos conteniendo monómeros de LNA usando el enzima desoxinucleotidil transferasa terminal. La secuencia y extensión de la modificación con LNA fue como sigue (en donde los monómeros de LNA están en negrita):

Control	5' GGT GGT TTG TTT G 3'
10 (1)	5' GGT GGT TTG TTT G 3'
(2)	5' GGT GGT TTG TTT G 3'
(3)	5' GGT GGT TTG TTT G 3'

15 El oligonucleótido (50 pmol) se incubó con 250 μ Ci [α -³²P] ddATP (3000 Ci/mmol) y 100 Unidades de desoxinucleotidil transferasa terminal en 250 μ l de tampón cacodilate 100 mM, pH 7,2, CoCl₂ 2 mM y 2-mercaptoetanol 0,2 mM a 37°C durante 2 horas. La reacción se detuvo entonces mediante la adición de tampón de carga con formamida y calentando hasta 100°C durante 5 minutos antes de colocarla sobre hielo. Se corrieron las muestras (0,2 pmol) en un gel de acrilamida al 19% conteniendo urea 7 M, y se cuantificó el porcentaje de incorporación de radiactividad en las bandas de oligonucleótido por medio de un "fosforimager" (Molecular Dynamics). Los resultados muestran la incorporación de radiactividad en todos los casos, incluyendo el oligonucleótido con un elevado contenido en LNA: Control 94,9%, (1) 39,7%, (2) 83,7%, (3) 31,7%. Concluimos que los oligos modificados con LNA son sustratos para el enzima TdT.

25 Ejemplo 139

La capacidad de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) para marcar alargar la cola de oligonucleótidos modificados depende del diseño del oligómero

30 Los siguientes cebadores de 15-meros y una mezcla de marcadores de oligonucleótidos de 8 a 32 bases se marcaron en el extremo 5' con [γ -³³P]ATP y la quinasa de polinucleótido de T4 (en donde los monómeros de LNA están en negrita):

P1	5'- TGC ATG TGC TGG AGA-3'
35 P2	5'- GC ATG TGC TGG AGA T-3'
PZ1	5'- TGC ATG TGC TGG AGA-3'
PZ2	5'- GC ATG TGC TGG AGA T-3'

40 Las reacciones se hirvieron durante 5 minutos después del marcaje para suprimir cualquier actividad PNK. Se incubaron cuatro picomoles de cada cebador marcado, 25 U de desoxinucleotidil transferasa terminal, y dATP 16 μ M, en 25 μ l de tampón cacodilato 100 mM, pH 7,2, CoCl₂ 2 mM y 2-mercaptoetanol 0,2 mM durante 90 min a 37°C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de solución de detención de formamida y los productos de la reacción se corrieron en un gel de poli(acrilamida) al 19% con urea 7 M con los marcadores marcados. Se realizó la autoradiografía usando película Biomax sobre el gel seco. Tal como se muestra en la Figura 22, P1 (carril 2), P2 (carril 4) y PZ1 (carril 3) todos proporcionaron una cola estimada en más de 70 base de longitud, en base de los 8-32 marcadores de base (carriles 1 y 6). El cebador PZ2 (carril 5) no se alargó en estas condiciones de reacción. Concluimos que el enzima TdT tolerará monómeros de LNA dentro del oligonucleótido, pero no en el extremo 3'.

50 Ejemplo 140

El LNA-timidina-5'-trifosfato (LNA-TTP) como un sustrato para la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)

55 Con objeto de ensayar la capacidad del trifosfato de LNA-TTP (Ejemplo 123) para ser aceptado por la DTD como un sustrato, se realizó una reacción de alargamiento por la cola de un oligonucleótido. Se marcaron un cebador de 15-meros (secuencia: 5'-TGC ATG TGC TGG AGA-3') y una mezcla de marcadores de oligonucleótido de 8 a 32 bases en el extremo 5' con [γ -³³P]ATP y quinasa de polinucleótido de T4. Las reacciones se hirvieron durante 5 minutos después del marcado para suprimir cualquier actividad PNK. Se incubaron cuatro picomoles del cebador marcado, y 25 U de desoxinucleotidil transferasa terminal, y 32, 64 o 128 μ M de dTTP o LNA-TTP, en 25 μ l de tampón cacodilato 100 mM, pH 7,2, CoCl₂ 2 mM y 2-mercaptoetanol 0,2 mM durante 90 min a 37°C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de solución de detención de formamida y los productos de la reacción se corrieron en un gel de poli(acrilamida) al 19% con urea 7 M con los marcadores marcados. Se realizó la autoradiografía usando película Biomax sobre el gel seco. Tal como se muestra en la Figura 10, las reacciones con 32 μ M dTTP (carril B), 64 μ M dTTP (carril C) o 128 μ M dTTP (carril D) produjeron todas oligonucleótidos con colas que, en base a los marcadores de 8-32 oligonucleótidos (carriles izquierdo y derecho más externos), se estimó que tenían más de 100 nucleótidos. Las reacción LNA-TTP (32 μ M dTTP (carril E), 64 μ M dTTP (carril F) o 128 μ M dTTP (carril G)) resultaron todas en la extensión del cebador por una base y en que ~50% de este fuera extendido por una base adicional. Este resultado

ES 2 242 291 T3

es muy similar al obtenido con ribonucleótidos y TdT. Concluimos que los trifosfatos derivados de LNA pueden ser reconocidos e incorporados en un oligonucleótido de ADN por el enzima TdT. Este último hallazgo de que los LNA-TTP pueden unirse a la polimersa refuerza la posibilidad de usar exitosamente derivados del monómero LNA como drogas de nucleósidos.

Ejemplo 141

El fragmento Klenow de la polimerasa I del ADN libre de la exonucleasa puede incorporar adenosina, citosina, guanosina y uridina-5'-trifosfatos de LNA (LNA ATP, LNA CTP, LNA GTP, LNA UTP) en una hebra de AND

Se usó un ensayo de extensión para evaluar los NTP de LNA (ver Ejemplo 123), ribonucleótidos, como sustratos para la polimerasa I de ADN fragmento Klenow libre de exonucleasa (EKF). El ensayo usó un cebador de 15-meros, marcado con ³²P en su extremo 5', hibridado a uno de cuatro plantillas diferentes de 24-meros. Las secuencias del cebador y plantillas son (los monómeros de LNA están en negrita):

Cebador	5' TGCATGTGCTGGAGA 3'
Plantilla 1	3' ACGTACACGACCTCTACCTTGCTA 5'
Plantilla 2	3' ACGTACACGACCTCTCTTGATCAG 5'
Plantilla 3	3' ACGTACACGACCTCTTGGCTAGTC 5'
Plantilla 4	3' ACGTACACGACCTCTGAACTAGTC 5'

Se hibridó un picomol de cebador marcado con ³³P con 2 picomoles de plantilla en $\times 2$ tampón Klenow. A esto se le añadió, bien 4 μ M dNTP α S ó 500 μ M LNA NTP, o una mezcla de 4 μ M dNTP α S y 500 μ M LNA NTP. Se añadieron dos unidades de polimerasa de ADN EFK a cada reacción. Se añadieron 2 mU de pirofosfatasa inorgánica a cada una de las reacciones. También se llevaron a cabo control de cebador más plantilla más enzima. Todas las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 μ l. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 minutos. A continuación se detuvieron las reacciones mediante la adición de la solución de formamida-EDTA 10 μ l. Los productos de reacción se separaron en un gel de poliacrilamida al 19%, urea 7 M, y se midieron los fragmentos de producto por comparación con una escalera de oligonucleótido de 8 a 32 bases marcado con ³³P después de la exposición a película de autoradiografía Kodak Biomax.

La Figura 20 muestra el resultado con LNA-UTP usando la plantilla 1. Los carriles (1-12) corresponden a las siguientes reacciones: incorporación de LNA-UTP mediante EFK. Carril 1, cebador, plantilla y enzima. Carril 2, más dTTP α S. Carril 3, más LNA UTP. Carril 4, más dTTP α S y dGTP α S. Carril 5, más LNA UTP y dGTP α S. Carril 6, más dATP α S, dGTP α S y dTTP α S. Carril 7, más LNA UTP, dCTP α S, dGTP α S y dTTP α S. Carril 8, más dGTP α S. Carril 9, más dCTP α S, dGTP α S y dTTP α S. Carril 10, más LNA UTP, dATP α S, dCTP α S y dGTP α S. Carril 11, más dATP α S, dCTP α S y dGTP α S. Carril 12, más 4 dNTP α S. Los carriles en ambos lados muestran los marcadores de oligonucleótidos de 8-32 bases usados para calibrar el tamaño de los productos.

Tal como es evidente a partir de la Figura 20, el LNA-UTP se incorpora específicamente como una "T". La extensión adicional a partir de un extremo 3' terminado en LNA-UTP con dNTP α S es muy lenta.

La Figura 21 muestra el resultado con LNA-ATP, LNA-CTP, y LNA-GTP usando las plantillas 2-4. Los carriles (1-21) corresponden a las siguientes reacciones: Carriles 1, 7, 13 y 17, cebador, plantilla y enzima. Carril 2, más dGTP α S. Carril 3, más dATP α S y dGTP α S. Carril 4, más LNA GTP. Carril 5, más dGTP α S y LNA ATP. Carril 6, más LNA ATP y LNA GTP. Carril 8, más dATP α S. Carril 9, más dATP α S y dCTP α S. Carril 10, más LNA ATP. Carril 11, más dCTP α S y LNA ATP. Carril 12, más dATP α S y LNA CTP. Carril 14, más dTTP α S. Carril 15, más dGTP α S y dTTP α S. Carril 16, más dTTP α S y LNA GTP. Carril 18, más dCTP α S. Carril 19, más dCTP α S y dTTP α S. Carril 20, más LNA CTP. Carril 21-dTTP α S y LNA CTP. Los carriles en ambos lados muestran los marcadores de oligonucleótidos de 8-32 bases usados para calibrar el tamaño de los productos.

Los experimentos usando la plantilla 2 (carriles 1-6), muestran que la LNA-GTP capaz de producir el producto +1 con extensión eficiente del cebador (carril 4). La adición de dGTP α S y LNA-ATP resulta principalmente en el producto +2 (carril 5). Este procede de la incorporación de dGTP α S para rendir el producto +1 seguida por la extensión con LNA-ATP. Hay evidencia de una pequeña cantidad de producto +3 procedente de la incorporación consecutiva de LNA-ATP. Los experimentos usando la plantilla 3 (carriles 7-12) muestran que la LNA-ATP se incorpora eficientemente para rendir el producto +1 (carril 10). La extensión de este producto con dCTP α S es lenta (carril 11). La adición de dATP α S y LNA CTP resulta en los productos +2 y +3 (carril 12). La ausencia de cualquier producto +1 significativo muestra que la adición del primer LNA-CTP es eficiente, pero que la adición del segundo LNA-CTP es lenta. Los resultados de los experimentos con las plantillas 1 (carriles 13-16) y 4 (carriles 17-21) muestran tendencias similares a aquéllas obtenidas con otras plantillas. El LNA-CTP se incorpora eficientemente para rendir el producto +1 con la plantilla 4 (carril 20). La extensión de este producto con dTTP α S es de nuevo lenta (carril 21). La adición de LNA-GTP y dTTP α S a las reacciones con la plantilla 1 resulta en el producto +2 (carril 16). De nuevo, esto muestra que la adición de un único trifosfato de LNA es bastante eficiente, pero que la adición de trifosfatos de LNA consecutivos es lenta.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 142

Los monómeros de LNA pueden usarse para mejorar la resistencia de un oligonucleótido a la digestión por exonucleasa III

5

Con objeto de ensayar la resistencia de un oligonucleótido conteniendo LNA a la degradación por Exonucleasa III se realizó la siguiente reacción. Los siguientes cebadores de 15-meros y marcadores de oligonucleótidos de 8 a 32 base se marcaron en su extremo 5' con [γ 35 P] ATP y quinasa de polinucleótido de T4 (monómeros de LNA en negrita):

10 P2 5'-GC ATG TGC TGG AGA T-3'

PZ2 5'-GC ATG TGC TGG AGA T-3'

15 Las reacciones se hirvieron durante 5 minutos después del marcaje para suprimir cualquier actividad PNK. Se incubaron 8 picomoles de cada cebador marcado con 25 pmoles de plantilla (secuencia: 3'-ACG TAC ACG ACC TCT ACC TTG CTA-5') en $\times 2$ tampón Klenow. Se añadieron 10 U de exonucleasa III a cada una de las reacciones. También se prepararon controles que tenía 1 μ l de agua añadida en lugar del enzima. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 5 min. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 10 μ l de solución de detención de formamida/EDTA. Las reacciones se calentaron hasta 95°C durante 3 min antes de cargarlas sobre un gel de poliacrilamida al 19% y urea 7 M. El gel se fijo en ácido acético al 10%/metanol al 10% antes de transferirlo a papel 3MM y secarlo. El gel secado se expuso a una pantalla de fósforo durante 3 horas. La pantalla de fósforo se analizó en el instrumento Molecular Dynamics Storm 860 usando el programa ImageQuant. El análisis de la pantalla de fósforo mostró que, en ausencia del enzima, la banda de longitud completa de P2 tenía el 99% de la señal y que la banda de longitud completa de P2 tenía el 96% de la señal. En presencia del enzima, sólo el 20% del producto de longitud completa de P2 permanecía después de 5 minutos de incubación. Sin embargo, el 62% del producto PZ2 de longitud completa permanecía después del mismo tratamiento. Esto muestra que un único monómero de LNA en el extremo 3' de un oligonucleótido puede mejorar la resistencia a la degradación por la exonucleasa III.

30 *Aplicaciones de la PCR*

Ejemplo 143

35 Los monómeros de LNA pueden usarse para incrementar significativamente las prestaciones de los oligos de ADN biotinilados en la captura específica para secuencia de amplicones de PCR en un formato MTP. Se generaron dos amplicones marcados con DIG a partir de pUC19 mediante amplificación con PCR como sigue:

Mezcla de reacción PCR para el Amplicon 1

40 1 μ l pUC19 (1 ng/ μ l),
1 μ l cebador hacia atrás (5'-AACAGCTATGACCATG-3') (20 μ M),
1 μ l cebador hacia adelante (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') (20 μ M),
45 10 μ l dUTP-mezcla (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP y 6 mM dUTP),
1,5 μ l DIG-11-dUTP (1 mM)
50 10 μ l tampón 10 \times Taq (Boehringer Mannheim Incl. MgCl₂)
1 μ l Taq polimerasa (Boehringer Mannheim) 5 U/ μ l
H₂O ad 100 μ l

55

Mezcla de reacción PCR para el Amplicon 2

1 μ l pUC19 (1 ng/ μ l),
60 0,4 μ l cebador 3 (5'-GATAGGTGCCTCACTGAT-3') (50 μ M),
0,4 μ l cebador 4 (5'-GTCGTTTCGCTCCAAGCTG-3') (50 μ M),
10 μ l dUTP-mezcla (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP y 6 mM dUTP),
65 1,5 μ l DIG-11-dUTP (1 mM)
10 μ l tampón 10 \times Taq (Boehringer Mannheim incl MgCl₂)

ES 2 242 291 T3

1 μ l Taq polimerasa (Boehringer Mannheim) 5 U/ μ l

H₂O ad 100 μ l

5 *Reacción de la PCR*

(Ciclador: Perkin Elmer 9600) 94°C 5 min; añadir polimerasa; 94°C 1 min, 45°C 1 min, 70°C 2 min (29 ciclos) 72°C 10 min.

10 10 μ l procedentes de cada reacción de PCR se analizaron en un gel de agarosa estándar y se observaron 110 fragmentos esperados de aproximadamente 100 p.b. y 500 p.b.

Se mezclaron 10 μ l de amplicón 1 ó amplicón 2 marcados con DIG, con 5 pmol de sonda de captura biotinilada en 5', en 1xSSC (NaCl 0,15 M, citrate 15 mM, pH 7,0) en un volumen total de 450 μ l. Se usaron las siguientes sondas de captura: B-ADN1 (biotina-ATGCCTGCAGGTCGAC-3'; sonda de ADN específica para el amplicón 1), B-ADN2 (biotin-GGTGGTTTGGTTT-3'; sonda de LNA específica para el amplicón 2) y B-LNA2 (biotina-**GGTGGTTTGGTTT**-3', nucleósidos LNA en negrita; sonda de ADN específica para el amplicón 2). Las reacciones se calentaron hasta 95°C durante 5 min con objeto de desnaturar los amplicones y se dejaron enfriar hasta 25°C durante 15 min para facilitar la hibridación entre la sonda y la hebra diana del amplicón. Después de la hibridación, se transfirieron 190 μ l de cada reacción a una microplaca recubierta con estreptoavidina (Pierce, nº de catálogo 15124) y se incubaron durante una hora a 37°C. Después de lavar la placa con solución salina tamponada con fosfato (PBST, Na⁺ 0,15 M, pH 7,2, 0,05% Tween 20, 3x300 μ l), se añadieron 200 μ l de anticuerpos anti-DIG marcados con peroxidasa (Boehringer Mannheim, diluidos 1:1000 en PBST). Se incubaron las placas durante 30 min a 37°C y se lavaron (PBST, 3x300 μ l). Se ensayaron los pocillos en busca de actividad peroxidasa mediante la adición de 100 μ l de solución de sustrato (tampón citrate-fosfato 0,1 M, pH 5,0, 0,66 mg/ml de orto-fenilendiamina dihidrocloruro, 0,012% H₂O₂). La reacción se paró transcurridos 8 min mediante la adición de 100 μ l de H₂SO₄ (0,5 M) y se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas. Tal como se muestra en la Figura 3, las sondas de captura bio-ADN no modificadas (B-ADN1 y B-ADN2) se comportan ambas como se esperaba, es decir, cada una captura sólo su amplicón de PCR diana. En comparación con la sonda B-ADN1, la sonda B-ADN2 es bastante ineficiente en la captura de su amplicón pariente. Sin embargo, la eficiencia de captura de la sonda B-ADN2 puede mejorarse dramáticamente sustituyendo 12 de sus 13 nucleósidos de ADN por los correspondientes nucleósidos LNA. Tal como se muestra en la Figura 3, el uso de la sonda B-LNA2 en lugar de la sonda B-ADN2 conduce a un incremento en más de 10 veces en la sensibilidad del ensayo. Al mismo tiempo, la B-LNA2 retiene la capacidad de la B-ADN2 no modificada para discriminar eficientemente entre el amplicón relacionado y el no relacionado, subrayando la excelente especificidad de los LNA-oligos. Concluimos que 1) la biotina covalentemente unida a un oligo modificado con LNA retiene su capacidad para unirse a estreptoavidina, 2) que los oligos modificados con LNA funcionan eficientemente en un ensayo de captura amplicón basado en MTP, y que 3) los LNA ofrecen una forma para mejorar dramáticamente las prestaciones de oligos de ADN estándares en la afinidad de captura de amplicones de PCR.

40 Ejemplo 144

Un oligo sustituido con LNA es capaz de capturar su amplicón de PCR pariente mediante invasión de la hebra

Se mezclaron dos conjuntos idénticos de 10 μ l de reacciones de amplicón 1 o 2 (preparadas como en el Ejemplo 143) con 1, 5 ó 25 pmol de la sonda de captura B-LNA2 (biotina-**GGTGGTTTGGTTT**-3', nucleósidos de LNA en negrita; sonda específica para el amplicón 2) en 1xSSC (NaCl 0,15 M, citrato 15 mM, pH 7,0) en un volumen total de 450 μ l. Un conjunto de reacciones se calentó a 95°C durante 5 min con objeto de desnaturar los amplicones y se dejó enfriar hasta 25°C para facilitar la hibridación entre la sonda y la hebra del amplicón diana. El otro conjunto de reacciones se dejó sin desnaturación. De cada uno de las reacciones se transfirieron 190 μ l a una microplaca recubierta con estreptoavidina (Pierce, nº de catálogo 15124) y se incubaron durante una hora a 37°C. Después de lavar la placa con solución salina tamponada con fosfato (PBST, Na⁺ 0,15 M, pH 7,2, 0,05% de Tween 20, 3x300 μ l), se añadieron 200 μ l de anticuerpos anti-DIG marcados con peroxidasa (Boehringer Mannheim, diluidos 1:1000 en PBST). Se incubaron las placas durante 30 min a 37°C y se lavaron (PBST, 3x300 μ l). Los pocillos se ensayaron en busca de actividad peroxidasa añadiendo 100 μ l de solución de sustrato (tampón citrate-fosfato 0,1 M, pH 5,0, 0,66 mg/ml de ortofenilenediamina dihidrocloruro, 0,012% H₂O₂). La reacción se detuvo transcurridos 10 min mediante la adición de 100 μ l de H₂SO₄ (0,5 M), y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas. Cuando los amplicones se desnaturan antes de la hibridación con la sonda de captura (Figura 4A) observamos una captura del amplicón eficiente y específica para la secuencia similar a la observada en el Ejemplo 143. El incremento de la concentración de B-LNA2 de 1 a 5 pmol conduce a un incremento en la eficiencia de la captura. Un incremento adicional hasta 25 pmoles de sonda resulta en una señal disminuida. Esta observación es consistente con la saturación de los sitios de unión de biotina disponibles sobre la estreptoavidina MTP. Cuando los amplicones no se desnaturan antes de la hibridación con la sonda de captura (Figura 4B) también observamos una captura de amplicón específica para la secuencia y eficiente. De hecho, los datos muestran que la captura del amplicón sin desnaturación es tan efectiva y específica como la captura de amplicón con desnaturación. Esto sugiere con fuerza que la sonda Bio-LNA2 es capaz de unirse a su secuencia diana mediante invasión de la hebra. Que sepamos, este constituye el primer ejemplo hasta la fecha de apuntamiento específico para secuencia de ADNds en condiciones salinas fisiológicas por parte de una sonda mixta de purina/pirimidina. Aparte de su potencial para simplificar significativamente un rango de procedimientos de investigación básica y de diagnóstico de ADN, se puede prever que esta inesperada propiedad

ES 2 242 291 T3

de los oligos modificados con LNA será de la mayor importancia en el desarrollo de nuevas drogas eficientes en la estrategia antisentido y, en particular, en la estrategia anti-gen.

Ejemplo 145

5

Un oligo sustituido con LNA, inmovilizado sobre una superficie sólida, funciona eficientemente en la captura específica para secuencia de un amplicón de PCR

Los pocillos de una placa de microvaloración recubierta con estreptoavidina (Boehringer Mannheim) se incubaron durante 1 hora, bien con 5 pmoles de la sonda B-ADN2 (biotina-GGTGGTTTGTGG-3'; sonda de ADN específica para el amplicón 2), o con la sonda B-LNA2 (biotina-GGTGGTTTGTGG-3', nucleósidos de LNA en negrita; sonda de LNA específica para el amplicón 2) en un volumen total de 100 μ l 1 \times SSC (NaCl 0,15 M, citrate 15 mM, pH 7,0). En total, se incubaron cuatro pocillos con la sonda B-ADN2, cuatro pocillos con la sonda B-LNA2 y cuatro pocillos se incubaron con tampón solo. Después de la incubación, se lavaron los pocillos tres veces con 1 \times SSC. Se mezclaron amplicón 1 marcado con (60 μ l) o amplicón 2 (60 μ l) (preparado como en el Ejemplo 143) con 540 μ l de 1 \times SSC, se desnaturalizaron con calor a 95°C durante 5 min., y se transfirieron (100 μ l) a los pocillos de la microplaca. Dos de los pocillos contenían bien B-ADN2, B-LNA2, o sin sonda de captura, recibieron amplicón 1 y dos de los pocillos conteniendo B-ADN2, B-LNA2 o sin sonda de captura recibieron amplicón 2. Transcurrida 1 hora a 37°C, se lavó la placa 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBST, Na⁺ 0,15 M, pH 7,2, 0,05% de Tween 20, 3 \times 3004) y se añadieron 200 μ l de anticuerpos anti-DIG marcados con peroxidasa (Boehringer Mannheim, diluido 1:1000 en PBST). Se incubaron las placas durante 30 min a 37°C y se lavaron 3 veces con 300 μ l PBST. Se ensayó la actividad peroxidasa de los pocillos añadiendo 100 μ l de solución de sustrato (tampón citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0, 0,66 mg/ml de orto-fenilenediamina dihidrocloruro, 0,012% H₂O₂). La reacción se detuvo transcurridos 6 min añadiendo 100 μ l de H₂SO₄ (0,5 M) y se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas. Tal como se muestra en la Figura 5, la sonda de captura modificada con LNA (B-LNA2) captura su amplicón específico (amplicón 2) muy eficientemente y significativamente mejor (incremento de aproximadamente cinco veces en la sensibilidad) que la correspondiente sonda de captura no modificada (B-ADN2). No se obtuvo señal cuando se incubó la sonda B-LNA2 con el amplicón no relacionado (amplicón 1), subrayando la exquisita especificidad de la sonda B-LNA2. Concluimos que los oligos modificados con LNA funcionan eficientemente en la captura específica para secuencia de amplicones de PCR cuando están inmovilizados sobre una superficie sólida. Además, concluimos que el uso de oligos modificados con LNA en lugar de los oligos de ADN estándares proporciona una mejor relación señal-ruido. Por tanto, los LNA ofrecen un medio para mejorar significativamente las prestaciones de los ensayos actuales basados en ADN que utilizan sondas de captura inmovilizadas, como, por ejemplo, el formateo en matriz en donde se usan múltiples sondas inmovilizadas para detectar simultáneamente la ocurrencia de varias secuencias diana en una muestra.

35

Ejemplo 146

Pueden usarse monómeros de LNA completamente mezclados para incrementar significativamente las prestaciones de oligos de ADN biotinilados en la captura específica de amplicones de PCR en un formato MTP

40

Se generaron tres amplicones marcados con DIG a partir de la secuencia Nras (referencia: *Nucleic Acid Research*, Vol. 13, No. 14, pp. 52-55 (1985)) mediante PCR de amplificación como sigue:

Cebadores de PCR

45

Cebador hacia adelante: 5'-CCAGCTCTCAGTAGTTTAGTACA-3', bases 701-723 de acuerdo con la referencia NAR.

50

Cebador hacia atrás de 910 p.b.: 5'-GTAGAGCTTTCTGGTATGACACA-3' bases 1612-1590 (secuencia inversa acorde con la referencia NAR).

Cebador hacia atrás de 600 p.b.: 5'-TAAGTCACAGACGTATCTCAGAC-3' bases 1331-1308 (secuencia inversa acorde con la referencia NAR).

55

Cebador hacia atrás de 200 p.b.: 5'-CTCTGTTTCAGACATGAACTGCT-3' bases 909-886 (secuencia inversa acorde con la referencia NAR).

Mezcla de reacción de PCR para amplicones de Nras

60

2,3 μ l de ADN genómico placentar humano (440 ng/ μ l), 50 μ l de 10 \times tampón de PCR (sin MgCl₂, Perkin Elmer), 30 μ l de MgCl₂ 25 mM, 50 μ l de mezcla de dNTP (2 mM dATP, dCTP, dGTP y 1,8 mM dTTP), 10 μ l de Dig-11-dUTP 1 mM, 10 μ l cebador hacia adelante 25 μ M, 10 μ l de cebador hacia atrás 25 μ M, 5 μ l de 5 U/ μ l AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) y 500 μ l de agua ad.

65

Reacción de PCR: Se preparó la mezcla anterior para todos los productos de PCR de Nras. Siendo la única diferencia el cebador hacia atrás de 910 p.b., 600 p.b. o 200 p.b. añadidos una vez simultáneamente. Las mezclas de PCR se alicuotaron en diez tubos de PCR cada una y se ciclaron en un Perkin Elmer 9600 en las siguientes condiciones: 95°C 3 min; 55°C 2 min, 72°C 3 min, 95°C 1 min (30 ciclos); 55°C 2 min, 72°C 10 min y mantenimiento a 4°C. Se

analizaron 10 μ l de cada reacción de PCR en un gel de agarosa estándar y se observaron los fragmentos esperados de 910 p.b., 600 p.b. y 200 p.b..

Condiciones de ensayo: Se incubaron los pocillos de una placa de microvaloración recubiertos con estreptoavidina (Boehringer Mannheim; capacidad de unión de 20 pmoles de biotina por pocillo) durante 1 hora en 5 \times SSCT (NaCl 0,75 M, citrato 75 mM, pH 7,0, 0,1% de Tween 20) a 37°C con 1 pmol de uno de ADN Nras Cap A (biotina-5'-TTCCACAGCACAA-3'), LNA/ADN Nras Cap A (biotina-5'-TTCCACAGCACAA-3'), LNA Nras Cap A (biotina-5'-TTCCACAGCACAA-3'), ADN Nras Cap B (biotina-5'-AGAGCCGATAACA-3'), LNA/ADN Nras Cap B (biotina-5'-AGAGCCGATAACA-3') o LNA Nras Cap B (biotina-5'-AGAGCCGATAACA-3'); nucleósidos LNA en negrita. Las sondas de captura Nras Cap A capturan los amplicones Nras 910, Nras 600 y Nras 200. Las sondas de captura Nras Cap B capturan los amplicones específicos Nras 910 y Nras 600. Después de su incubación con las diferentes sondas de captura, se lavaron los pocillos con 5 \times SSCT y se añadieron 5 μ l de amplicones marcados con DIG nativos o desnaturalizados (95°C 5 min y 10 min sobre hielo) (Nras 910, Nras 600 o Nras 200) en 95 μ l 1 \times SSCT (NaCl 0,15 M, citrato 15 mM, pH 7,0, 0,1% de Tween 20) por pocillo y se incubaron 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (1 \times PBST, Na⁺ 0,15 M, pH 7,2, 0,05% de Tween 20) y se incubaron 30 min a 37°C con 200 μ l de anticuerpos anti-DIG marcados con peroxidasa (Boehringer Mannheim, diluidos 1:1000 en 1 \times PBST). Finalmente, se lavaron los pocillos tres veces en 1 \times PBST y se ensayó la actividad peroxidasa añadiendo 100 μ l de solución de sustrato (tampón de citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0, 0,66 mg/ml orto-fenilenediamina dihidrocloruro, 0,012% H₂O₂), se detuvo la reacción transcurridos 9 minutos añadiendo 100 μ l de H₂SO₄ 0,5 M y se diluyó 4 veces en H₂SO₄ antes de leer la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas. Tal como se muestra en la Figura 23A, las sondas de captura salpicadas con 12 nucleósidos LNA (LNA Nras Cap A y LNA Cap B) capturaron muy eficientemente los amplicones específicos sin desnaturalización previa (amplicones nativos). Las sondas de captura salpicadas con 4 nucleósidos LNA (LNA/ADN Nras Cap A y LNA/ADN Nras Cap B) capturaron los mismos amplicones con menor eficiencia, y las sondas de captura de ADN (ADN Nras Cap A y ADN Nras Cap B) no capturaron en absoluto los amplicones específicos. El amplicón de control, Nras 200, no fue capturado por las sondas LNA Cap B o LNA/ADN Nras Cap B demostrando la exquisita especificidad de las sondas de captura salpicadas con LNA. La Figura 23B muestra el mismo experimento realizado con amplicones desnaturalizados. Esencialmente, emerge la misma pintura, con la diferencia esencial de que las eficiencias de las capturas están generalmente incrementadas. Concluimos que los oligos modificados con LNA que contienen nucleósidos LNA (nucleósidos LNA A, T, G o C) funcionan eficientemente en la captura específica para secuencia de amplicones de PCR cuando están inmovilizados sobre una superficie sólida. Además, concluimos que los LNA ofrecen un medio para construir sondas de captura que funcionarán eficientemente en la captura de amplicones sin desnaturalización previa, es decir, captura mediante desplazamiento de hebra. Esta capacidad facilita una simplificación significativa de los formatos actuales de detección de amplicón basados en ADN.

35 Ejemplo 147

Los oligos modificados con LNA funcionan como cebadores para las polimerasas de ácido nucleico

40 La capacidad de un oligo modificado con LNA (5'-GGTGGTTTGTGTTG-3', nucleósidos LNA en negrita) para servir como cebador en la elongación enzimática, dependiente de plantilla, se investigó con 3 clases diferentes de polimerasas. Una transcriptasa inversa M-MuLV (Boehringer Mannheim) que puede usar tanto ARN como ADN como plantilla, la polimerasa Klenow que es representativa de las polimerasas de ADN estándares, y una polimerasa termoestable, BM-TAQ (Boehringer Mannheim). Como control, se realizaron las reacciones de extensión usando el mismo cebador de ADN no modificado (5'-GGTGGTTTGTGTTG-3'). Los cebadores de LNA y ADN se marcaron con ³²P- γ -ATP como se ha descrito previamente en el Ejemplo 137. Como plantilla se usó un oligo de ADN de 50-meros (5'-AAAAA TCGAC GCTCA AGTCA GAAAA GCATC TCACA AACAA ACAA CCACC-3'). La reacción con M-MuLV (Boehringer Mannheim,) contenía 2 μ l bien de cebador de LNA o de cebador de ADN (10 μ M), 2 μ l de ADN plantilla (10 μ M), 2 μ l de dNTP 2 mM, 2 μ l de 10 \times buffer (Tris-HCl 500 mM, KCl 300 mM, MgCl₂ 60 mM, DTT 100 mM, pH 8,3 (37°C)), 1 μ l de enzima (20U/ μ l) y agua hasta 20 μ l. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 60 min. La reacción con polimerase Klenow (USB) contenía 2 μ l cebador de LNA o ADN (10 μ M), 2 μ l de plantilla de ADN (10 μ M), 2 μ l de dNTP 2 mM, 2 μ l de 10 \times buffer (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, DTT 75 mM, pH 7,5, 1 μ l de enzima (10U/ μ l) y agua hasta 20 μ l. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 60 min. La reacción con BM-Taq (Boehringer Mannheim) contenía 2 μ l de cebador de LNA o ADN (10 μ M), 2 μ l de plantilla de ADN (10 μ M), 2 μ l de dNTP 2 mM, 2 μ l de 10 \times buffer (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 15 mM, KCl 50 mM, pH 8,3, 1 μ l de enzima (5U/ μ l) y agua hasta 20 μ l. Las reacciones se incubaron a una temperatura de partida de 37°C que se incrementó a 1°C/min hasta 60°C, en donde se mantuvo durante 30 min. Al final del período de incubación, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 10 μ l de tampón de carga (0,25% (p/v) azul de bromofenol, 0,25% (p/v) xileno cianol, 80% (v/v) formamida). Las muestras se calentaron a 95°C durante 1 min., se colocaron sobre hielo y se cargaron 2 μ l sobre un gel de secuenciación de poliacrilamida al 8%, y se electroforesaron en un BRL modelo 52 de Life Technologies Inc. Después de la electroforesis, se secó el gel sobre una placa de vidrio y se sometió a autoradiografía (película para rayos X: Kodak X-Omat AR). Tal como se muestra en la Figura 7, se observaron productos de extensión claros y similares con ambos los cebadores de LNA y ADN cuando se usó cualquiera de la polimerasa Klenow (carril 3) o la polimerasa BM-Taq (carril 5).

65 Cuando se usó la transcriptasa inversa M-MuLV (carril 2) sólo se detectó un producto de extensión en el caso del cebador LNA. Los cebadores marcados de LNA y ADN que no se habían sometido a elongación enzimática están presentes en los carriles 1, 4 y 6. Concluimos que la incorporación de nucleósidos de LNA en oligos de ADN

ES 2 242 291 T3

estándares no impide el reconocimiento del dúplex oligo/plantilla por parte de las polimerasas de ácido nucleico. Además, concluimos que los oligos modificados con LNA actúan tan eficientemente como cebadores como los oligos de ADN.

5 Ejemplo 148

El oligo modificado con LNA funciona como cebador en los procesos de amplificación de diana

La capacidad de los oligos modificados con LNA para actuar como cebadores en la amplificación por PCR se analizó con tres oligos que diferían sólo en el número de nucleósidos LNA que contenían: 4 nucleósidos LNA (cebador AL2: 5'-GGTGGTTTGGTTG-3', nucleósidos LNA en negrita), 1 nucleósido LNA (cebador AL10: 5'-GGTGGTTTGGTTG-3', nucleósido LNA en bold) y ningún nucleósido LNA (cebador FP2: 5'-GGTGGTTTGGTTG-3'). Las reacciones de PCR (100 μ l) contenían, bien ninguna plantilla (control), ó 0,01 ng, 0,1 ng o 1 ng de plantilla (plásmido pUC19), 0,2 μ M cebador hacia atrás (5'-GTGGTTCGCTCCAAGCTG-3'), 0,2 μ M de uno de los cebadores hacia adelante AL2, AL10 o FP2, 200 μ M de dATP, dGTP, dCTP y dTTP, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM y 2,5U de la polimerasa BM-Taq. Se realizaron un total de 50 ciclos, consistiendo cada uno en 94°C 1 min., 45°C 1 min., 72°C 1,5 min. (con 2,5U de polimerasa Taq adicionales añadidas después de los primeros 30 ciclos) en un termociclador Techne Genius. Después del ciclo final, las reacciones se incubaron a 72°C 3 min. y a continuación a 4°C durante la noche. A 30 μ l de cada reacción se les añadieron 6 μ l de tampón de carga (0,25% (p/v) azul de bromofenol y 40% (v/v) glicerol), y las muestras (conjunto con un marcador de tamaño Amplisize™) se cargaron en un gel de agarosa al 2% y se electroforesaron durante 45 minutos a 150 V. Finalmente, se tiñó el gel con bromuro de etidio y se fotografió. Tal como se muestra en la Figura 8, las reacciones de PCR que usan el cebador hacia adelante no modificado FP2 y el cebador hacia atrás no modificado general amplicones detectables con los tamaños correctos, con todas las cantidades de plantilla usadas (carril 9: 0,01 ng de plantilla, carril 10: 0,1 ng y carril 11: 1 ng). So se obtuvo señal en la reacción de control sin plantilla (carril 12). Cuando el cebador hacia adelante FP2 se reemplazó con el cebador que contiene 1 nucleósido LNA central (AL10) también se detectaron los amplicones con todas las cantidades de plantilla usadas (carril 5: 0,01 ng, carril 6: 0,1 ng y carril 7: 1 ng). Esto indica claramente que el cebador AL10 sostiene una amplificación exponencial, es decir, el cebador AL10 puede tanto extenderse como usarse como plantilla en su totalidad. De nuevo, la reacción de control sin plantilla (carril 8) no produce un amplicón. Cuando el cebador hacia adelante FP2 se reemplaza con el cebador que contiene 4 nucleósidos LNA centrales, los amplicones con el tamaño correcto no pueden detectarse en ninguna de las reacciones. (Carril 1: 0,01 ng de plantilla, carril 2: 0,1 ng, carril 3: 1 ng y carril 4: sin plantilla). No obstante, con la concentración más elevada de plantilla (1 ng) aparece una banda de elevado peso molecular en el gel (carril 3). Esto, sin embargo, es un artefacto del cebador RP1, como se indica mediante la reacción de control, en donde cada uno de los cebadores AL2 (carril A), AL10 (carril B), FP2 (carril C) y RP1 (carril D) se ensayaron por su capacidad para producir un amplicón con la cantidad de plantilla más elevada (1 ng). Puesto que se observó que AL2 actuaba como cebador en el Ejemplo 147, la ausencia de amplicones detectables indica fuertemente que carece de capacidad para actuar como plantilla, es decir, el bloque de 4 nucleósidos de LNA consecutivos bloquea el avance de la polimerasa, convirtiendo por tanto la reacción en una amplificación lineal (el producto de la cual no sería detectable en las condiciones experimentales usadas). Concluimos que los oligos modificados con LNA pueden usarse como cebadores en la amplificación de PCR. Además concluimos que el grado de amplificación (graduado desde amplificación totalmente exponencial hasta lineal) puede controlarse mediante el diseño del oligo modificado con LNA. Destacamos que la posibilidad de bloquear el avance de la polimerasa mediante la incorporación de nucleósidos de LNA en el cebador facilita la generación de amplicones portadores de extremos de hebra sencilla. Tales extremos son fácilmente accesibles para la hibridación sin desnaturalización del amplicón, y esta característica puede ser útil en muchas aplicaciones.

Ejemplo 149

Un oligómero modificado con LNA portando una antraquinona en 5' puede inmovilizarse covalentemente sobre un soporte sólido mediante irradiación, y el oligómero inmovilizado es eficiente en la captura de un oligo de ADN complementario. Bien 25 pmol/ μ l ó 12,5 pmol/ μ l de un oligo ADN antraquinona (5'-AQ-CAG CAG TCG ACA GAG-3') ó un oligo de ADN modificado con LNA y antraquinona (5'-AQ-CAG CAG TCG ACA GAG-3'; el monómero de LNA está subrayado) se motearon (1 μ l/spot) en LiCl 0,2 M sobre un portaobjetos de policarbonato (Nunc). Los oligos se irradiaron durante 15 min con luz UV suave. Después de la irradiación, se lavó tres veces el portaobjetos con agua Milli-Q y se secó al aire. Se hibridaron 25 ml de 0,5 pmol/ μ l de oligómero biotinilado complementario (5'-biotina-CTC TGT CGA CTG CTG-3') con los oligómeros inmovilizados en 5 \times SSCT (Citrato 75 mM, NaCl 0,75 M, pH 7,0, 0,1% de Tween 20) a 50°C durante 2 horas. Después de lavara cuatro veces con 1 \times SSCT y una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBST, Na⁺ 0,15 M, pH 7,2, 0,05% de Tween 20), se añadieron al portaobjetos 25 ml de PBST que contenían 0,06 μ g/ml de peroxidasa de rábano silvestre conjugada con estreptoavidina y 1 μ g/ml de estreptoavidina. El portaobjetos se incubó durante 30 min y se lavó 4 veces con 25 ml de PBST. El portaobjetos se visualizó usando un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal; Pierce) como describía el fabricante y película para rayos X (película CL-XPosure, Pierce 34075). Tal como se muestra en la Figura. 0, tanto el oligo AQ-ADN oligo como el oligo de ADN modificado AQ-LNA proporcionan una señal claramente detectable. Concluimos que los oligos de ADN modificados con LNA y unidos a antraquinona puede unirse eficientemente a una superficie sólida mediante irradiación y que los oligos unidos de esta forma son capaces de hibridarse a sus oligos de ADN diana complementarios.

ES 2 242 291 T3

Ejemplo 150

Hibridación y detección sobre una matriz con diferentes 8-meros marcados con Cy3 y modificados con LNA

5 *Preparación del portaobjetos:* Se aminosilanizaron portaobjetos de vidrio usando una solución al 10% de amino-propiltrietoxisilano en acetona seguida por lavado en acetona. Los siguientes oligonucleótidos se motearon sobre el portaobjetos:

Oligo usado	Secuencia del oligo	Lápices 1+2+3	Secuencia vs sondas
Sec. 3	5'-GTA TGG AG-3'	1 pmol/ μ l	1 desemparejamiento interno
Sec. 6	5'-GTA TGA AG-3'	1 pmol/ μ l	emparejada

Se realizaron diez puntos repetidos, aproximadamente de 1 nl cada punto, por cada oligonucleótido desde cada lápiz sobre cada uno de los 12 portaobjetos.

20 *Sondas (monómeros de LNA en negrita):*

a) Sec. N°. aZi 5'-Cy3-CTT CAT AC-3'

b) Sec. N°. aZ2 5'-Cy3-CTT CAT AC-3'

25 c) Sec. N°. aZ3 5'-Cy3-CTT CAT AC-3'

d) Sec. N°. 16 5'-Cy3-CTT CAT AC-3'

30 *Portaobjetos y condiciones para la hibridación:*

Portaobjetos 1, 2 y 3 hibridados con la sonda aZ1 @ 300 fmol/ μ l, 30 fmol/ μ l, 3 fmol/ μ l

Portaobjetos 4, 5 y 6 hibridados con la sonda aZ2 @ 300 fmol/ μ l, 30 fmol/ μ l, 3 fmol/ μ l

35 Portaobjetos 7, 8 y 9 hibridados con la sonda aZ3 @ 300 fmol/ μ l, 30 fmol/ μ l, 3 fmol/ μ l

Portaobjetos 10, 11 y 12 hibridados con la sonda seq. 16 @ 300 fmol/ μ l, 30 fmol/ μ l, 3 fmol/ μ l

40 Una sonda diluida en 30 μ l de tampón de hibridación (5 \times SSC, 7% de sodio lauril sarcosina) se pipeteó a lo largo de la longitud de cada portaobjeto, se cubrió con cubreobjetos, y se colocó dentro de una caja de plástico, encima de un inserto de plástico que reposaba sobre una toalla de papel empapada con agua. Las cajas se recubrieron con papel de aluminio para mantener la luz fuera, y se incubaron a +4°C durante la noche.

45 *Lavado de los portaobjetos:* Se retiraron los cubreobjetos y los portaobjetos se insertaron en rejillas (6 portaobjetos por rejilla) que se colocaron en cubetas de vidrio para portaobjetos, envueltas en papel de aluminio:

Numero del portaobjeto	Tampón de lavado (4°C)	Tiempo de lavado	Secuencia de la sonda
1, 2, 3	5 \times SSC, 0,1% Tween-20	2 \times 5 min	Sec. n° aZ1
4, 5, 6	5 \times SSC, 0,1% Tween-20	2 \times 5 min	Sec. n° aZ2
7, 8, 9	5 \times SSC, 0,1% Tween-20	2 \times 5 min	Sec. n° aZ3
10, 11, 12	5 \times SSC, 0,1% Tween-20	2 \times 5 min	Sec. n° 16

ES 2 242 291 T3

Después de lavados, los portaobjetos se secaron y escanearon. La fluorescencia se visualizó sobre un escaner de portaobjetos y los datos se analizaron a partir del programa ImageQuant (Molecular Dynamics). Tal como se muestra en la Figura 11, no se observó unión de las sondas marcadas con Cy3 al oligo 3 desemparejado con ninguna de las sondas no modificadas (portaobjeto 10-12), single LNA sonda aZ1 modificada con un único LNA (portaobjeto 1-3), sonda aZ2 modificada con un único LNA (portaobjeto 4-6), o sonda aZ3 modificada con un triple LNA (portaobjeto 7-9) (es decir, la señal obtenida con el oligo desemparejado 3 es comparable a la señal de fondo). Con el oligo 6 complementario se observaron señales específicas en todos los casos. La intensidad de estas señales se correlaciona claramente con el número de LNA presentes en las sondas y con la concentración de las sondas. Cada residuo LNA T incrementa aproximadamente la intensidad de la señal en cerca de un factor de 2 respecto la sonda de oligo ADN normal, es decir, aZ1 y aZ2 = 2× la señal de la secuencia 16, y aZ3 = 8× la señal de la secuencia 16. La discriminación emparejamiento/desemparejamiento es buena con el cambio de la base LNA T, y con la intensidad de la señal incrementada, la discriminación del desemparejamiento parece ser fácil.

Ejemplo 151

Hibridación y detección de desemparejamientos finales sobre una matriz con 8-meros marcados con Cy3 y modificados con LNA

Preparación del portaobjetos: Se aminosilanizaron portaobjetos de vidrio usando una solución al 10% de aminopropiltrióxosilano en acetona seguida por lavado en acetona. Los siguientes oligonucleótidos se motearon a 1 pmol/μl sobre el portaobjetos:

Sec. n° 9 5'-GTGTGGAG-3'

Sec. n° 15 5'-GTGTGGAA-3'

Sec. n° 131 5'-GTGTGGAT-3'

Sec. n° 132 5'-GTGTGGAC-3'

Sec. n° 133 5'-ATGTGGAA-3'

Sec. n° 134 5'-CTGTGGAA-3'

Sec. n° 135 5'-TTGTGGAA-3'

Se realizaron diez puntos repetidos, aproximadamente de 1 nl cada punto, por cada oligonucleótido desde cada uno de los 6 lápices sobre cada uno de los 12 portaobjetos.

Sondas (monómeros de LNA en negrita):

ADN

Sonda n° 1: 5'-Cy3-TTCCACAC-3'

Sonda n° 2: 5'-Cy3-GTCCACAC-3'

Sonda n° 3: 5'-Cy3-ATCCACAC-3'

Sonda n° 4: 5'-Cy3-CTCCACAC-3'

Sonda n° 5: 5'-Cy3-TTCCACAT-3'

Sonda n° 6: 5'-Cy3-TTCCACAG-3'

LNA

Sonda n° 35Z-1: 5'-Cy3-TTCCACAC-3'

Sonda n° 35Z-2: 5'-Cy3-GTCCACAC-3'

Sonda n° 35Z-3: 5'-Cy3-ATCCACAC-3'

Sonda n° 35Z-4: 5'-Cy3-CTCCACAC-3'

Sonda n° 35Z-5: 5'-Cy3-TTCCACAT-3'

Sonda n° 35Z-6: 5'-Cy3-TTCCACAG-3'

Las sondas con monómeros de LNA se prefijan con 35Z- como parte del número de secuencia. Los monómeros de LNA específicos se indican en cursiva/negrita y está situados en los extremos 3' y 5' de los oligos de LNA.

Portaobjetos y condiciones para la hibridación: Cada secuencia de sonda se hibrida sobre un portaobjetos diferente, y las concentraciones de todas las sondas fueron 1 fmol/μl. Cada sonda se diluyó en tampón de hibridación (5×SSC, 7% de sodio lauril sarcosina), del cual se pipetearon 30 μl a lo largo de la longitud de cada portaobjetos, és-

ES 2 242 291 T3

tos se cubrieron con cubreobjetos, y se colocaron dentro de una caja de plástico, encima de un inserto de plástico que reposaba sobre una toalla de papel empapada con agua. Las cajas se recubrieron con papel de aluminio para mantener la luz fuera, y se incubaron a +4°C durante la noche.

5 *Lavado de los portaobjetos:* Se retiraron los cubreobjetos y los portaobjetos se insertaron en rejillas (8 portaobjetos por rejilla) que se colocaron en cubetas de vidrio para portaobjetos, envueltas en papel de aluminio. Todos los portaobjetos se lavaron en 5× SSC durante 2 × 5 min. a +4°C. Después de lavados, los portaobjetos se secaron con chorro de aire y se escanearon. La fluorescencia se visualizó sobre un escáner de portaobjetos y los datos se analizaron a partir del programa ImageQuant (Molecular Dynamics).

10 *Conclusiones:* Tal como se muestra en las Figuras 12 y 13, las sondas que contenían nucleósidos LNA en sus extremos 5' y 3' son en la mayoría de los casos significativamente mejores para discriminar entre secuencias diana emparejadas y desemparejadas que sus correspondientes oligonucleótidos no modificados.

15 Para los oligos de ADN, los desemparejamientos C=T fueron los más difíciles de distinguir, por ejemplo, cuando la secuencia de sonda 1 se emparejó con la secuencia diana 132 y cuando la secuencia de sonda 5 se hibridó con la secuencia diana 134. Otros desemparejamientos fueron visible, tales como los desemparejamientos T=T y G=T, pero estos puntos fueron menos intensos, por ejemplo, en donde las secuencias sonda 5 y 6 se hibridaron respectivamente a la secuencia diana 135. Los oligos de LNA redujeron significativamente estas intensidades de puntos de desemparejamientos C=T y T=T, hasta niveles comparables a las intensidades del punto del desemparejamiento T=T. Las intensidades de punto relativas de las secuencias de sonda 1, 2 y 3 fueron similares para los oligos de ADN y LNA. Sin embargo, con las secuencias de sonda 4, 5 y 6, los oligos de LNA proporcionaron una intensidad de punto significativamente incrementada cuando se hibridaron respectivamente con sus secuencias diana emparejadas 9, 133 y 134.

25 Ejemplo 152

Hibridación y detección de desemparejamientos finales sobre una matriz con 8-meros marcados con Cy3 y completamente modificados con AT LNA

30 *Preparación del portaobjetos:* Se aminosilanizaron portaobjetos de vidrio usando una solución al 10% de aminopropiltrietoxisilano en acetona seguida por lavado en acetona. Los siguientes oligonucleótidos se motearon a 1 pmol/μl sobre el portaobjetos:

35 Sec. nº 9: 5'-GTGTGGAG-3'
Sec. nº 15: 5'-GTGTGGAA-3'
Sec. nº 131: 5'-GTGTGGAT-3'
Sec. nº 132: 5'-GTGTGGAC-3'
40 Sec. nº 133: 5'-ATGTGGAA-3'
Sec. nº 134: 5'-CTGTGGAA-3'
Sec. nº 135: 5'-TTGTGGAA-3'

45 Se realizaron diez puntos repetidos, aproximadamente de 1 nl cada punto, por cada oligonucleótido desde cada uno de los 6 lápices sobre cada uno de los 36 portaobjetos.

Sondas: (LNA monómeros en negrita):

50 *ADN*

Sonda nº 1: 5'-Cy3-TTCCACAC-3'
Sonda nº 2: 5'-Cy3-GTCCACAC-3'
Sonda nº 3: 5'-Cy3-ATCCACAC-3'
55 Sonda nº 4: 5'-Cy3-CTCCACAC-3'
Sonda nº 5: 5'-Cy3-TTCCACAT-3'
Sonda nº 6: 5'-Cy3-TTCCACAG-3'

60 *AT LNA*

Sonda nº ATZ-1: 5'-Cy3-TTCCACAC-3'
Sonda nº ATZ-2: 5'-Cy3-GTCCACAC-3'
Sonda nº ATZ-3: 5'-Cy3-ATCCACAC-3'
65 Sonda nº ATZ-4: 5'-Cy3-CTCCACAC-3'
Sonda nº ATZ-5: 5'-Cy3-TTCCACAT-3'
Sonda nº ATZ-6: 5'-Cy3-TTCCACAG-3'

ES 2 242 291 T3

LNA todos

Sonda nº AIIZ-1: 5'-Cy3-**TTCCACAC**-3'
Sonda nº AIIZ-2: 5'-Cy3-**GTCCACAC**-3'
5 Sonda nº AIIZ-3: 5'-Cy3-**ATCCACAC**-3'
Sonda nº AIIZ-4: 5'-Cy3-**CTCCACAC**-3'
Sonda nº AIIZ-5: 5'-Cy3-**TTCCACAT**-3'
10 Sonda nº AIIZ-6: 5'-Cy3-**TTCCACAG**-3'

Las sondas con monómeros LNA se prefijan con ATZ- o AIIZ- como parte del número de la secuencia. Los monómeros de LNA específicos se indican en cursiva para los oligos de LNA.

15 *Portaobjetos y condiciones para la hibridación:* Cada secuencia de sonda se hibridó sobre un portaobjetos diferente, y las concentraciones de todas las sondas fueron 1 fmol/ μ l. Cada sonda se diluyó en tampón de hibridación (5 \times SSC, 7% de sodio lauril sarcosina), del cual se pipetearon 30 μ l a lo largo de la longitud de cada portaobjetos, éstos se cubrieron con un cubreobjetos, y se colocaron dentro de una caja de plástico, encima de un inserto de plástico que reposaba sobre una toalla de papel empapada con agua. Las cajas se recubrieron con papel de aluminio para mantener la luz fuera, y se incubaron a temperatura ambiente durante la noche.

20 *Lavado de los portaobjetos:* Se retiraron los cubreobjetos y los portaobjetos se insertaron en rejillas (9 portaobjetos por rejilla) que se colocaron en cubetas de vidrio para portaobjetos, envueltas en papel de aluminio. Todos los portaobjetos se lavaron en 5 \times SSC durante 2 \times 5 min. a RT. Después de lavados, los portaobjetos se secaron con chorro de aire y se escanearon. La fluorescencia se visualizó sobre un escáner de portaobjetos y los datos se analizaron a partir del programa ImageQuant (Molecular Dynamics).

25 *Conclusiones:* Tal como se muestra en las Figuras 15A, 15B y 15C, la intensidad promedio de la hibridación del ADN a temperatura ambiente fue aproximadamente un 10% de la intensidad conseguida con los oligos modificados con LNA AT o todos con LNA. No se observaron sobre los S portaobjetos hibridados con las sonda 5 y 6. Estas condiciones fueron por tanto no óptimas para las sondas de ADN. Sin embargo, la discriminación emparejamiento/desemparejamiento es muy buena con las sustituciones con nucleósidos LNA en las bases A y T. La rigurosidad para los oligos todo LNA podría no ser lo bastante elevada puesto que la discriminación emparejamiento/desemparejamiento no fue tan buena como para los oligos LNA AT.

30 Los oligos con modificaciones LNA funcionaron muy bien, y los emparejamientos que fueron los más difíciles de discriminar fueron:

Sonda 1 con la diana 135 = desemparejamiento CT

40 Sonda 2 con la diana 131 = desemparejamiento GT

Sonda 3 con la diana 15 = desemparejamiento AA

45 Sonda 4 con la diana 131 = desemparejamiento CT

Sonda 5 con la diana 135 = desemparejamiento TT

Sonda 6 con la diana 135 = desemparejamiento GT

50 Sonda 6 con la diana 133 = desemparejamiento GA

Los oligos LNA AT tienen una buena discriminación en donde estas intensidades de puntos de desemparejamiento fueron típicamente como mucho el 50% de la intensidad de los puntos de emparejamiento. Para estos desemparejamientos, los oligos todo LNA proporcionaron intensidades de punto de desemparejamiento aproximadamente del 50 al 70% de la intensidad del punto de emparejamiento. En conjunto, las modificaciones de LNA permiten el uso de temperaturas más elevadas para las 1 hibridaciones y lavados, y los emparejamientos final pueden ser discriminados. Estos resultados son al menos tan buenos como los de las sondas de AND hibridadas a 4°C (ver Ejemplo 151).

Ejemplo 153

60 *Uso of [$\alpha^{33}P$]ddNTP y polimerasa de ADN ThermoSequenase™ para secuenciar plantillas de ADN que contienen monómeros de LNA T*

65 Se prepararon reacción de secuenciación de terminador marcado radiactivamente con objeto de ensayar la capacidad del monómero de LNA T para ser aceptado como una plantilla por las polimerasas de ADN. El cebador de 15-meros (secuencia: 5'-TGC ATG TGC TGG AGA-3') se usó para cebar las siguientes secuencias de oligonucleótidos cortas (monómero de LNA en negrita):

ES 2 242 291 T3

Plantilla 1 3'-**ACG TAC ACG ACC TCT** ACC TTG CTA-5'

Plantilla TZ1 3'-**ACG TAC ACG ACC TCT** ACC TTG CTA-5'

Se prepararon las siguientes mezclas de reacción:

Mezcla de la plantilla 1:	
2 μ l	×16 Tampón de ThermoSequenase
6 μ l	Cebador 2 pmole/ μ l
6 μ l	Plantilla 1 1 pmole/ μ l
4 μ l	Agua
2 μ l	Polimerasa de ADN ThermoSequenase (4 U/ μ l)
20 μ l	Volumen total

Mezcla de la plantilla TZ1:	
2 μ l	×16 Tampón de ThermoSequenase
6 μ l	Cebador 2 pmole/ μ l
6 μ l	Plantilla TZ1 1 pmole/ μ l
4 μ l	Agua
2 μ l	Polimerasa de ADN ThermoSequenase (4 U/ μ l)
20 μ l	Volumen total

Se añadieron 2 μ l de la mezcla de nucleótidos (7,5 μ M de cada dNTP) a cada uno de 8 tubos Eppendorf. Se añadieron 0,5 μ l [α^{33} P] ddATP a los tubos 1 y 5. Se añadieron 0,5 μ l [α^{33} P] ddCTP a los tubos 2 y 6. Se añadieron 0,5 μ l [α^{33} P] ddGTP a los tubos 3 y 7. Se añadieron 0,5 μ l [α^{33} P] ddTTP a los tubos 4 y 8. Se añadieron 4,5 μ l de mezcla de la plantilla 1 a cada uno de los tubos 1-4. Se añadieron 4,5 μ l de mezcla de la plantilla TZ1 a cada uno de los tubos 5-8. Todas las reacciones se incubaron a 60°C durante 3 min. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 4 μ l de solución de detención de formamida/EDTA. Las reacciones se calentaron hasta 95°C durante 3 min antes de cargarlas en un gel de poliacrilamida al 19% y urea 7 M. Se gel se fijó en ácido acético al 10%, metanol al 10% antes de transferirlo a papel 3MM paper y secarlo. El gel seco se expuso a película de autoradiografía Kodak Biomax.

Los resultados se ilustran en la Figura 18 (carriles 1-4) y Figura 19 (5-8). Las pistas corresponden a las siguientes reacciones: (Figura 18): Carril 1, pista del ddATP. Carril 2, pista del ddCTP. Carril 3, pista del ddGTP. Carril 4, pista del ddTTP. Carril 5, oligos marcadores de 8-32 bases; Figura 19: Carril A, oligos marcadores de 8-32 bases. Carril 5, pista del ddATP. Carril 6, pista del ddCTP. Carril 7, pista del ddGTP. Carril 8, pista del ddTTP.

Como es evidente a partir de las Figuras 18 y 19, la secuencia completa de ambas plantillas puede leerse fácilmente a partir de la autoradiografía. La secuencia es 5'-TGG AAC GTA-3' que corresponde a la plantilla con secuencia 3'-ACC TTG CTA-5'. Esto muestra que un único monómero LNA T puede actuar como una plantilla para las polimerasas de ADN. El monómero LNA T es específicamente copiado con "T", incorporándose ddATP.

Therapeutic Applications

Ejemplo 154

Los oligos modificados con LNA pueden transferirse al interior de células. Experimento con oligos de LNA marcados radiactivamente

10 pmol de un oligodesoxinucleótido (ODN) (ODN#10: 5'-TTA ACG TAG GTG CTG GAC TTG TCG CTG TTG TAC TT-3', un 35-mero complementario a la Catepsina D humana) y 10 pmoles de dos oligos de LNA: AL16 (5'-d(TGT GTG AAA TTG TTA T)-3', nucleósidos LNA en negrita) y AL17 (5'-d(ATA AAG TGT AAA G)-3', nucleósidos LNA en negrita) se mezclaron con quinasa de polinucleótidos de T4 (10 unidades, BRL n° cat. 510-8004SA), 5 μ l de gamma-³²P-ATP 5000 Ci/mmol, 10 uCi/ μ l (Amersham) en tampón quinasa (Tris/HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, EDTA 0,1 mM). Las muestras se incubaron durante 45 min a 37°C y a continuación se calentaron hasta 68°C durante 10 min, y entonces se pasaron a +0°C. Los nucleótidos no incorporados se retiraron mediante pasaje sobre columnas Chroma Spin TE-10 (Clontech n° cat. K1320-1). Los rendimientos fueron 5×10⁵ cpm/ μ l, 2×10⁵ cpm/ μ l y 0,8×10⁵ cpm/ μ l respectivamente para ODN#10, AL16 y AL17. Se cultivaron células de cáncer de mama humano MCF-7, obtenidas originalmente del Human Cell Culture Bank (Mason Research Institute, Rockville), en medio de cultivo DME/F12 (1:1) suplementado con un 1% suero bovino fetal inactivado con calor (Gibco BRL), 6 ng/ml de insulina bovina (Novo) y glutamax 2,5 mM (Life Technologies) en frascos de cultivo de células de 25 cm² (Nunc),

ES 2 242 291 T3

NUNC) y se incubaron en un incubador humidificado a 37°C, 5% de CO₂, 20% de O₂, 75% de N₂. Las células MCF-7 estaban aproximadamente un 40% confluentes en el momento del experimento. Una pequeña cantidad (menos de 0,1 pmol) de los oligos “quinasados” se mezclaron con 1,5 µg de plásmido pEGFP-NI (Clontech n° cat. 60851) y se mezclaron con 100 µl de agente de transfección FuGENE6 diluido (Boehringer Mannheim n° cat 1.814.443), dilución: 5 µl FuGENE6 en 95 µl de medio de cultivo DME/F12 sin suero. La mezcla FuGENE6/ADN/oligo se añadió directamente al medio de cultivo (5 ml) de células MCF-7 con crecimiento adherente, y se incubó con las células durante 18 horas, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Se prepararon tres tipos de experimentos. 1) ODN#10 + pEGFP-NI; 2) AL16 + pEGFP-NI; 3) AL17 + pEGFP-NI. La captación celular del material ADN/LNA se estudió retirando el medio que contenía la mezcla FuGENE6/ADN/oligo (se transfirió una alícuota a un vial de contador de centelleo). Se lavaron las células una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se añadió medio de cultivo nuevo, y se inspeccionaron las células mediante microscopia de fluorescencia. Aproximadamente el 30% de las células transfectadas contenían material fluorescente verde, indicando que aproximadamente el 30% de las células habían captado el plásmido pEGFP-NI y expresado la proteína fluorescente verde codificada por este plásmido. A continuación de la microscopia de fluorescencia, las células MCF-7 adherentes se retiraron de los frascos de cultivo. En resumen, se retiró el medio de cultivo, a continuación se lavaron las células con una solución de tripsina al 0,25% (Gibco BRL) y EDTA 1 mM en PBS (sin Mg²⁺ ni Ca²⁺), se añadió 1 ml de tripsina/EDTA, y se incubaron las células 10 min a 37°C. Durante la incubación las células se soltaron y se resuspendieron fácilmente, y se transfirieron a viales de contador de centelleo. A continuación se disolvieron completamente las células mediante la adición de 10 ml del coctel de centelleo Optifluor (Packard n° cat. 6013199), y los viales se contaron en un contador de centelleo Wallac 1409. Los resultados fueron como sigue: 1) ODN#10 + pEGFP-NI: aproximadamente el 1,4% de la radiactividad añadida estaba asociada con el material celular; 2) AL16 + pEGFP-NI: aproximadamente el 0,8% de la radiactividad añadida estaba asociada con el material celular; y 3) AL17 + pEGFP-NI: aproximadamente el 0,4% de la radiactividad añadida estaba asociada con el material celular. Concluimos que 0,4×0,8% de los oligos de LNA añadidos fueron captados por las células.

Ejemplo 155

El LNA es suministrado eficientemente a células de cáncer de mama MCF-7 humanas vivas

Para incrementar la eficiencia de la captación del LNA por parte de células MCF-7 humanas se ensayaron diferentes agentes de transfección con varias concentraciones de LNA y ADN marcados con 5'FITC. Se ensayaron los oligonucleótidos descritos en la tabla siguiente.

TABLA

Oligonucleótidos ensayados

Nombre	Secuencia (monómeros de LNA Características en negrita)	
AL16	5'-TGT GTG AAA TTG TTA T-3'	LNA, enzim. marcado con FITC
AL17	5'-ATA AAG TGT AAA G-3'	LNA, enzym. marcado con FITC
EO3009-O1	5'-TGC CTG CAG GTC GAC T-3'	LNA, marcado con FITC
EO3008-O1	5'-TGC CTG CAG GTC GAC T-3'	ADN, marcado con FITC

AL16 y AL17 se marcaron enzimáticamente con FITC tal como se describió en el Ejemplo 128. EQ3009-01 y EQ3008-01 se marcaron con FITC mediante química en fase sólida estándar. Se ensayaron tres agentes de transfección: FuGENE-6 (Boehringer Mannheim, n° cat. 1.814.443), SuperFect (Quiagen, n° cat. 301305) y Lipofectin (GibcoBRL, n° cat. 18292-011). Las células de cáncer de mama MCF-7 humanas se cultivaron como se describió previamente (Ejemplo 154). Tres días antes de los experimentos, se sembraron las células con una densidad de aproximadamente 0,8×10⁴ células por cm². Dependiendo del tipo de experimento, las células MCF-7 se sembraron en frascos T25 estándares (Nunc, LifeTechnologies, n° cat. 163371A), multiplacas de 24 pocillos (Nunc, LifeTechnologies, n° cat. 143982A) o frascos portaobjetos (Nunc, LifeTechnologies, n° cat. 170920A). Los experimentos se realizaron cuando las células eran un 30-40% confluentes. La captación celular del LNA y ADN se estudió en condiciones libres de suero, es decir, se retiró el medio DME/F12 normal que contenía suero y se reemplazó con DME/F12 sin suero antes de añadir la mezcla de transfección a las células. En estas condiciones, SuperFect se mostró tóxico para las células MCF-7 cells. Las mezclas de transfección consistentes en SuperFect y, bien plásmido de ADN (pEGFP-NI, Clontech, n° cat. 6085-1), oligo de ADN o oligo de LNA fue igualmente tóxica para las células MCF-7 cells. Al contrario que el SuperFect, FuGene6 y Lipofectin funcionaron bien con el plásmido de ADN (pEGFP-NI). Sin embargo, sólo Lipofectin fue capaz de suministrar eficientemente los oligonucleótidos a las MCF-7 vivas. En resumen, el suministro eficiente de LNA y ADN marcados con FITC a células MCF-7 se obtuvo cultivando las células en DME/F12 con un 1% de FCS hasta aproximadamente el 40% de confluencia. A continuación se diluyó el reactivo Lipofectin 40× en medio DME/F12 sin suero y se combinó con el oligo hasta una concentración de 750 nM de oligo. Se dejó formar el complejo

oligo-Lipofectin durante 15 min a RT, y se diluyó adicionalmente con medio sin suero hasta una concentración final de 250 nM de oligo, 0,8 $\mu\text{g/ml}$ Lipofectin. Entonces, se retiró el medio de las células, y se reemplazó con medio que contenía el complejo oligo-Lipofectin. Las células se incubaron a 37°C durante 6 hours, se lavaron una vez con medio DME/F12 sin suero, y se incubaron durante 18 horas adicionales en DME/F12 con 1% de FCS a 37°C. El resultado del experimento se evaluó, bien directamente sobre células vivas en frascos de cultivo, o en multiplacas de 24 pocillos, o en células cultivadas en frascos portaobjetos y fijadas con PFA al 4% enfriado en hielo. En todos los casos se usó un microscopio de fluorescencia Leica DMRB equipado con una cámara CCD de alta resolución. El resultado con células vivas se muestra en la Figura 16, y el resultado con células cultivadas y fijadas en frascos portaobjetos se muestra en la Figura 17. Ambas, las células en las Figuras 16 y 17 se transfectaron con la molécula LNA AL16 marcada con FITC. Contando el número total de células y las células fluorescentes verdes en varios campos, observamos que el LNA AL16 marcado con FITC se había transfectado en aproximadamente el 35% de la célula MCF-7. De forma importante, vimos que el LNA estaba predominantemente localizado en el núcleo de las células (Figura 17). Esto es digno de mención, puesto que la captación nuclear de oligos fluorescentes se correlaciona con su actividad antisentido (Stein C.A. *et al.*. (1997) "Making sense of antisense: A debate". en *HMS Beagle: A BioMedNet Publication* (<http://hmsbeagle.com/06/cutedge/overwiev.htm>)).

El incremento de la cantidad de oligo y Lipofectin hasta una concentración final de 1250 nM de oligo y 4 $\mu\text{g/ml}$ Lipofectin sólo incrementó marginalmente el porcentaje de células fluorescentes verdes. El incremento aún más de la concentración fue tóxico para las células. Se obtuvieron resultados similares con los otros LNA, y los oligos de ADN marcados con FITC (ver la tabla anterior). Concluimos que: 1) el LNA puede suministrarse eficientemente a células de cáncer de mama MCF-7 vivas mediante transfección mediada por Lipofectin. 2) Una fracción consistente de células, 30% o más de las células, es transfectada usando una concentración final de 250 nM de LNA, 0,8 μg de Lipofectin por ml de medio de cultivo sin suero. Incrementar las concentraciones de LNA y Lipofectin hasta 5 veces sólo incrementó marginalmente el rendimiento de la transfección. 3) El procedimiento transfectó el LNA al núcleo de las células, los cual, de acuerdo con la literatura, es una buena indicación de que tales LNA transfectados podrían presentar efectos antisentido sobre las células.

Ejemplo 156

Los oligos modificados con LNA pueden transferirse a células. Experimentos con oligos de LNA marcados con fluoresceína

Dos oligos de LNA: AL16 (5'-**TGT GTG AAA TTG TTA** T-3', nucleósidos LNA en negrita) y AL17 (5'-**ATA AAG TGT AAA** G-3', nucleósidos LNA en negrita) se marcaron con fluoresceína como se describió en el Ejemplo 128. Se cultivaron células de cáncer de mama humanas MCF-7 como se describió en el Ejemplo 154. Se prepararon tres tipos de experimentos. 1) aproximadamente 1,5 μg de AL16 marcado con FITC; 2) aproximadamente 1,5 μg de AL17 marcado con FITC; y 3) aproximadamente 0,75 μg de AL16 marcado con FITC y 0,75 μg de plásmido pRS β gal (un plásmido que expresa el enzima β -galactosidasa codificado por el gen lac Z bacteriano, Tulchinsky *et al.*, *PNAS*, 89:9146-9150 (1992)). Los dos oligos de LNA y la mezcla de LNA-plásmido se mezclaron con FuGENE6 y se añadieron a células MCF-7 tal como se describió en el Ejemplo 154. Después de una incubación durante 18 horas, se evaluó la captación celular de los oligos de LNA mediante microscopia de fluorescencia de los cultivos celulares. Una parte de las células tratadas contenía material fluorescente verde (ver Figura 16), indicando que las célula captan el LNA marcado con fluoresceína. El AL16 marcado con fluoresceína parecía superior al AL17 marcado con fluoresceína respecto a esto. Después de la microscopia de fluorescencia, se retiró el medio de cultivo de las células tratadas con ambos, AL16 marcado con fluoresceína y pRSV β gal. Se lavaron las células una vez con PBS, se fijaron en 2% (v/v) formaldehído, 0,2% (v/v) glutaraldehído a 4°C durante 5 min, y las células que contenían β -galactosidasa se tiñeron de azul con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosil) el cual se vuelve de incoloro en azul en presencia de actividad β -galactosidasa. La tinción X-gal mostró que el pRSV β gal efectivamente había sido transferido al interior de las células. Concluimos que los oligos de LNA y fluoresceína fueron captados por las células.

Ejemplo 157

Los oligos modificados con LNA son relativamente estables en condiciones de cultivo celular

A continuación de la microscopia de fluorescencia tal como se describe en el Ejemplo 156, las células tratadas sólo con el LNA AL16 marcado con fluoresceína se dejaron incubar durante un período adicional de 3 días. Durante este período de tiempo el número de células fluorescentes verdes apareció inalterado. Concluimos que los oligos de LNA marcados con fluoresceína tienen una buena estabilidad en las condiciones que predominan en los cultivos de células.

Ejemplo 158

Bloqueo mediante Ácidos Nucleicos Cerrados (LNA) Antisentido de la antinocepción inducida por [D-Ala2]Deltorfina en el ensayo "Warm Water Tail Flick" en ratas conscientes

Se implantaron ratas macho Sprague-Dawley (300 g) con un catéter de polietileno intratecal (i.th.) y se dejaron recuperar durante al menos 5 días antes de empezar con las inyecciones (incluyendo los controles). Los compuestos LNA antisentido (12,5 y 2,5 μg por inyección) se administraron en un volumen de 5 μl dos veces al día (08,00

y 17,00 h) durante 3 días. No se pudieron observar signos de efectos no específicos o de toxicidad, tales como los mostrados por el comportamiento locomotor y las mediciones de peso corporal. El día siguiente a la última inyección, se inyectaron las ratas con [D-Ala²]deltorfina (60 µg, i.th.) y se ensayaron en el ensayo de retirada rápida en agua templada (52°C) en busca de antinocicepción mediata por receptor δ opioide. Los datos se presentan en la Figura 14 como medianas basadas en 6-8 animales por grupo (datos convertidos a porcentaje de la respuesta máxima posible, % MPE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de 1-vía de Kruskal-Wallis por rangos, seguido por comparaciones de tratamientos versus control. Tal como se muestra en la Figura 14, la deltorfina produjo un robusto efecto antinociceptivo en Iso controles tratados con solución salina. Esta respuesta fue estadísticamente significativamente suprimida en ambos grupos de LNA antisentido (12,5 y 2,5 µg) en comparación con los controles tratados con solución salina.

Soportes sólidos con LNA

Ejemplo 159

Procedimiento general para los succinatos de nucleósidos DMT-LNA

Se disolvieron nucleósido LNA protegido en la base con DMT y anhídrido succínico (1,5 equivalentes) en dicloruro de etileno anhidro (~10 ml/g de nucleósido). A la mezcla se le añadió trietilamina (2 equivalentes), y se agitó la mezcla a temperatura ambiente. La reacción se siguió mediante HPLC (las mismas condiciones que para la tritilación). Una vez completada la reacción (>95%), se concentró la mezcla de reacción, y co-evaporó con dicloruro de etileno y acetonitrilo, y se secó con vacío para retirar la trietilamina. El residuo se disolvió en dicloruro de etileno o acetato de etilo (~100 ml/g nucleósido de partida), se lavó con ácido cítrico al 10% frío (3×80 ml/g) y agua fría (3×80 ml/g). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y concentró con o sin la adición de 1-2 equivalentes de trietilamina. El sólido residual se co-evaporó con acetonitrilo anhidro (2-3×) y se secó con vacío para rendir el producto puro como un sólido blanco.

Procedimiento general para soportes de nucleósido LNA

Se tomaron el succinato de LNA protegido en la base con DMT (ácido libre o sal de trietilamonio, 65 micromoles/g de soporte), el soporte derivatizado con amino (Primer SupportTM 30HL, 160 micromoles de grupos amino/g de soporte), DMAP (3 mg/g de soporte) y 1-(3-[dimetilamino]propil)-3-tilcarbodimida hidrocloreto (80 mg/g de soporte) en piridina anhidra (6 ml/g de soporte). A esta mezcla, se le añadió trietilamina (16 microlitros/g de soporte) y la mezcla se mantuvo en un agitador a 150 rpm durante la noche. Se filtró el soporte, se lavó con metanol (3×10 ml/g de soporte) y diclorometano (3×10 ml/g de soporte). Después de secarlo al aire, se secó el soporte con vacío durante 0,5 h. A esto se le añadieron DMAP al 6% en acetonitrilo anhidro (Cap A, ~3 ml/g de soporte) y una mezcla de 20% de anhídrido acético/30% de 2,4,6-colidina/50% acetonitrilo (Cap B, ~3 ml/g de soporte). La mezcla se mantuvo con agitación durante 5 h. Se filtró el soporte, se lavó con diclorometano anhidro (2×10 ml/g de soporte) y se secó como más arriba. Se resuspendió en una mezcla de Cap A y Cap B (volumen total 6 ml/g de soporte) y se mantuvo en agitación durante la noche. Se filtró el soporte, se lavó con metanol (6×10 ml/g de soporte), diclorometano (3×10 ml/g de soporte) y se secó en aire. Se secó adicionalmente con vacío durante 5-6 h. La carga se determinó mediante el ensayo del dimetoxitritilo y se halló que era aproximadamente de 40 µmol/g.

Ejemplo 160

Síntesis del ADNc de la primera hebra usando cebadores Poli-dT que contienen monómeros LNA T

Se prepararon las reacciones con objeto de ensayar la capacidad de los cebadores poli-dT que contenían residuos LNA T residuos para cebar la síntesis del ADNc de la 1^a hebra. Se ensayaron los siguientes cebadores poli-dT (los monómeros LNA están en negrita):

RTZ1 5'-TTT TTT **TTT** TTT TT-3'

RTZ2 5'-TTT TTT TTT TTT TT-3'

RTZ3 5'-TTT TTT **TTT** TTT TT-3'

RTZ4 5'-TTT TTT TTT TTT TT-3'

RTZ5 5'-**TTT** **TTT** **TTT** T-3'

Como control se usó cebador poli-dT anclado procedente del equipo de marcaje *RPK0140 Kit Cy Dye cADN* (Amersham Pharmacia Biotech).

ES 2 242 291 T3

Las reacciones se prepararon como sigue para cada uno de los anteriores cebadores:

5	1 μ l	ARNm de Arabidopsis 0,5 μ g/ μ l
	2 μ l	cebador poli-dT 8 pmoles/ μ l
	4 μ l	\times 5 tampón de Transcriptasa Inversa AMV
	1 μ l	Agua
10	8 μ l	Volumen total

15 A continuación se calentó esta mezcla hasta 75°C durante 3 min y entonces se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante al menos 10 min.

A continuación se añadió los siguiente a cada una de las reacciones:

20	1 μ l	80 mM Pirofosfato sódico
	1 μ l	Human Inhibidor de la Ribonuclease Placentario Humano 20 U/ μ l
	7 μ l	0,5 mM solución de Dntp
	2 μ l	[α - ³³ P] dATP 10 mCi/ml 3000 Ci/mmol
25	1 μ l	Transcriptasa Inversa AMV 20 U/ μ l
	20 μ l	Volumen total

30 Las reacciones se incubaron a 42°C durante 2 horas. Las reacciones se calentaron entonces hasta 95°C durante 3 min antes de cargarlas sobre un gel de poliacrilamida al 6% y urea 7M. Se fijó el gel en 10% ácido acético/10% metanol antes de transferirlo a papel 3MM paper y secarlo. El gel seco se expuso a película de autoradiografía Kodak Biomax durante la noche.

35 La autoradiografía mostró claramente que los oligonucleótidos cebadores RTZ1-4 que contenían LNA eran capaces de cebar eficientemente la síntesis de ADNc. La cantidad y intensidad de los productos de ADNc producidos en estas reacciones fue igual a la producida con el oligonucleótido de control poli-dT anclado. El RTZ 5 también produjo algo de ADNc, pero el rendimiento fue significativamente inferior al producido con el oligo cebador de control.

40 Ejemplo 161

Los oligonucleótidos modificados con LNA unidos covalentemente a cuentas de Sepharose funcionan eficientemente en la captura específica para secuencia de moléculas de ARN. Se sintetizaron tres oligos químicamente (Amy Mueller) para su evaluación en la unión de poli(rA).

NH ₂ (T8) -T	Control
NH ₂ (T15)-T	Control
NH ₂ (LNA-T8)-T	Ensayo

50 200 nmol de cada oligo se acoplaron a 50 mg de Sepharose activada con CNBr 4B (Pharmacia) preparada según el librito de instrucciones. Los sitios de unión sin reaccionar de la resina se bloquearon con Tris 100 nM, pH 8,0.

55

Tabla de datos de unión de oligos				
Pasos	oligo T9 unidades	oligo T16 unidades	oligo T9 LNA unidades	Control sin oligo
	A ₂₆₀	A ₂₆₀	A ₂₆₀	

60

65

ES 2 242 291 T3

Tabla de datos de unión de oligos					
5	Oligo reaccionado	14,7 (200 nM)	26,0 (200 nM)	14,7 (200 nM)	0
10	Oligo no unido	5,50	10,43	4,20	-
15	Oligo unido	9,20	15,57	10,50	-
20	% Unido	62,60%	59,90%	71,40%	-

Las resinas unidas a oligo se dividieron en dos porciones (~25 mg de resina cada una) para realizar el análisis de unión a poli(rA) por duplicado. Poli(rA) Pharmacia #27-4110-01 (disuelto a 28,2 unidades A_{260} /ml en tampón de unión) se usó para la unión. Se unieron cinco (5) unidades A_{260} a porciones por duplicado de 25 mg de cada resina unida a oligo por SOP QC 5543. El poli(rA) no unido de "ruptura" se cuantificó mediante absorbancia a A_{260} y se usó para calcular el unido. El destino del poli(rA) unido se siguió a través del lavado con tampón bajo en sales y varias eluciones. Tal como se muestra en la Tabla 10, ambas, las cuentas recubiertas con ADN y con LNA funcionan eficientemente en la captura de moléculas diana poli(rA). No obstante, las cuentas recubiertas con LNA se unen a la diana poli(rA) mucho más intensamente que las cuentas recubiertas con ADN, tal como se evidencia por los perfiles de elución de poli(rA) de las diferentes cuentas. Concluimos que 1) un oligo T9 de LNA es eficiente en la captura de moléculas de ARN que contienen una tirada de residuos A, y 2) que las moléculas de ARN capturadas se unen mucho más intensamente a las cuentas de oligo LNA T9 que a las cuentas control de oligo ADN T9 y ADN T16.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla **1**
Monómero **Z**

Oligo	Diana	T _m No.	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /Na ₂ C/EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /TMAC
5'-d(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	1		28	42
	5'-d(GCATTTCAC)-3'	2		12	31
	5'-d(GCATGTCAC)-3'	3		19	23
	5'-d(GCATCTCAC)-3'	4		11	30
	5'-d(GCATAACAC)-3'	5		12	
	5'-d(GCATAGCAC)-3'	6		<10	
	5'-d(GCATAACCAC)-3'	7		<10	
	5'-(GCAUAUCAC)-3'	8		28	
	5'-(GCAUCUCAC)-3'	9		10	
5'-d(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	10		44	56
	5'-d(GCATTTCAC)-3'	11		27	43
	5'-d(GCATGTCAC)-3'	12		30	43
	5'-d(GCATCTCAC)-3'	13		23	38
	5'-d(GCATAACAC)-3'	14		28	
	5'-d(GCATAGCAC)-3'	15		28	
	5'-d(GCATACCAC)-3'	15A		29	
	5'-(GCAUAUCAC)-3'	16		50	
	5'-(GCAUCUCAC)-3'	17		33	

Table 1 (cont.)

Oligo	Diana	T _m No.	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /NaCl/EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /TMAC
5'-d(GTGAGATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	18		26	39
	5'-d(GCATTTCAC)-3'	19		33	44
	5'-d(GCATGTCAC)-3'	20		28	38
	5'-d(GCATCTCAC)-3'	21		49	57
	5'-d(GCATAACAC)-3'	22		<15	
	5'-d(GCATAGCAC)-3'	23		<15	
	5'-d(GCATACCAC)-3'	24		<15	
	5'-(GCAUAUCAC)-3'	24A		34	
	5'-(GCAUCUCAC)-3'	24B		59	
	5'-d(GTGAUATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	25		44
5'-d(GCATTTCAC)-3'		26		25	44
5'-d(GCATGTCAC)-3'		27		32	43
5'-d(GCATCTCAC)-3'		28		24	37
5'-d(GCATAACAC)-3'		29		27	
5'-d(GCATAGCAC)-3'		30		28	
5'-d(GCATACCAC)-3'		31		20	
5'-d(GCATATCAC)-3'		32		17	34
5'-d(GCATTTCAC)-3'		33		16	30
5'-d(GCATGTCAC)-3'		34		15	28
5'-d(GTGAGATGC)-3'	5'-d(GCATCTCAC)-3'	35		33	44
	5'-d(GCATAACAC)-3'	36		9.0	
	5'-d(GCATAGCAC)-3'	37		<5	
	5'-d(GCATACCAC)-3'	38		<5	
	5'-(GCAUCUCAC)-3'	38A		33	

Tabla 1 (cont.)

Oligo	Dilana	T _m No.	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /NaCl/EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /TMAC
5'-d(GGTGGTTTGGTTG)-3'		39	31	47	55
5'-d(CAAACAACCACAC)-3'		39A	32	52	
5'-d(GGTGGTTTGGTTG)-3'		40	40	57	67
5'-d(CAAACAACCACAC)-3'		40A	50	70	
d(GGTGGTTTGGTTG)-3'		41	67	83	>90
5'-d(CAAACAACCACAC)-3'		41A	85	>93	
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'		42		36	
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'		43		32	
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'		44		36	
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'		45		32	
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'		46		34	
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'		47		40	

Tabla 1 (cont.)

Oligo	Diana	T _m No.	T _m (°C) Nb ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Nb ₂ HPO ₄ /NaCl/EDTA	T _m (°C) Nb ₂ HPO ₄ /TMAC
5'-d(TTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAA)-3'		48			
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'		49		42	52
5'-d(TTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAA)-3'		50		47	
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'		51		53	
5'-d(TTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAA)-3'		52		80	
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'		53		70	
5'-d(AAAACA)-3'		54		63	
5'-d(AAAGAA)-3'		55		55	
5'-d(AAATAA)-3'		56		65	
5'-d(GTGAAATGC)-3'					
5'-d(GCATAATC)-3'		57		26	
5'-d(GCATTTC)-3'		58		45	
5'-d(GCATGTC)-3'		59		23	
5'-d(GCATCTC)-3'		60		25	
5'-d(GTGA ^m CAATGC)-3'		61		<15	
5'-d(GCATATC)-3'					
5'-d(GTGA ^m CAATGC)-3'		63		32	
5'-d(GCATATC)-3'		64		27	
5'-d(GCATTTC)-3'		65		53	
5'-d(GCATGTC)-3'		66		32	

Table 1 (cont.)

Oligo	Diana	T _m No.	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /NaCl/EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /TMAC
5'-d(GTGACATGC)-3'		67		32	
5'-d(GCATAATCAC)-3'		69		52	
5'-d(GCATATG ^m C)-3'		71		64	
5'-d(GCATATCAC)-3'		73		52	
5'-d(GCAATGTCAC)-3'		75		74	
5'-(GCAUAUCAC)-3'		76		60	
5'-d(CACTATACG)-3'		77		40	
5'-d(GTGTITTC)-3'		78		52	
5'-d(GCAAAACAC)-3'					

Tabla 2
Monómero V

Oligo	Diana	T _m No.	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /NaCl/EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /TMAC
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			32		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			27		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			31		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			28		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			30		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			23		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			23		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			31		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			23		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			16		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			<10		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			42		
5'-(AAAAAAAAAGAAAAAAAA)-3'			37		
5'-d(GTGATATGC)-3'					
5'-d(GCATAATCAC)-3'			26		
5'-(GCAUAUCAC)-3'			27		

Tabla 3
Número **X**

Oligo	Diana	T _m No.	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /NaCl/EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /TMAC
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			23		
5'-(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			23		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			19		
5'-(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			23		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			9		
5'-(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			15		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			5		
5'-(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			14		

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 4

Monómero **Y**

Oligo	Diana	T _m No.	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /NaCl/EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /TMAC
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			36		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			37		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			35		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			37		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			35		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			36		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			32		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			33		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			36		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			36		
5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAAAAAAAAA)-3'			58		
5'-(AAAAAAAAAAAAAAAA)-3'			58		

Tabla 4 (cont.)

Monómero Y	Oligo	Diana	T _m No.	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /NaCl/EDTA	T _m (°C) Na ₂ HPO ₄ /TMAC
	5'-d(GTGATATGC)-3'					
	5'-d(GCATATCAC)-3'			35		
	5'-(GCAUAUCAC)-3'			35		

Tabla 5

Monómero Z	Oligo	Diana	T _m No.	Y=A	Y=C	Y=T	Y=G	Temperatura de fusión (T _m /°C)
	5'-r(GTGATATGC)-3'		1	55	34	38	37	
	5'-r(GUGAUUUGC)-3'		2	27	<10	<10	<10	
	5'-r(GTGATATGC)-3'		3	63	45	.	.	
	5'-r(GUGAUUUGC)-3'		4	38	22	.	.	

Tabla 6

Monómero **Z**

Oligo	Diana	T _m No.	Temperatura de fusión (T _m °C)
5'-d(GTGATAATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	1	28
5'-d(GIGATAATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	2	44
5'-d(GTGATAATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	3	40
5'-d(GTGATAATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	4	63
5'-r(GTGATAATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	5	74
5'-(GTGATATG ^{Me} C)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	6	85

Tabla 7

Monómero **Z** (Oligonucleótidos todos fosforamotocato)

Oligo	Diana	T _m No.	Temperatura de Fusión (T _m °C)
5'-d(G ² G ³ A ² A ² T ² G ² C)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	1	21
5'-d(G ² T ² G ² A ² A ² T ² G ² C)-3'	5'-r(GCAUAUCAC)-3'	2	17
5'-d(G ² T ² G ² A ² A ² T ² G ² C)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	3	41
5'-d(G ² T ² G ² A ² A ² T ² G ² C)-3'	5'-r(GCAUAUCAC)-3'	4	47

Tabla 8
Monómero Tio-Z (U^S)

Oligo	Diana	T _m Temperatura No. de fusión	(T _m)°C
5'-d(GTGAU ^S ATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	1	34
5'-d(GTGAU ^S ATGC)-3'	5'-(GCAUAUCAC)-3'	2	36
5'-d(GU ^S GAU ^S AU ^S GC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	3	42
5'-d(GU ^S GAU ^S AU ^S GC)-3'	5'-(GCAUAUCAC)-3'	4	52
5'-d(GTGTITTC)-3'	5'-(GCAAAACAC)-3'	5	27
5'-d(GU ^S GU ^S U ^S U ^S GC)-3'	5'-d(GCAAAACAC)-3'	6	51

Tabla 9
Monómero Amino-Z

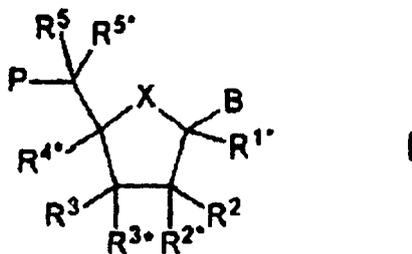
Oligo	(T ^{NB}) Metilamino-Z	Diana	(T ^{NM^S})	T _m Temperatura No. de fusión	(T _m)°C
5'-d(GTGAT ^{NB} ATGC)-3'		5'-d(GCATATCAC)-3'		1	33
5'-d(GTGAT ^{NB} ATGC)-3'		5'-(GCAUAUCAC)-3'		2	34
5'-d(GT ^{NB} GAT ^{NB} AT ^{NB} GC)-3'		5'-d(GCATATCAC)-3'		3	39
5'-d(GT ^{NB} GAT ^{NB} AT ^{NB} GC)-3'		5'-(GCAUAUCAC)-3'		4	47
5'-d(GTGAT ^{NM^S} ATGC)-3'		5'-d(GCATATCAC)-3'		5	33
5'-d(GTGAT ^{NM^S} ATGC)-3'		5'-(GCAUAUCAC)-3'		6	36
5'-d(GT ^{NM^S} GAT ^{NM^S} AT ^{NM^S} GC)-3'		5'-d(GCATATCAC)-3'		7	39
5'-d(GT ^{NM^S} GAT ^{NM^S} AT ^{NM^S} GC)-3'		5'-(GCAUAUCAC)-3'		8	49
5'-d(GT ^{NM^S} GT ^{NM^S} T ^{NM^S} T ^{NM^S} T ^{NM^S} GC)-3'		5'-d(GCAAAACAC)-3'		9	47
5'-d(GT ^{NM^S} GT ^{NM^S} T ^{NM^S} T ^{NM^S} T ^{NM^S} GC)-3'		5'-(GCAAAACAC)-3'		10	63

Tabla 10

Pasos	T9 oligo A ₂₆₀ unidades	T16 oligos A ₂₆₀ unidades	LNA T9 oligo A ₂₆₀ unidades	Control sin oligo
poly (rA) añadido	5.0/5.0	5.0/5.0	5.0/5.0	5.0/5.0
poly (rA) perdido	1.75/1.61	1.84/1.78	1.83/1.82	5.09/5.14
∴ poly (rA) unido	3.25/3.39	3.16/3.22	3.17/3.18	0.0/0.0
% poly (rA) unido	65.0%/67.8%	63.2%/64.4%	63.4%/63.6%	0.0%/0.0%
Lavado/eluido con baja sal	0.24/0.24	0.11/0.12	.053/0.55	0.14/0.13
Eluido con TE 15 min RT	2.37/2.72	0.83/0.93	0.02/0.04	0.01/0.02
Eluido con TE O.N. RT	0.38/0.37	1.76/1.69	0.11/0.07	.003/0.004
Eluido con TE 30 min 65° C	.047/0.040	0.38/0.46	1.62/1.70	.005/0.004
Eluido con 10 mM Tris pH 10	.002/0.002	0.03/0.03	0.10/0.10	0.01/0.01
Eluido con 1 mM HCl pH 4.0	0.07/0.06	0.06/0.04	0.26/0.23	0.01/0.01
Promedio A ₂₆₀ recuperado	3.20	3.14	2.18	-
Promedio % A ₂₆₀ recuperado	96.4%	98.4%	68.7%	-

REIVINDICACIONES

1. Oligómero (a partir de ahora denominado "oligonucleótido modificado con LNA") que comprende al menos un
5 análogo de nucleósido (a partir de ahora denominado "LNA") con la Formula general 1,



en donde:

20 X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R^{N*})-, -C(R⁶R^{6*})-, -O-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-O-, -S-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-S-, -N(R^{N*})-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-N(R^{N*})-, y -C(R⁶R^{6*})-C(R⁷R^{7*})-;

25 B se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido, aciloxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido, nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos;

P designa la posición del radical para un enlace internucleósidos a un monómero sucesivo, o a un grupo 5'-terminal, tal enlace internucleósidos o grupo 5'-terminal incluyendo opcionalmente el sustituyente R⁵;

30 uno de los sustituyentes R², R³, y R^{3*} es un grupo P*, el cual designa un enlace internucleósidos a un monómero precedente, o a un grupo 3'-terminal;

35 los sustituyentes R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de -O-, -S-, -N(R*)-, -(CR*R*)_{r+s+1}-, -(CR*R*)_r-, -S-(CR*R*)_s-, -(CR*R*)_r-N(R*)-(CR*R*)_s-, -O-(CR*R*)_{r+s}-O-, -S-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-O-, -O-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -S-(CR*R*)_{r+s}-S-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-, -N(R*)-(CR*R*)_{r+s}-S-, y -S-(CR*R*)_{r+s}-N(R*)-;

en donde

40 cada R* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o dialquilo C₁₋₆ amino, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y/o dos R* adyacentes (no geminales) que pueden designar juntos un doble enlace,

45 y cada uno de r y s es 0-3 con la condición de que la suma r+s sea 1-4;

50 cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R³, R^{3*}, R⁵, R^{5*}, R⁶, y R^{6*}, R⁷ y R^{7*}, los cuales están presentes y no implicados en P, P* se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C₁₋₁₂, alquenoiloxi C₂₋₁₂, carboxilo, alcoxycarbonilo C₁₋₁₂, alquilcarbonilo C₁₋₁₂, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y dialquilo C₁₋₆ amino, carbamilo, mono- y dialquilo C₁₋₆-amino-carbonilo, amino-alquilo C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y di(alquilo C₁₋₆)amino-C₁₋₆-alquil-aminocarbonilo, C₁₋₆-alquil-carbonilamino, carbamido, C₁₋₆-alcanoiloxi, sulfono, C₁₋₆-alquilsulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, en donde arilos y heteroarilos pueden estar
55 opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales pueden designar juntos oxo, tioxo, imino, o metileno opcionalmente sustituido, o juntos pueden formar un biradical spiro consistente en una cadena de alqueno de 1-5 átomos de carbono, la cual está opcionalmente interrumpida y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR^N)-, en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄, y en donde dos sustituyentes adyacentes (no geminales) pueden designar un enlace adicional que resulta en un doble enlace; y
60 R^{N*}, cuando está presente y no implicado en un biradical, se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄;

y sales básicas y sales por adición de ácido de los mismos.

65 2. Oligómero según la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende 1-10.000 LNA con la Fórmula I general y 0-10.000 nucleósidos seleccionados de entre nucleósidos que ocurren de forma natural y análogos de nucleósidos, con la condición de que la suma del número de nucleósidos y el número de LNA(s) sea al menos 2, preferiblemente al menos 3, tal como en el rango 2-15.000.

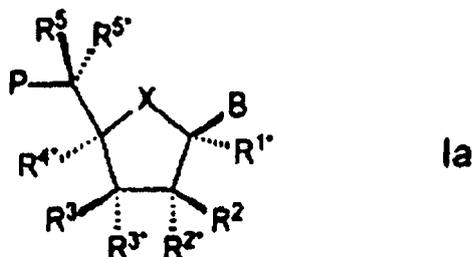
ES 2 242 291 T3

3. Oligómero según la reivindicación 3, en donde al menos un LNA comprende un nucleósido como el sustituyente B.

4. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde uno de los sustituyentes R^3 y R^{3*} designa P^* .

5. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el(los) LNA(s) tiene(n) la siguiente Fórmula Ia

10



15

20

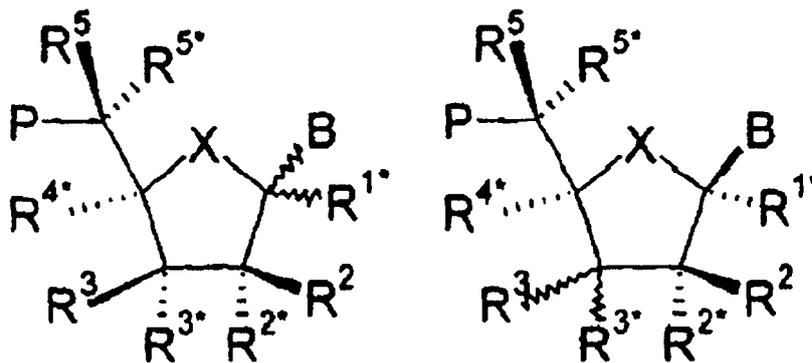
en donde P, P^* , B, X, R^{1*} , R^2 , R^{2*} , R^3 , R^{3*} , R^{4*} , R^5 y R^{5*} son como se definieron en las reivindicaciones 1-4.

25

6. Oligómero según la reivindicación 5, en donde R^* designa P^* .

7. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el(los) LNA tiene(n) las siguientes fórmulas:

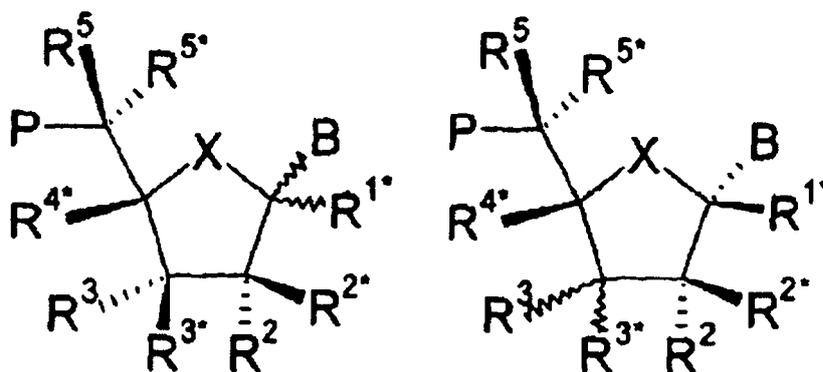
30



35

40

45



50

55

8. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde X se selecciona de entre $-(CR^6R^*)-$, $-O-$, $-S-$, y $-N(RN^*)-$.

9. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde R^{3*} designa P^* .

10. Oligómero según la reivindicación 9, en donde X es O, R^2 se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, y alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, y R^{1*} , R^3 , R^5 , y R^{5*} designan hidrógeno.

ES 2 242 291 T3

11. Oligómero según la reivindicación 10, en donde el biradical se selecciona de entre -O-, $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$ y $-(CH_2)_{0-1}-N(R)-(CH_2)_{1-3}-$.

12. Oligómero según la reivindicación 11, en donde el biradical se selecciona de entre $-S-CH_2-$ y $-N(R)-CH_2-$.

13. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde B se selecciona de entre las nucleobases.

14. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el oligómero comprende al menos un LNA en donde B se selecciona de entre adenina y guanina, y al menos un LNA en donde B se selecciona de entre timina, citosina y uracilo.

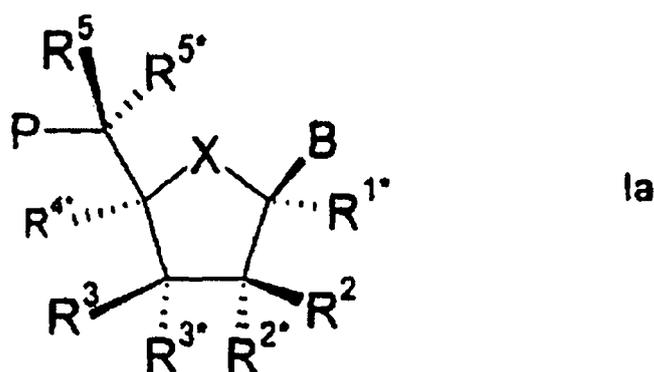
15. Oligómero según la reivindicación 10, en donde el biradical es $-(CH_2)_{2-4}-$.

16. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en donde R^* se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y cualquiera de los sustituyentes restantes R^* son hidrógeno.

17. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, en donde el grupo R^* en el biradical de al menos un LNA se selecciona de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos.

18. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, en donde el(los) LNA(s) tiene(n) la Fórmula Ia general

19. Oligómero según la reivindicación 1 con la Fórmula Ia general.



en donde:

X es -O-;

B se selecciona de entre las nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos;

P designa la posición radical para un enlace internucleósidos a un monómero sucesivo, o un grupo 5'-terminal, tal enlace internucleósidos o grupo 5'-terminal incluyendo opcionalmente el sustituyente R^5 ;

R^{3*} es un grupo P^* que designa un enlace internucleósidos a un monómero precedente, o un grupo 3'-terminal;

R^2 y R^{4*} son tal como se definieron en la reivindicación 1;

y sales básicas y sales por adición de ácido de los mismos.

20. Oligómero según la reivindicación 19, en donde un R^* se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y cualquiera de los sustituyentes restantes R^* son hidrógeno.

21. Oligómero según la reivindicación 19 o reivindicación 20, en donde el biradical se selecciona de entre -O-, $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$, $-(CH_2)_{0-1}-N(R)-(CH_2)_{1-3}-$ y $-(CH_2)_{2-4}-$.

ES 2 242 291 T3

22. Oligómero según la reivindicación 21, en donde el biradical se selecciona de entre -O-CH₂-, -S-CH₂- y -N(R)-CH₂-.

23. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en donde B se selecciona de entre las nucleobases.

24. Oligómero según la reivindicación 23, en donde el oligómero comprende al menos un LNA en donde B se selecciona de entre adenina y guanina, y al menos un LNA en donde B se selecciona de entre timina, citosina y uracilo.

25. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en donde R² se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo y alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, y R^{1*}, R³, R⁵, y R^{5*} designan hidrógeno.

26. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedente, en donde cualquier enlace internucleósidos de los LNA se selecciona de entre enlaces consistentes de 2 a 4, preferiblemente 3, grupos/átomos seleccionados de entre -CH₂-, -O-, -S-, -NR^H-, >C=O, >C=NR^H-, >C=S-, -Si(R'')₂-, -SO-, -S(O)₂-, -P(O)₂-, -P(O,S)-, -P(S)₂-, -PO(R'')-, -PO(OCH₃)-, y -PO(NHR^H)-, en donde R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄, y R'' se selecciona de entre alquilo C₁₋₆ y fenilo.

27. Oligómero según la reivindicación 26, en donde cualquier enlace internucleósidos de los LNA se selecciona de entre -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CO-CH₂-, -CH₂-CHOH-CH₂-, -O-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH=, -CH₂-CH₂-O-, -NR^H-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NR^H-, -CH₂-NRH-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -NR^H-CS-NR^H-, -NR^H-C(=NR^H)-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-CH₂-O-, -O-CH₂-CO-O-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CH=N-O-, -CH₂-NR^H-O-, -CH₂-O-N=, -CH₂-O-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-O-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-NR^H-CH₂-, -O-NR^H-, -O-CH₂-S-, -S-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-S-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH=, -S-CH₂-CH₂-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-S-CH₂-, -CH₂-SO-CH₂-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -O-SO-O-, -O-S(O)₂-O-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-NR^H-, -NR^H-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -O-P(S)₂-S-, -S-P(O)₂-S-, -S-P(O,S)-S-, -S-P(S)₂-S-, -O-PO(R'')-O-, -O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^N)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O- y -O-Si(R'')₂-O-.

28. Oligómero según la reivindicación 27, en donde cualquier enlace internucleósidos de los LNA se selecciona de entre -CH₂-CO-NRH-, -CH₂-NRH-O-, -S-CH₂-O-, -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NRH-P(O)₂-O-, -O-P(O,NRH)-O-, -O-PO(R'')-O-, -O-PO(CH₃)-O-, y -O-PO(NHR^N)-O-, en donde R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄, y R'' se selecciona de entre alquilo C₁₋₆ y fenilo.

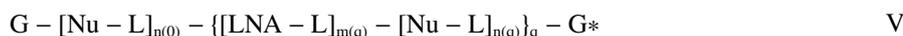
29. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R^{2*}, R³, R^{3*}, R^{4*}, R⁵, R^{5*}, R⁶, R^{6*}, R⁷, R^{7*} de los LNA, que están presentes y no implicados en P, P* o el(los) biradical(es), se selecciona independientemente de entre hidrógeno, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₆ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, alquenoiloxi C₂₋₆, carboxilo, alcoxycarbonilo C₁₋₆, alquilcarbonilo C₁₋₆, formilo, amino, mono- y di(C₁₋₆-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C₁₋₆-alquil)-amino-carbonilo, C₁₋₆-alquil-carbonilamino, carbamido, azido, C₁₋₆-alcanoiloxi, sulfono, sulfanilo, C₁₋₆-alquiltio, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y halógenos, en donde dos sustituyentes geminales juntos podrían designar oxo, y en donde R^{N*}, cuando está presente y no implicado en un biradical, se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄.

30. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde X se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R^{N*})-, y cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R³, R^{3*}, R⁵, R^{5*}, R⁶, R^{6*}, R⁷, y R^{7*} de los LNA(s), que están presentes y no implicados en P, P* o el(los) biradical(es), designa hidrógeno.

31. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde P es un grupo 5'-terminal seleccionado de entre el hidrógeno, hidroxilo, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, C₁₋₆-alquilcarboniloxi opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, y -W-A', en donde W se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R^H)- en donde R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆, y en donde A' se selecciona de entre los intercaladores del ADN, los grupos fotoquímicamente activos, los grupos termoquímicamente activos, los grupos quelantes, los grupos informadores, y los ligandos.

32. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde P es un grupo 3'-terminal seleccionado de entre el hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilcarboniloxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, y -W-A', en donde W se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R^H)- en donde R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆, y en donde A' se selecciona de entre los intercaladores del ADN, los grupos fotoquímicamente activos, los grupos termoquímicamente activos, los grupos quelantes, los grupos informadores, y los ligandos.

33. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene la siguiente Fórmula V:



en donde,

q es 1-50;

5 cada uno de $n(0)$, ..., $n(q)$ es independientemente 0-10.000;

cada uno de $m(1)$, ..., $m(q)$ es independientemente 1-10.000;

a condición de que la suma de $n(0)$, ..., $n(q)$ y $m(1)$, ..., $m(q)$ sea 2-15.000;

10

G designa un grupo 5'-terminal;

cada Nu designa independientemente un nucleósido seleccionado de entre los nucleósidos que ocurren naturalmente y los análogos de nucleósido;

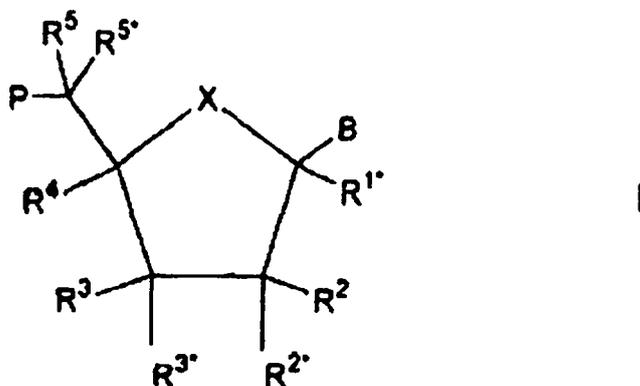
15

cada LNA designa independientemente un análogo de nucleósido;

cada L designa independientemente un enlace internucleósido entre dos grupos seleccionados de entre Nu y LNA, o L junto con G* designa un grupo 3'-terminal; y

20

cada LNA-L designa independientemente un análogo de nucleósido con la Fórmula I general



25

30

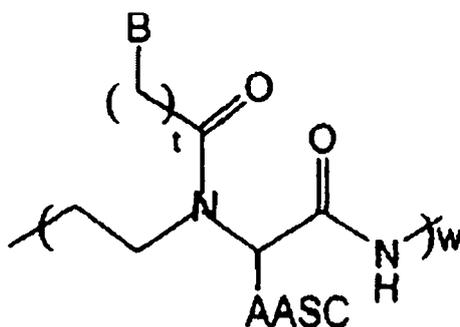
35

en donde los sustituyentes B, P, P*, R^{1*}, R², R^{2*}, R³, R^{4*}, R⁵ y R^{5*}, y X son como se definieron en las reivindicaciones 1 a 32.

40

34. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un segmento de mono- u oligómero de PNA con la fórmula,

45



50

55

en donde B es tal como se definió más arriba para la Fórmula I, AASC designa hidrógeno o una cadena lateral de aminoácido, t es 1-5, y w es 1-50.

60

35. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes:

(a) que tiene una especificidad incrementada hacia ARNss o ADNss complementarios en comparación con el oligonucleótido nativo; o

65

(b) que tiene una afinidad incrementada hacia ARNss o ADNss complementarios en comparación con el oligonucleótido nativo; o

ES 2 242 291 T3

(c) que es capaz de unirse a una secuencia diana en una molécula de ADNds o ARNds por medio del “desplazamiento de la hebra” o mediante la formación de una triple hélice; o

(d) que es más resistente a las nucleasas que el oligonucleótido nativo; o

(e) que tiene actividad catalítica del ácido nucleico (ribozimas modificados con LNA).

36. Oligómero que comprende al menos un análogo de nucleósido bi- o tricíclico que confiere al oligómero una T_m con un oligonucleótido de ADN complementario que es al menos 2,5°C superior a la del correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado, el cual no comprende ningún análogo de nucleósido.

37. Oligómero según la reivindicación 36, en donde la T_m es al menos $2,5 \times N$ °C superior, en donde N es el número de análogos de nucleósidos.

38. Oligómero que comprende al menos un análogo de nucleósido bi- o tricíclico que confiere al oligómero una T_m con un oligonucleótido de ARN complementario que es al menos 4,0°C superior a la del correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado, el cual no comprende ningún análogo de nucleósido.

39. Oligómero según la reivindicación 38, en donde la T_m es al menos $4,0 \times N$ °C superior, en donde N es el número de análogos de nucleósidos.

40. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, en donde el oligómero es según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde al menos un análogo de nucleósido tiene la Fórmula I en donde B es una nucleobase.

41. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, en donde dicho oligómero, cuando se hibrida con un oligonucleótido de ADN parcialmente complementario que tiene uno o más desemparejamientos con dicho oligómero, presenta una reducción de la T_m como resultado de dicho desemparejamiento, la cual es igual o mayor que la reducción que se observaría con el correspondiente oligonucleótido de referencia modificado, el cual no comprende ningún análogo de nucleósido.

42. Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39:

(a) que tiene sustancialmente la misma sensibilidad de la T_m hacia la fuerza fónica del tampón de hibridación que ala del correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado; o

(b) que está al menos modificado en un 30%; o

(c) que tiene una estabilidad 3'-exonucleolítica sustancialmente mayor que el correspondiente oligonucleótido de referencia no modificado.

43. Oligómero según reivindicación 1 que comprende un monómero 2'-tio-LNA correspondiente a los nucleótidos con la fórmula U^S que corresponde a la fórmula Z de la Figura 2, en donde el puente metileneoxi se ha sustituido con un puente metileneo.

44. Oligómero según la reivindicación 43 que se selecciona de entre el grupo consistente en,



y

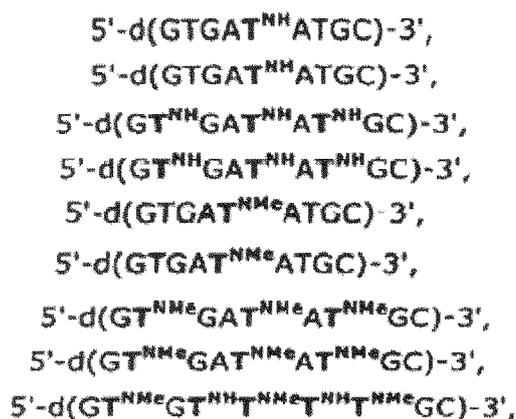


en donde los monómeros de LNA se muestran en negrita y son todos nucleótido con la Fórmula U^S que es la variante tio de la Fórmula Z de la Figura 2.

45. Oligómero según la reivindicación 1 que comprende un monómero 2'-amino-LNA correspondiente al nucleótido con la fórmula T^{NH} o T^{NMe} que corresponde a la fórmula Z de la Figura 2, en donde el puente metileneoxi se ha sustituido respectivamente con un puente metileneamino o con un puente metilen-(N-metil)amino.

46. Oligómero según la reivindicación 45 que se selecciona de entre el grupo consistente en,

ES 2 242 291 T3



y



en donde el monómero LNA se muestra en **negrita** y es un monómero amino-Z (T^{NH}) o un metilamino-Z (T^{NMe}).

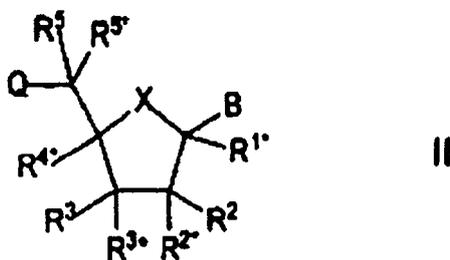
47. Oligómero según la reivindicación 1, en donde el LNA tiene el esqueleto
 (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano,
 (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(citosin-1-il)-2, 5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano,
 (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(uracil-1-il)-2, 5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano,
 (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(guanin-1-il)-2,5-dioxabicyclo-[2.2.1]heptano, o
 (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(adenin-1-il)-2, 5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano

y en donde el puente metileno ha sido sustituido con metilendio o metilenoamino.

48. Oligómero según la reivindicación 1 que es un oligonucleótido todo él fosforomonotioato.

49. Oligonucleótido modificado con LNA (un oligómero), según se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, conjugado con un compuesto seleccionado de entre proteínas, amplicones, enzimas, polisacáridos, anticuerpos, haptenos, péptidos, y ADN.

50. Análogo de nucleósido (a partir de ahora denominado LNA) con la Fórmula II general,



en donde:

X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R^{N*})-, -C(R⁶R^{6*})-, -O-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-O-, -S-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-S-, -N(RN*)-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-N(RN*)- y -C(R⁶R^{6*})-C(R⁷R^{7*})-;

B se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C₁₋₄-alcoxi opcionalmente sustituido, C₁₋₄-alquilo opcionalmente sustituido, C₁₋₄-aciloxi opcionalmente sustituido, nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos;

ES 2 242 291 T3

uno de los sustituyentes R^2 , R^* , R^3 y R^* es un grupo Q^* ;

5 cada uno de Q y Q^* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, alquiltio C_{1-6} , amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono- o di(C_{1-6} -alquil) amino, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{2-6} opcionalmente sustituido, alqueniloxi C_{2-6} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{2-6} opcionalmente sustituido, alquiniloxi C_{2-6} opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O- CH_2 -, Act-O- CH_2 -, aminometilo, Prot-N(R^H)- CH_2 -, Act-N(R^H)- CH_2 -, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo de protección para -OH, -SH, y -NH(R^H), Act es un grupo de activación respectivamente para -OH, -SH, and -NH(R^H) respectivamente, y R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C_{1-6} ;

15 R^{2*} y R^{4*} conjuntamente designan un biradical seleccionado de entre -O-, -S-, -N(R^*)-, -(CR^*R^*) $_{r+s+1}$ -, -(CR^*R^*) $_r$ -S-(CR^*R^*) $_s$ -, -(CR^*R^*) $_r$ -N(R^*)-(CR^*R^*) $_s$ -, -O-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -O-, -S-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -O-, -O-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -S-, -N(R^*)-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -O-, -O-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -N(R^*)-, -S-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -S-, -N(R^*)-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -N(R^*)-, -N(R^*)-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -S-, y -S-(CR^*R^*) $_{r+s}$ -N(R^*)-;

20 en donde cada R^* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di (C_{1-6} -alquil) amino, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y/o dos R^* adyacentes (no geminales) pueden designar conjuntamente un doble enlace, y

25 cada uno de r y s es 0-3 con la condición de que la suma $r+s$ sea 1-4;

30 cada uno de los sustituyentes R^{1*} , R^2 , R^3 , R^{3*} , R^5 , y R^{5*} , que no están implicados en Q ó Q^* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{2-12} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{2-12} opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C_{1-12} , alqueniloxi C_{2-12} , carboxilo, alcoxycarbonilo C_{1-12} , alquilcarbonilo C_{1-12} , formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C_{1-6} -alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C_{1-6} -alquil)-amino-carbonilo, amino- C_{1-6} -alquil-aminocarbonilo, mono- y di(C_{1-6} -alquil)amino- C_{1-6} -alquil-aminocarbonilo, C_{1-6} -alquil-carbonilamino, carbamido, C_{1-6} -alcanoiloxi, sulfono, C_{1-6} -alquilsulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, C_{1-6} -alquiltio, halógeno, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, en donde el arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar un oxo, tioxo, imino, o un metileno opcionalmente sustituido, o juntos pueden formar un biradical spiro consistente en una cadena de alquileo de 1-5 átomos de carbono, la cual está opcionalmente interrumpida y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR^N)-, en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} , y en donde dos sustituyentes adyacentes (no geminales) podrían designar un enlace adicional que resulta en un doble enlace;

40 y R^{N*} , cuando está presente y no implicado en un biradical, se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} ;

y sales básicas y sales por adición de ácido de los mismos;

45 en donde cualquier grupo químico (incluyendo cualquier nucleobase) que sea reactivo en las condiciones que predominan en la síntesis de oligonucleótidos, está opcionalmente protegido en su grupo funcional.

50 51. Análogo de nucleósido según la reivindicación 50, en donde el grupo B se selecciona de entre nucleobases y nucleobases protegidas en su grupo funcional.

52. Análogo de nucleósido según la reivindicación 50 o reivindicación 51, en donde X se selecciona -O-, -S-, y -N(R^{N*})-.

55 53. Análogo de nucleósido según una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 52, en donde cada uno de los sustituyentes R^{1*} , R^2 , R^3 , R^{3*} , R^5 , y R^{5*} , que están presentes y no implicados en Q ó Q^* , se selecciona independientemente de entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{2-6} opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , alqueniloxi C_{2-6} , carboxilo, C_{1-6} -alcoxycarbonilo, C_{1-6} -alquilcarbonilo, formilo, amino, mono- y di(C_{1-6} -alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C_{1-6} -alquil)-amino-carbonilo, C_{1-6} -alquil-carbonilamino, carbamido, azido, C_{1-6} -alcanoiloxi, sulfono, sulfanilo, C_{1-6} -alquiltio, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, y halógenos, en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, y en donde R^{N*} , cuando está presente y no implicado en un biradical, se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} , a condición de que cualquier hidroxilo, amino, mono(C_{1-6} -alquil)amino, sulfanilo, y carboxilo esté opcionalmente protegido.

65 54. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, en donde cada uno de los sustituyentes R^{1*} , R^2 , R^3 , R^{3*} y R^5 , R^{5*} , R^6 , R^{6*} que está presente y no implicado en Q^* designa hidrógeno.

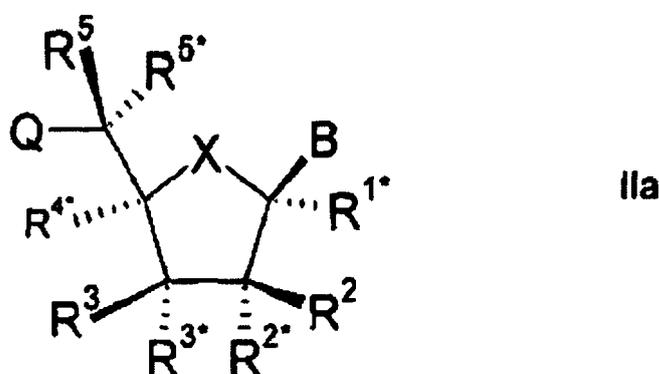
55. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 50 a 54, en donde R^* designa Q^* .

56. Análogo de nucleósido según con una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 55, en donde

Q se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, mercapto, Prot-S-, C-alquiltio, amino, Prot-N(R^H)-, mono- o di(C₁₋₆-alquil)amino, alcoxi C₁₋₆, opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alqueniilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alqueniilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquiniilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquiniilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo de protección respectivamente para -OH, -SH, y -NH (R^H), y R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆; y

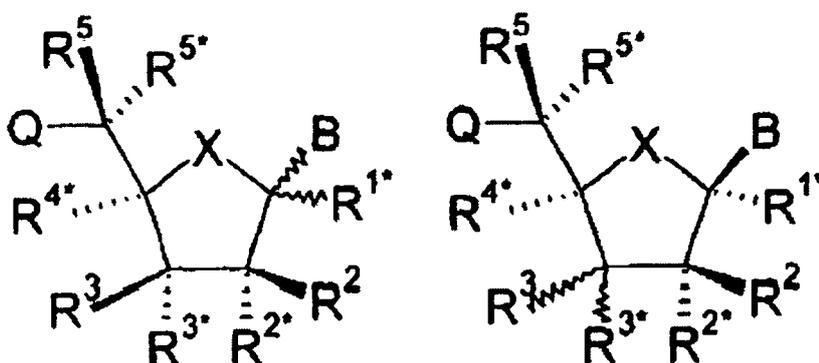
Q se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Act-O-, mercapto, Act-S-, C₁₋₆-alquiltio, amino, Act-N(R^H)-, mono- o di(C₁₋₆-alquil)amino, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alqueniilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alqueniilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquiniilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquiniilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, en donde Act es un grupo de activación respectivamente para -OH, -SH, y -NH(R^H), y R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆.

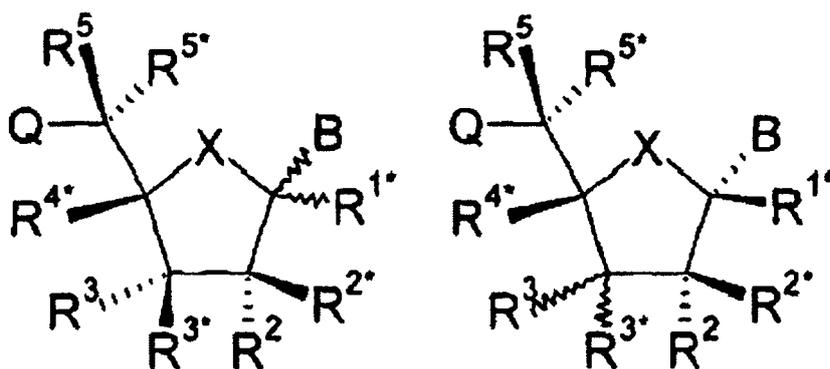
57. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 50 a 56, que tiene la Fórmula IIa general,



en donde los sustituyentes Q, B, R^{1*}, R², R^{2*}, R³, R^{3*}, R^{4*}, R⁵ y R^{5*} según se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 59.

58. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 50 a 56, que tienen la fórmula general:





59. Análogo de nucleósido según la reivindicación 57 o reivindicación 58, en donde R^{3*} designa Q^* .

60. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 57 a 59, en donde X es O, R^2 se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, y alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, y R^1 , R^3 , R^5 y R^* designan hidrógeno.

61. Análogo de nucleósido según la reivindicación 60, en donde el biradical se selecciona de entre $-O-$, $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$ y $-(CH_2)_{0-1}-N(R)-(CH_2)_{1-3}-$.

62. Análogo de nucleósido según la reivindicación 61, en donde el biradical se selecciona de entre $-S-CH_2-$ y $-N(R)-CH_2-$.

63. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 59 a 62, en donde B se selecciona de entre las nucleobases.

64. Análogo de nucleósido según la reivindicación 63, en donde el oligómero comprende al menos un LNA en donde B se selecciona de entre adenina y guanina, y al menos un LNA en donde B se selecciona de entre timina, citosina y uracilo.

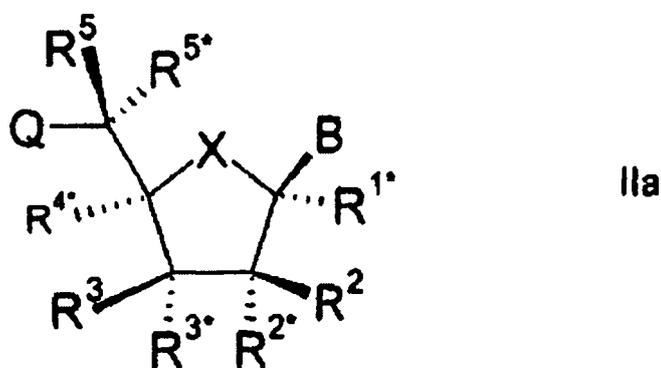
65. Análogo de nucleósido según la reivindicación 10, en donde el biradical es $-(CH_2)_{2-4}-$, preferiblemente $-(CH_2)_2-$.

66. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 58 a 65, en donde un R^* se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y cualquiera de los sustituyentes restantes R^* son hidrógeno.

67. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 58 a 66, en donde un grupo R^* en el biradical de al menos un LNA se selecciona de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos.

68. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 58 a 67, en donde el(los) LNA(s) tiene(n) la Fórmula Ia general.

69. Análogo de nucleósido según la reivindicación 50 con la Fórmula IIa general.



en donde:

X es $-O-$;

ES 2 242 291 T3

B se selecciona de entre las nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos;

R^{3*} es un grupo Q^* ;

5

cada uno de Q y Q^* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, alquiltio C_{1-6} , amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono- o di(C_{1-6} -alquil) amino, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{2-6} opcionalmente sustituido, alqueniloxi C_{2-6} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{2-6} opcionalmente sustituido, alquiniloxi C_{2-6} opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O- CH_2 -, Act-O- CH_2 -, aminometilo, Prot -N(R^H)- CH_2 -, Act-N(R^H)- CH_2 -, carboximetilo, sulfonometilo, en donde

10

Prot es grupo de protección respectivamente para -OH, -SH, y -NH(R^H), Act es un grupo de activación respectivamente para -OH, -SH, y -NH(R^H), y R^H se selecciona de entre hidrógeno y C_{1-6} -alquilo;

15

R^{2*} y R^{4*} conjuntamente designan un biradical seleccionado de entre -O-, -S-, -N(R^*)-, $-(CR^*R^*)_{r+s+1}$ -, $-(CR^*R^*)_r$ -S- $-(CR^*R^*)_s$ -, $-(CR^*R^*)_r$ -N(R^*)- $-(CR^*R^*)_s$ -, -O- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -O-, -S- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -O-, -O- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -S-, -N(R^*)- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -O-, -O- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -N(R^*)-, -S- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -S-, -N(R^*)- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -N(R^*)-, -N(R^*)- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -S-, y -S- $-(CR^*R^*)_{r+s}$ -N(R^*)-; en donde cada R^* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di(C_{1-6} -alquil) amino, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y dos R^* adyacentes (no geminales) podrían designar conjuntamente un doble enlace, y

20

cada uno de r y s es 0-3 con la condición de que la suma $r+s$ sea 1-4;

cada uno de los sustituyentes R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 , y R^{5*} se selecciona independientemente de entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{2-6} opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , alqueniloxi C_{2-6} , carboxilo, C_{1-6} -alcoxicarbonilo, C_{1-6} -alquilcarbonilo, formilo, amino, mono- y di(C_{1-6} -alquil)amino, carbamoilo, mono- y di (C_{1-6} -alquil) -amino-carbonilo, C_{1-6} - alquilcarbonilamino, carbamido, azido, C_{1-6} -alcanoiloxi, sulfono, sulfanilo, C_{1-6} -alquiltio, intercaladores del DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y halógenos, en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar un oxo;

25

y sales básicas y sales por adición de ácido de los mismos;

y con la condición de que cualquier grupo químico (incluyendo cualquier nucleobase) que sea reactivo en las condiciones que predominan en la síntesis de oligonucleótidos, está opcionalmente protegido en su grupo funcional.

30

70. Análogo de nucleósido según la reivindicación 69, en donde R^* se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, y ligandos, y cualquiera de los sustituyentes restantes R^* son hidrógeno.

35

71. Análogo de nucleósido según la reivindicación 69 o reivindicación 70, en donde el biradical se selecciona de entre -O-, $-(CH_2)_{0-1}$ -S- $(CH_2)_{1-3}$ -, $-(CH_2)_{0-1}$ -N(R)- $(CH_2)_{1-3}$ -, y $-(CH_2)_{2-4}$ -.

40

72. Análogo de nucleósido según la reivindicación 71, en donde el biradical se selecciona de entre -S- (CH_2) - y -N(R)- CH_2 -.

73. Análogo de nucleósido según cualquiera de las reivindicaciones 69 a 72, en donde B se selecciona de entre las nucleobases.

45

74. Análogo de nucleósido según la reivindicación 73, en donde el oligómero comprende al menos un LNA en donde B se selecciona de entre adenina y guanina, y al menos un LNA en donde B se selecciona de entre timina, citosina y uracilo.

50

75. Análogo de nucleósido según la reivindicación 69, en donde B designa una nucleobase, X es -O-, R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de entre $-(CH_2)_{0-1}$ -S- $(CH_2)_{1-3}$ - y $-(CH_2)_{0-1}$ -N(R^N)- $(CH_2)_{1-3}$ - en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} , Q designa Prot-O-, R^{3*} es Q^* , el cual designa Act-OH, y R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} designan cada uno hidrógeno, en donde Act y Prot son según se definen en la reivindicación 56.

55

76. Análogo de nucleósido según la reivindicación 75, en donde B designa una nucleobase; X es -O-; R^{2*} y R^{4*} juntos designan un biradical seleccionado de entre $-(CH_2)_{0-1}$ -S- $(CH_2)_{1-3}$ - y $-(CH_2)_{0-1}$ -N(R^N)- $(CH_2)_{1-3}$ - en donde R^N se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} ; Q se selecciona de entre hidroxilo, mercapto, alquiltio C_{1-6} , amino, mono- o di (C_{1-6} -alquil) amino, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alqueniloxi C_{2-6} opcionalmente sustituido, alquiniloxi

ES 2 242 291 T3

C₂₋₆ opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato y trifosfato; R^{3*} es Q*, el cual se selecciona de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, alquiltio C₁₋₆, amino, mono- o di(C₁₋₆-alquil)amino, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alqueniloxi C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquiniloxi C₂₋₆ opcionalmente sustituido; R³ se selecciona de entre hidrógeno, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido; y R^{1*}, R², R⁵ y R^{5*} designan cada uno hidrógeno.

77. Análogo de nucleósido según una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 76, en donde el grupo de activación Act-O- se selecciona de entre el grupo consistente en O-fosforamidito opcionalmente sustituido, O-fosfortriéster opcionalmente sustituido, O-fosfordiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido, y O-fosfonato opcionalmente sustituido.

78. Análogo de nucleósido según la reivindicación 77, en donde el grupo de activación Act-O- es O-fosforamidito con la fórmula -O-P(OR^X)-N(R^Y)₂-, en donde R^X designa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, y cada R^Y designa grupos alquilo opcionalmente sustituidos, o el grupo -N(R^Y)₂ forma un grupo morfolino (-N(CH₂CH₂)₂O).

79. Análogo de nucleósido según la reivindicación 78, en donde R^X designa 2-cianoetil y los dos R^Y son idénticos y designan isopropil-(N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)-fosforamidito).

80. Análogo de nucleósido según la reivindicación 78 que se selecciona de entre

1-(2-amino-3-[-O-(2-cianoetoxi(diispropilamino)fosfino)-2-desoxi-5-O-4,4'-dimetoxitritil-2-N,4-C-metilen-2-N-trifluoroacetil-β-D-ribofuranosil]timina,

1-(3-O-(2-cianoetoxi(diispropilamino)fosfino)-2-desoxi-5-O-4,4'-dimetoxitritil-2-metilamino-2-N,4-C-metilen-β-D-ribofuranosil)timina,

1-(3-O-(2-cianoetoxi(diispropilamino)fosfino)-(2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-mercapto-2-S,4-C-metilen-β-D-ribofuranosil)uracilo.

81. Procedimiento para la preparación de oligo- y polinucleótidos lineales, ramificados y circulares según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49, comprendiendo el procedimiento una técnica de polimerización de la química de ácidos nucleicos seleccionada de entre la química del fosforamidito, la química del H-fosfonato, la química del fosfortriéster, o la síntesis enzimática.

82. Procedimiento de síntesis de un oligómero de LNA todo fosforotioato usando procedimientos estándares, mediante el intercambio de la oxidación normal yodo/piridina/H₂O usada para la síntesis de oligómeros de fosfordiéster con una oxidación que utiliza el reactivo de Beaucage en acoplamiento paso a paso.

83. Utilización de un LNA tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 50 a 82 para la preparación de un oligonucleótido modificado con LNA (un oligómero) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49.

84. Utilización según la reivindicación 83, en donde el oligonucleótido modificado con LNA comprende nucleósidos normales, tales como los ribonucleósidos y/o los desoxiribonucleósidos, así como nucleósidos modificados diferentes de los definidos en las reivindicaciones 50 a 82.

85. Utilización según la reivindicación 84, en donde el oligonucleótido modificado con LNA se prepara mediante síntesis en fase sólida y/o en fase en solución.

86. Utilización según la reivindicación 83, en donde la incorporación de LNA modula la capacidad del oligonucleótido para actuar como sustrato para enzimas activos con ácidos nucleicos.

87. Utilización de un LNA tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 50 a 80 para la preparación de un conjugado de un oligonucleótido modificado con LNA y un compuesto seleccionado de entre proteínas, amplicones, enzimas, polisacáridos, anticuerpos, haptenos, péptidos, y PNA.

88. Utilización de un LNA según se define en cualquiera de las reivindicaciones 50 a 80 como un sustrato para enzimas activos con ácidos nucleicos.

89. Utilización según la reivindicación 88, en donde el sustituyente Q en la Fórmula I en la reivindicación 62 designa un trifosfato o en donde el LNA se usa como un sustrato para las polimerasas de ADN y ARN.

90. LNA según se define en cualquiera de las reivindicaciones 50 a 80, o un oligonucleótido modificado con LNA según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49, para utilizar como agente terapéutico o para propósitos diagnósticos.

91. LNA para utilizar como un agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 90, en donde el LNA es para uso como un terapéutico antisentido, antígeno o activador de gen o como un aptámero en aplicaciones terapéuticas.

ES 2 242 291 T3

92. LNA para utilizar como un agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 91, en donde el oligonucleótido modificado con LNA recluta la RNAasaH, o el oligonucleótido modificado con LNA comprende al menos un enlace internucleósidos que no es un enlace fosfodiéster.

5 93. Material de soporte sólido que tiene inmovilizado sobre sí un LNA opcionalmente protegido en su nucleobase y opcionalmente protegido en 5'-OH.

94. Utilización de uno o más LNA según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 50 a 80 en la construcción de una superficie sólida sobre la cual se unen oligonucleótidos o diferentes secuencias modificados con LNA.

10

95. Utilización según la reivindicación 94, en donde:

(a) los oligonucleótidos modificados con LNA se unen a un patrón predeterminado; o

15

(b) los LNA se usan para igualar las T_m de los correspondientes oligonucleótidos de referencia no modificados; o

(c) los oligonucleótidos modificados con LNA tienen una afinidad incrementada hacia los ADNss o ARNss complementarios en comparación con los oligonucleótidos nativos; o

20

(d) los oligonucleótidos modificados con LNA tienen una especificidad incrementada hacia los ADNss o ARNss complementarios en comparación con los oligonucleótidos nativos.

96. Utilización de oligómeros modificados con LNA (ribozimas) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49 en el corte específico para la secuencia de ácidos nucleicos diana.

25

97. Utilización de un oligonucleótido modificado con LNA (un oligómero) según se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49 en el diagnóstico para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos.

30

98. Utilización según la reivindicación 97, en donde el oligonucleótido comprende un grupo fotoquímicamente activo, un grupo termoquímicamente activo, un grupo quelante, un grupo informador, o un ligando que facilita la detección directa o indirecta del oligonucleótido o la inmovilización del oligonucleótido sobre un soporte sólido.

99. Utilización según la reivindicación 97, en donde:

35

(a) el grupo fotoquímicamente activo, el grupo termoquímicamente activo, el grupo quelante, el grupo informador, o el ligando, incluyen un espaciador (K), comprendiendo dicho espaciador un grupo que puede cortarse químicamente; o

40

(b) en donde el grupo fotoquímicamente activo, el grupo termoquímicamente activo, el grupo quelante, el grupo informador, o el ligando están unidos a través del biradical (es decir, como R^*) de la menos uno de los LNA del oligonucleótido.

100. Uso según la reivindicación 97:

45

(a) para la captura y detección de ácidos nucleicos de doble hebra o hebra única, que ocurren de forma natural o sintéticos, tales como el ARN o ADN; o

(b) para la purificación de ácidos nucleicos de doble hebra o hebra única, que ocurren de forma natural o sintéticos, tales como el ARN o ADN; o

50

(c) como una sonda para la hibridación *in situ*, hibridación en Southern, hibridación por transferencia en punto, hibridación por transferencia en punto inversa, o en hibridación Northern; o

55

(d) en la construcción de un par de afinidad;

(e) como un cebador en una reacción de secuenciación de ácido nucleico o en reacciones de extensión del cebador;

o

60

(f) como un cebador en una reacción de amplificación de ácido nucleico.

101. Utilización según la reivindicación 100(f), en donde:

(i) dicha reacción de amplificación es una reacción PCR; o

65

(ii) el cebador está adaptado de manera que la reacción de amplificación es una reacción esencialmente lineal; o

ES 2 242 291 T3

(iii) el cebador está adaptado de manera que la reacción de amplificación es una reacción esencialmente exponencial.

5 102. Utilización según la reivindicación 100 ó 101, en donde la reacción de amplificación del ácido nucleico resulta en un producto de ADN de doble hebra que comprende al menos un extremo en hebra única.

10 103. Utilización de un oligonucleótido modificado con LNA (oligómero) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49 (a) como un aptámero en el diagnóstico molecular, o (b) como un aptámero en los procesos catalíticos mediados por el ARN, o (c) como un aptámero en la unión específica de antibióticos, drogas, aminoácidos, péptidos, proteínas estructurales, receptores proteicos, enzimas proteicos, sacáridos, polisacáridos, cofactores biológicos, ácidos nucleicos, o trifosfatos, o (d) como un aptámero en la separación de enantiómeros a partir de mezclas racémicas mediante unión estereoespecífica, o (e) para marcar células, o (f) para hibridar ARN celular que no codifica proteínas, tales como el ARNt, el ARNr, el ARNsn y el ARNsc, *in vivo* o *in vitro*, o (g) para hibridar ARN celular que no codifica proteínas, tales como el ARNt, el ARNr, el ARNsn y el ARNsc, *in vivo* o *in vitro*, o (h) en la construcción de sondas Taqman o Balizas Moleculares.

104. Utilización según la reivindicación 103, en donde la marca permite que las células sean separadas de las células no marcadas.

20 105. Equipo para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, comprendiendo el equipo un cuerpo de reacción y uno o más nucleótidos modificados con LNA (oligómeros) tal como se definieron en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49.

25 106. Equipo según la reivindicación 105, en donde los nucleótidos modificados con LNA están inmovilizados sobre dicho cuerpo de reacción.

107. Utilización de oligonucleótidos de fosforomonotioato LNA total o parcialmente fosforilados en aplicaciones terapéuticas antisentido y en otras.

30

35

40

45

50

55

60

65

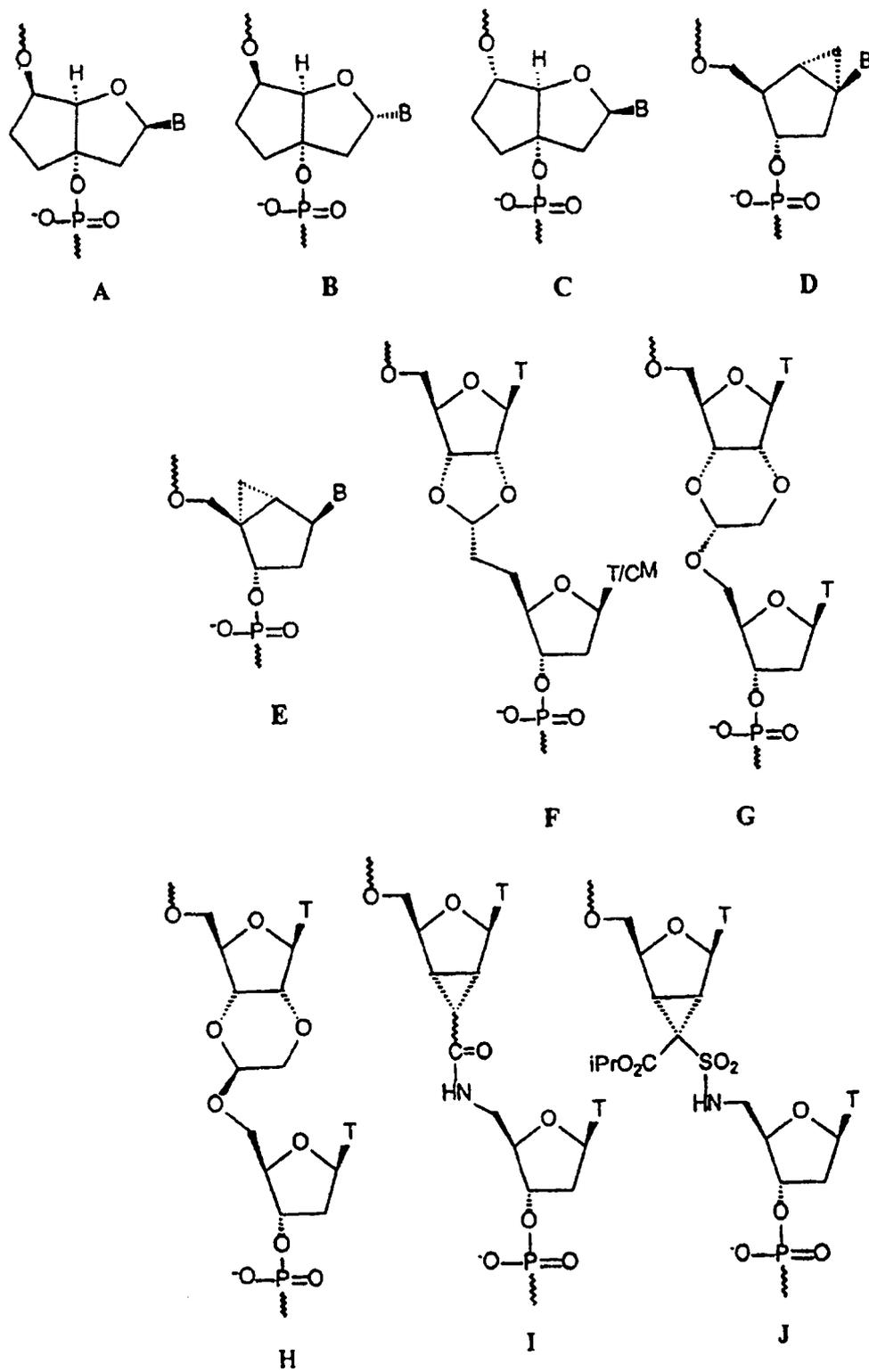


Fig. 1 A

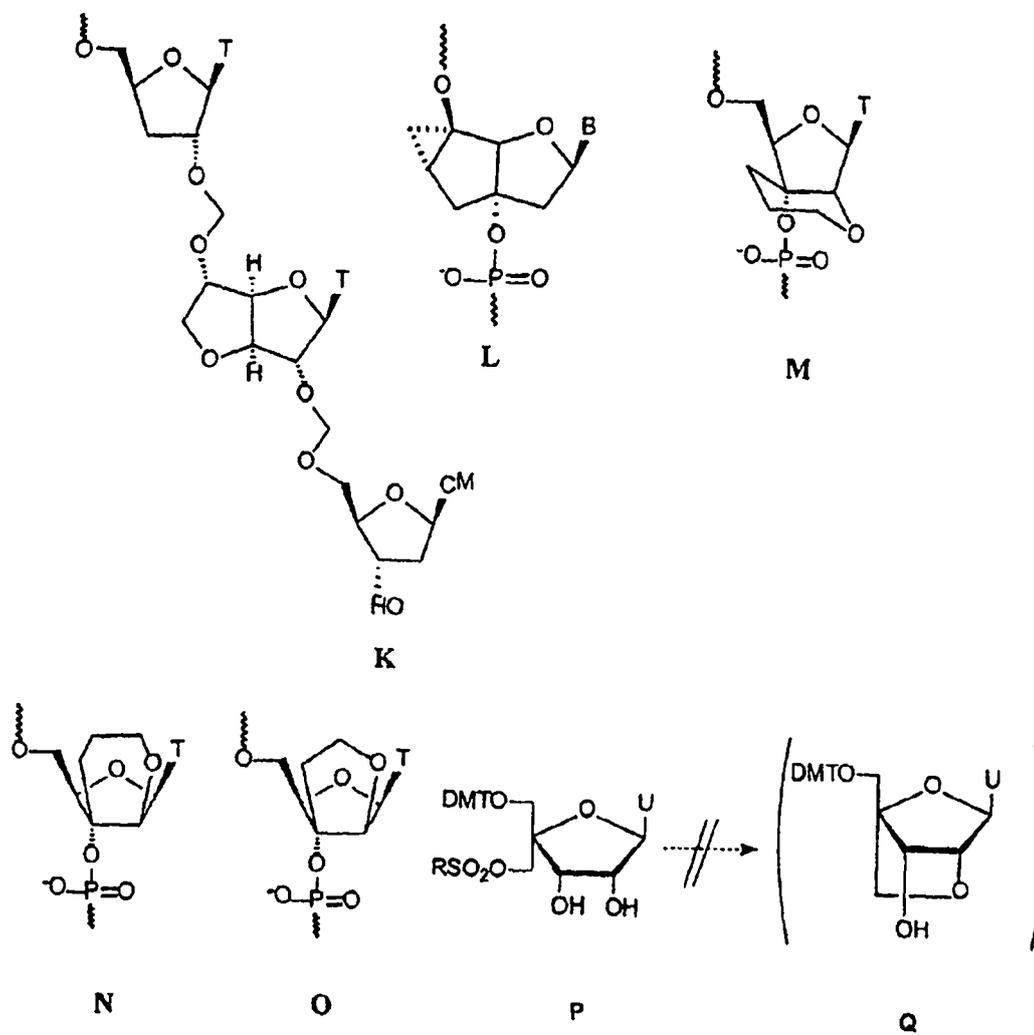


Fig. 1 B

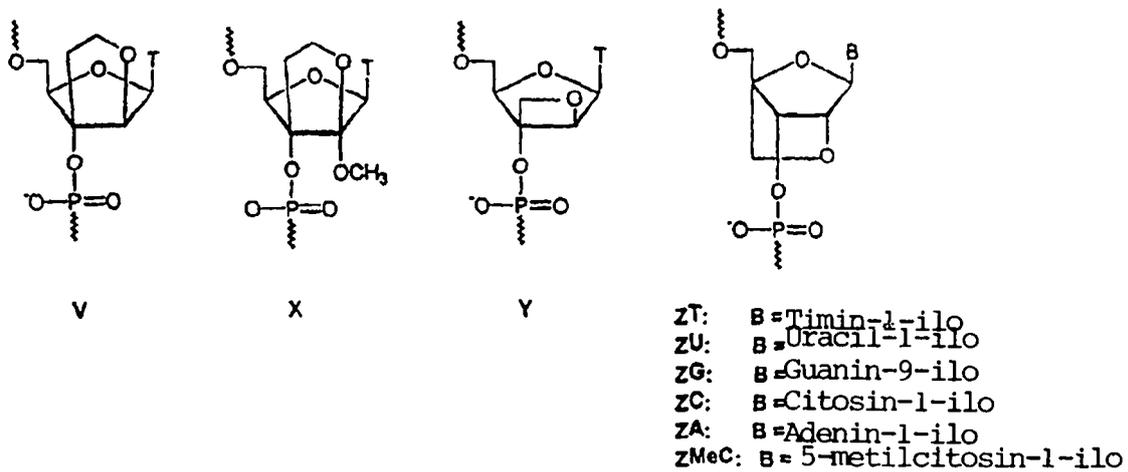


Fig. 2

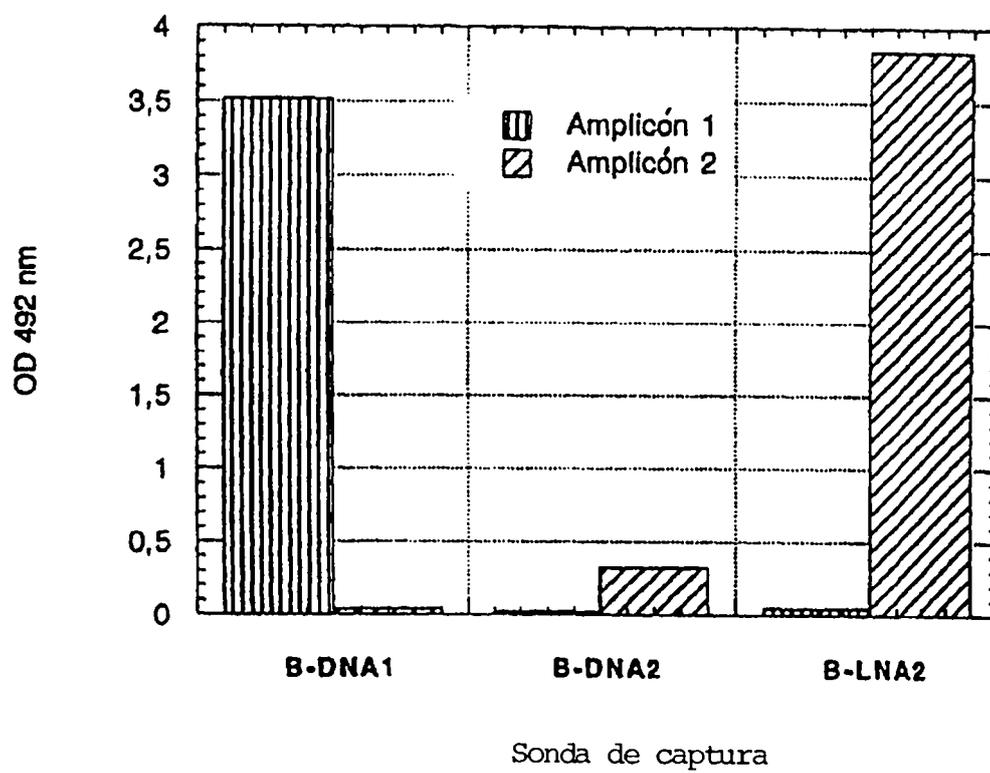


Fig. 3

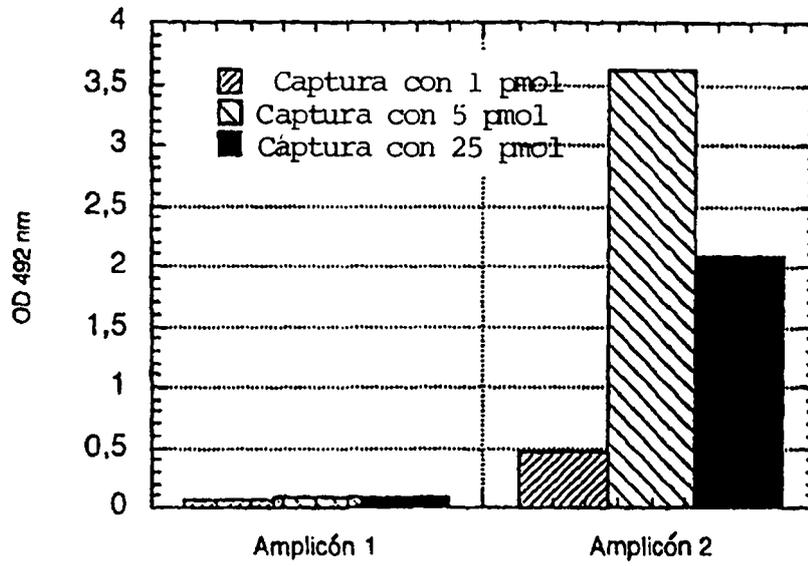


Fig. 4 A

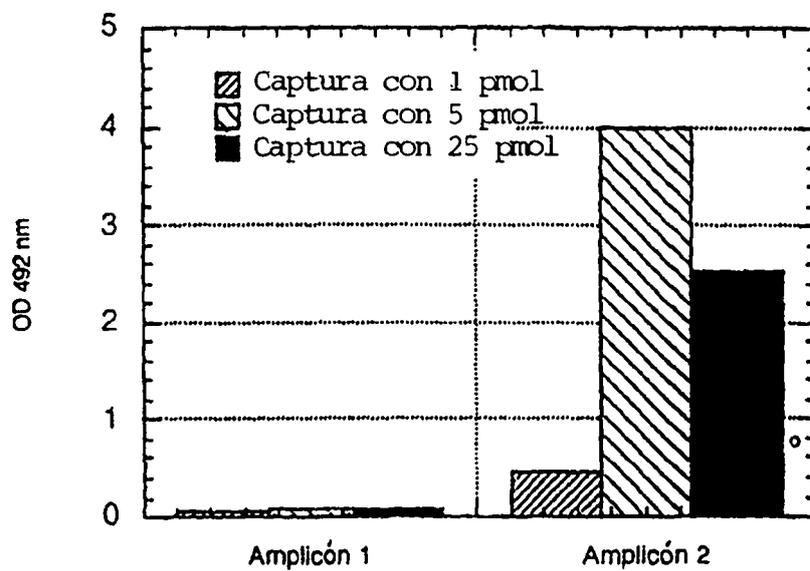


Fig. 4 B

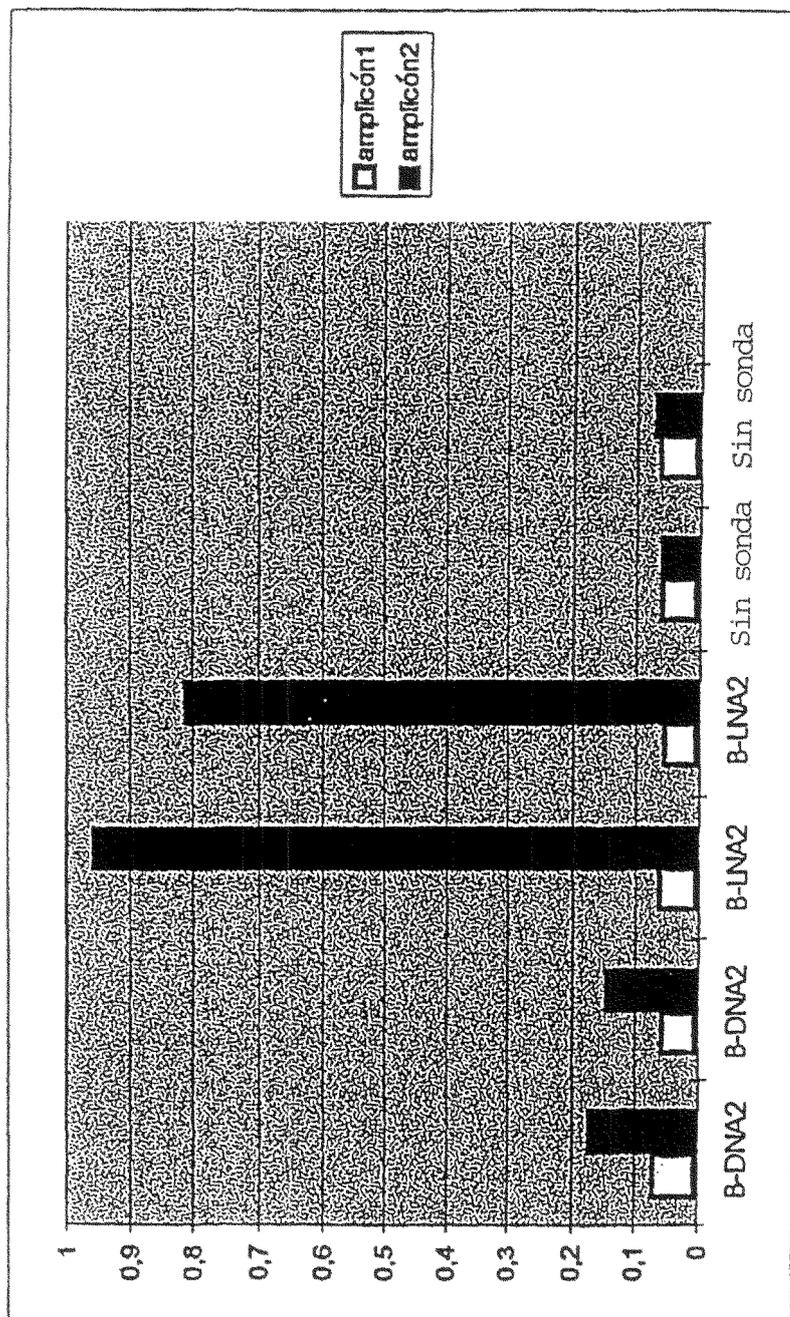


Fig. 5

1 2 3 4 5 6

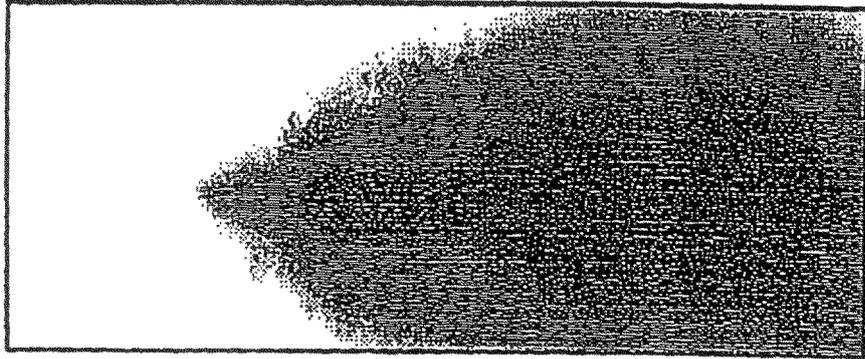


Fig. 6

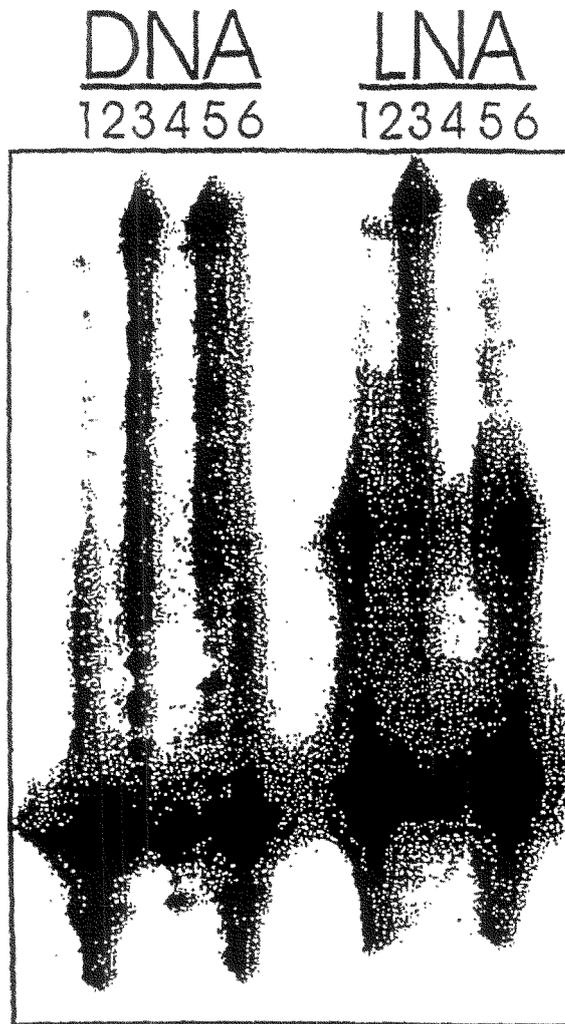


Fig. 7



Fig. 8

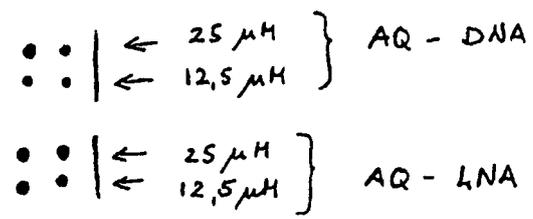


Fig. 9

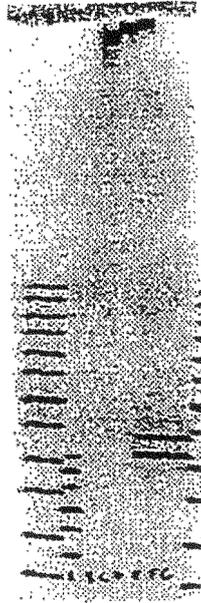


Fig. 10

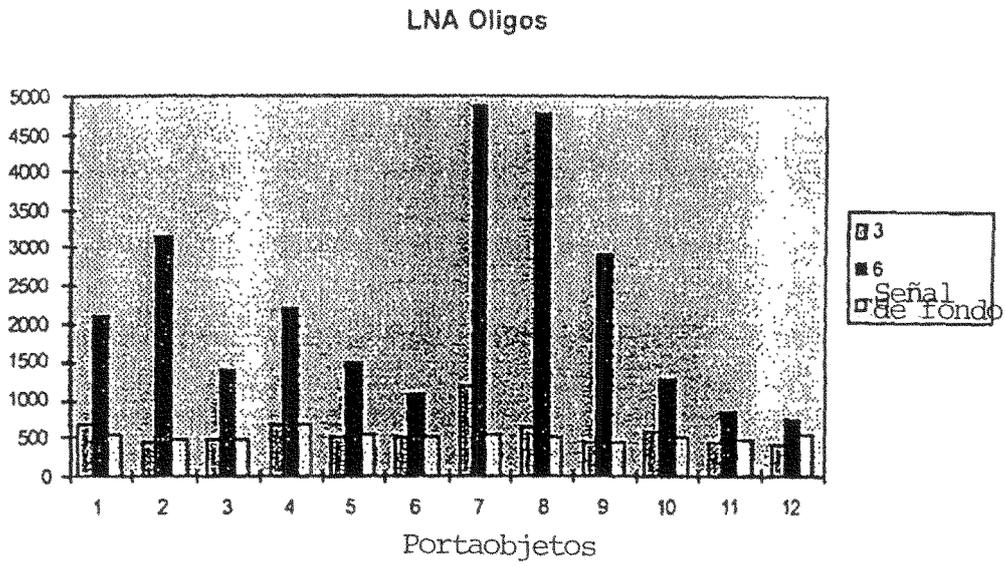


Fig. 11

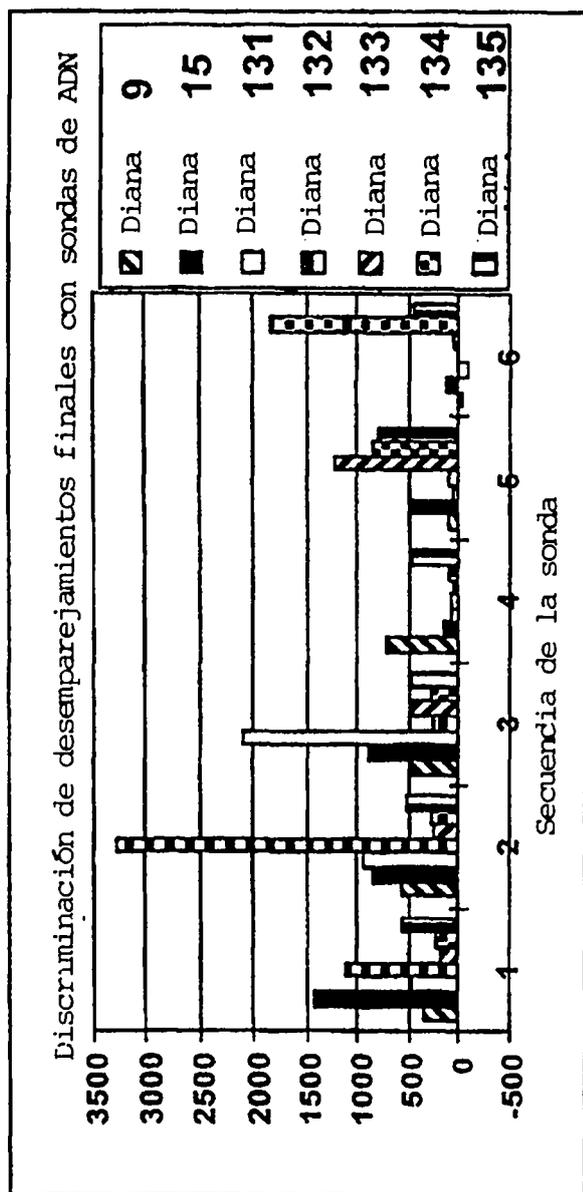


Fig. 12

Discriminación de desemparejamientos finales con sondas de 3' y 5' LNA

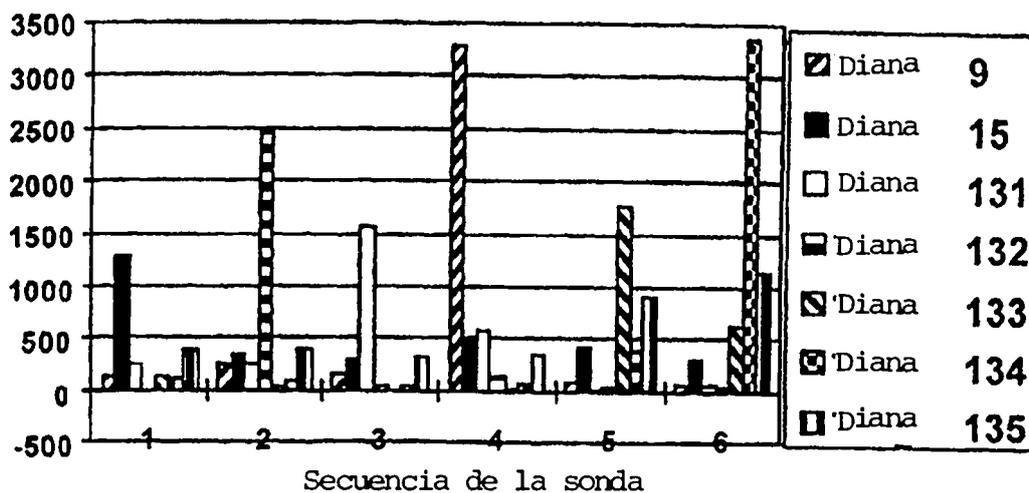


Fig. 13

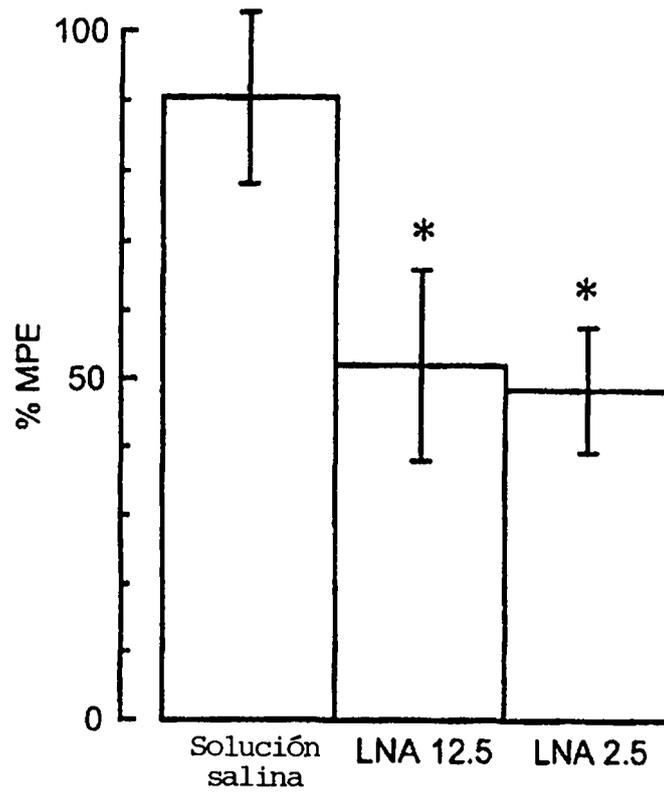


Fig. 14

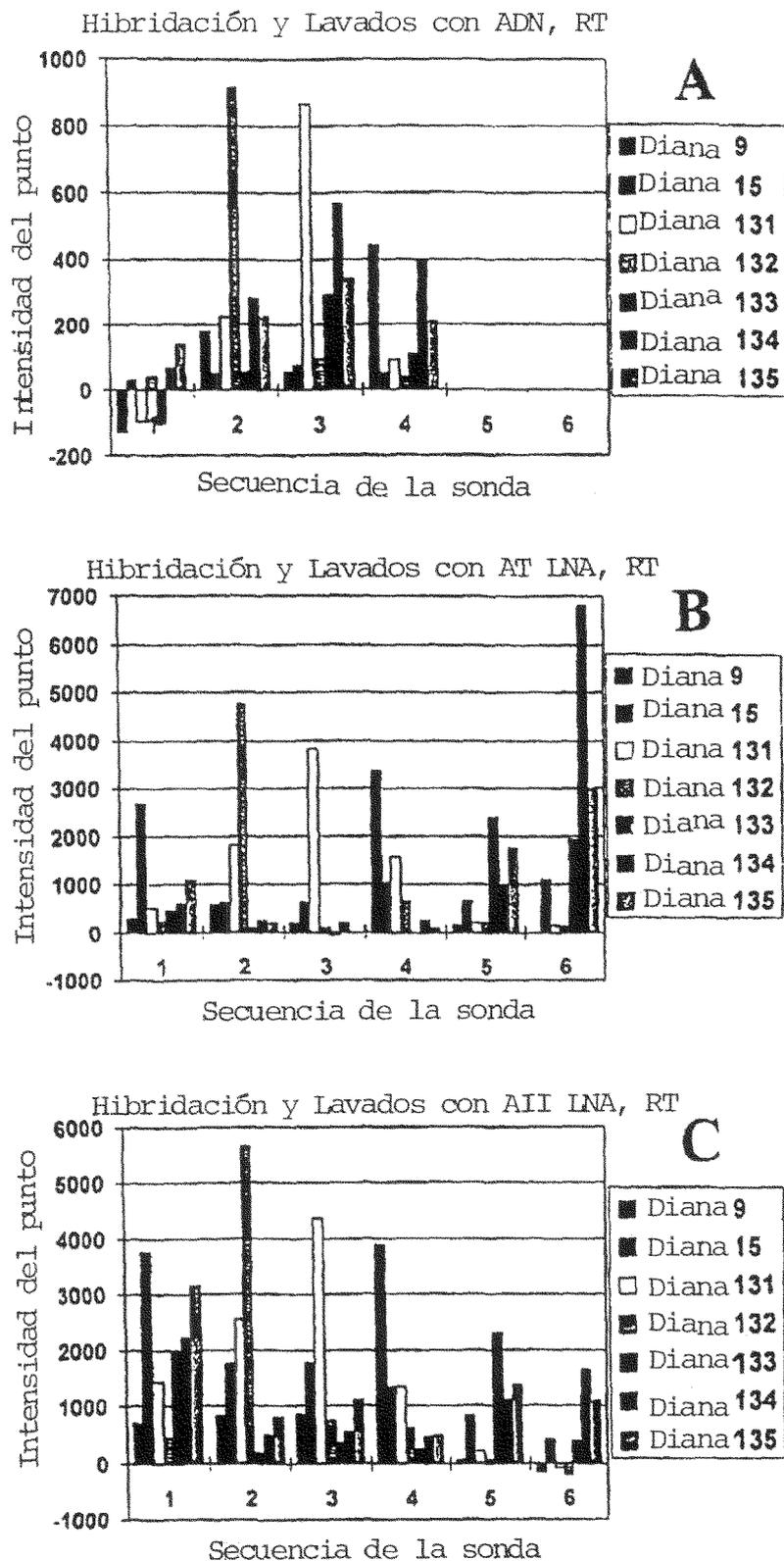


Fig. 15

#Ina4: LNA marcado con FITC (LA-16)

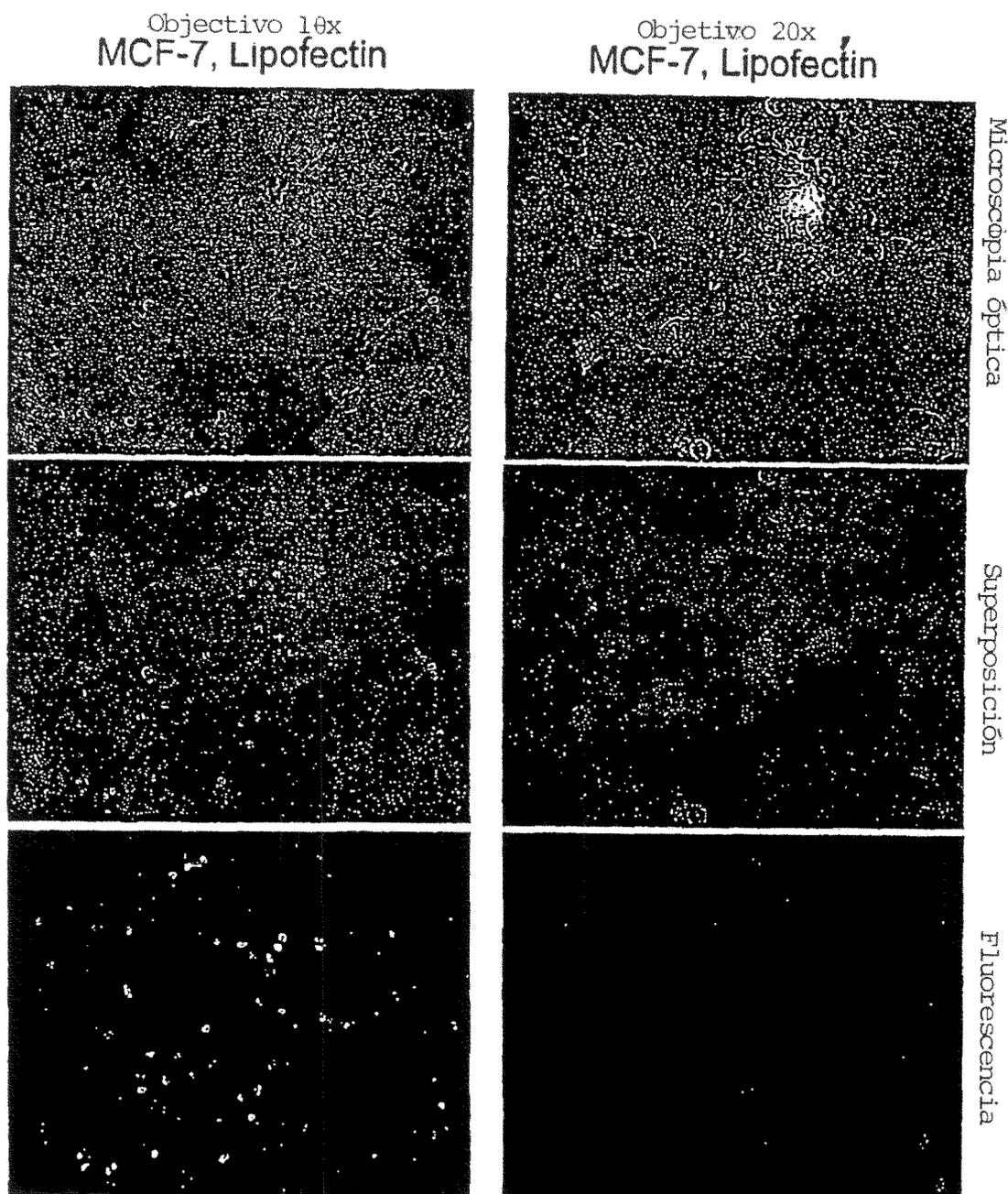


Fig. 16

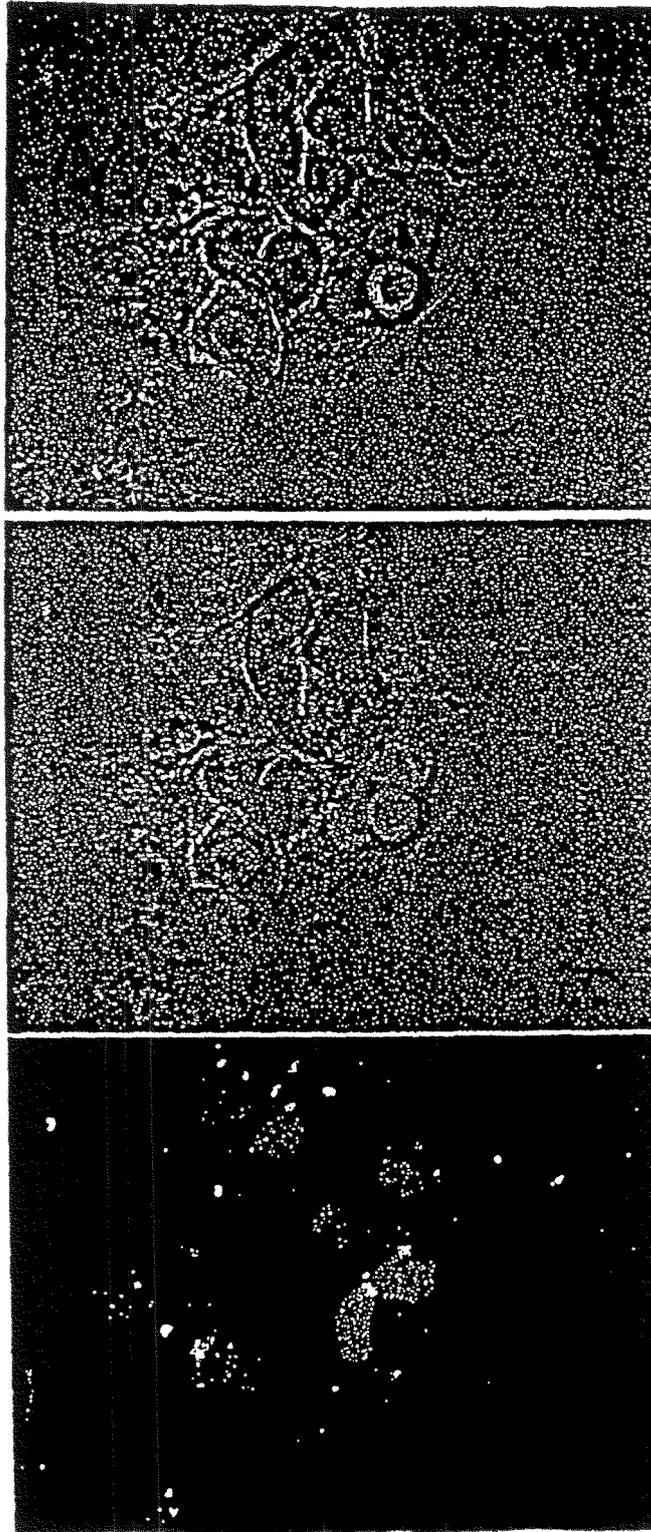


Fig. 17



Fig. 18

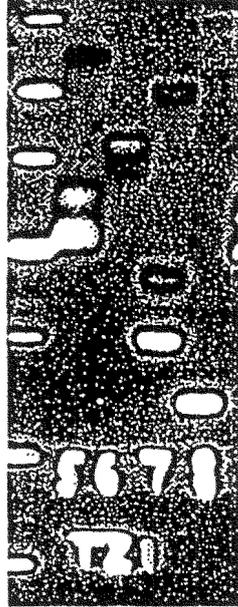


Fig. 19

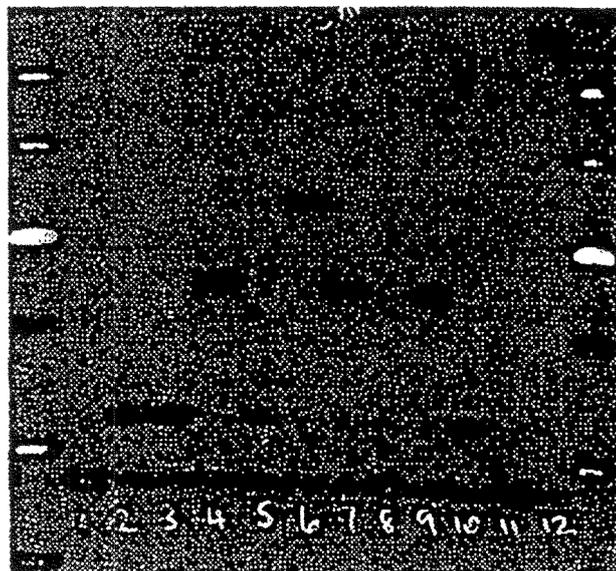


Fig. 20



Fig. 21

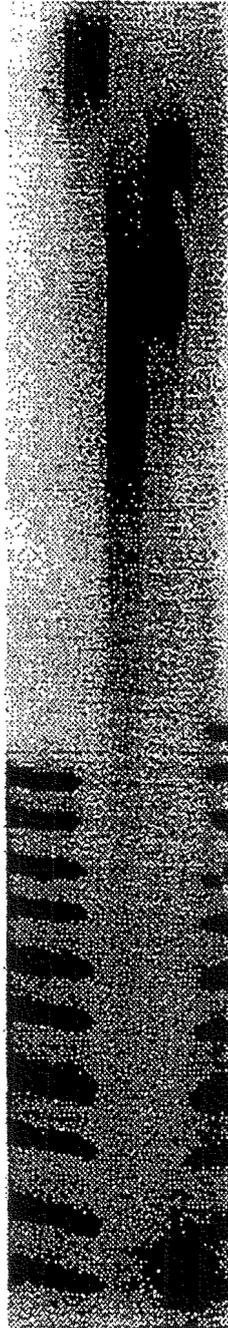


Fig. 22

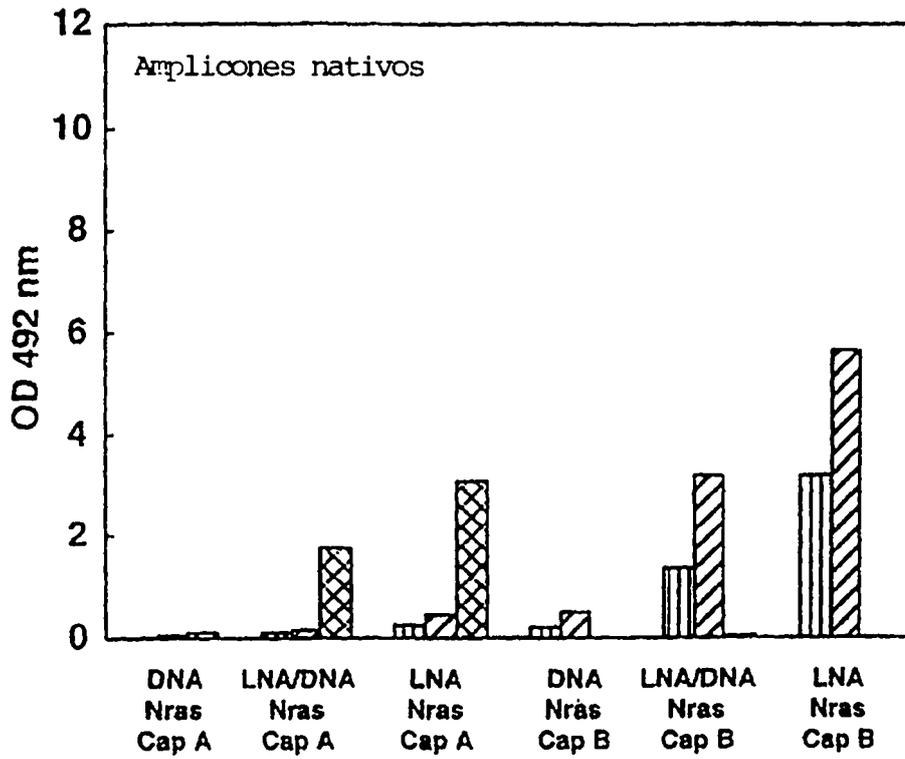


Fig. 23 A

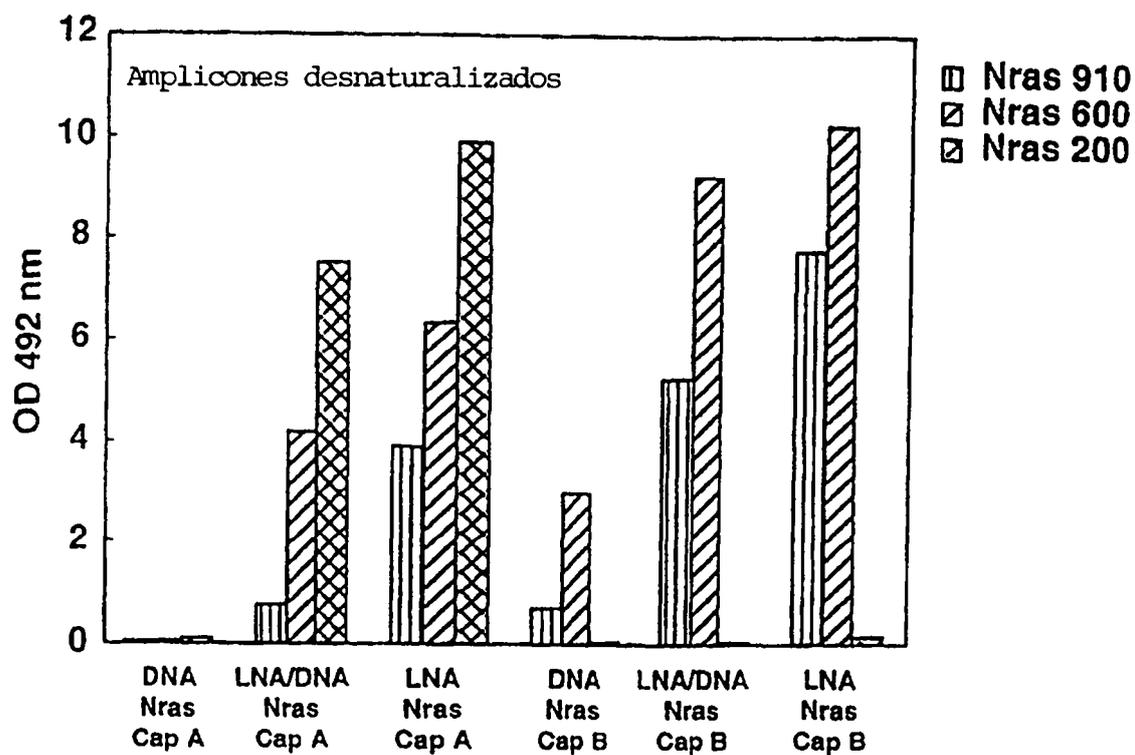


Fig. 23 B

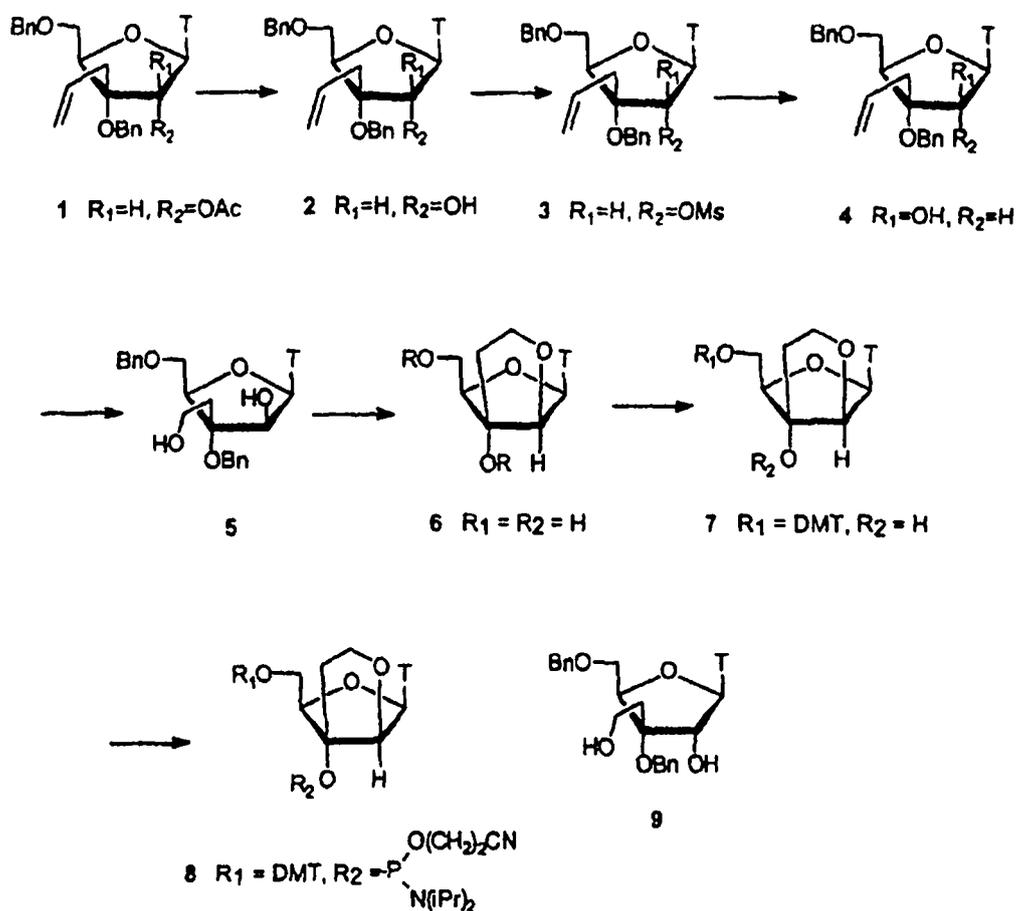


Fig. 24

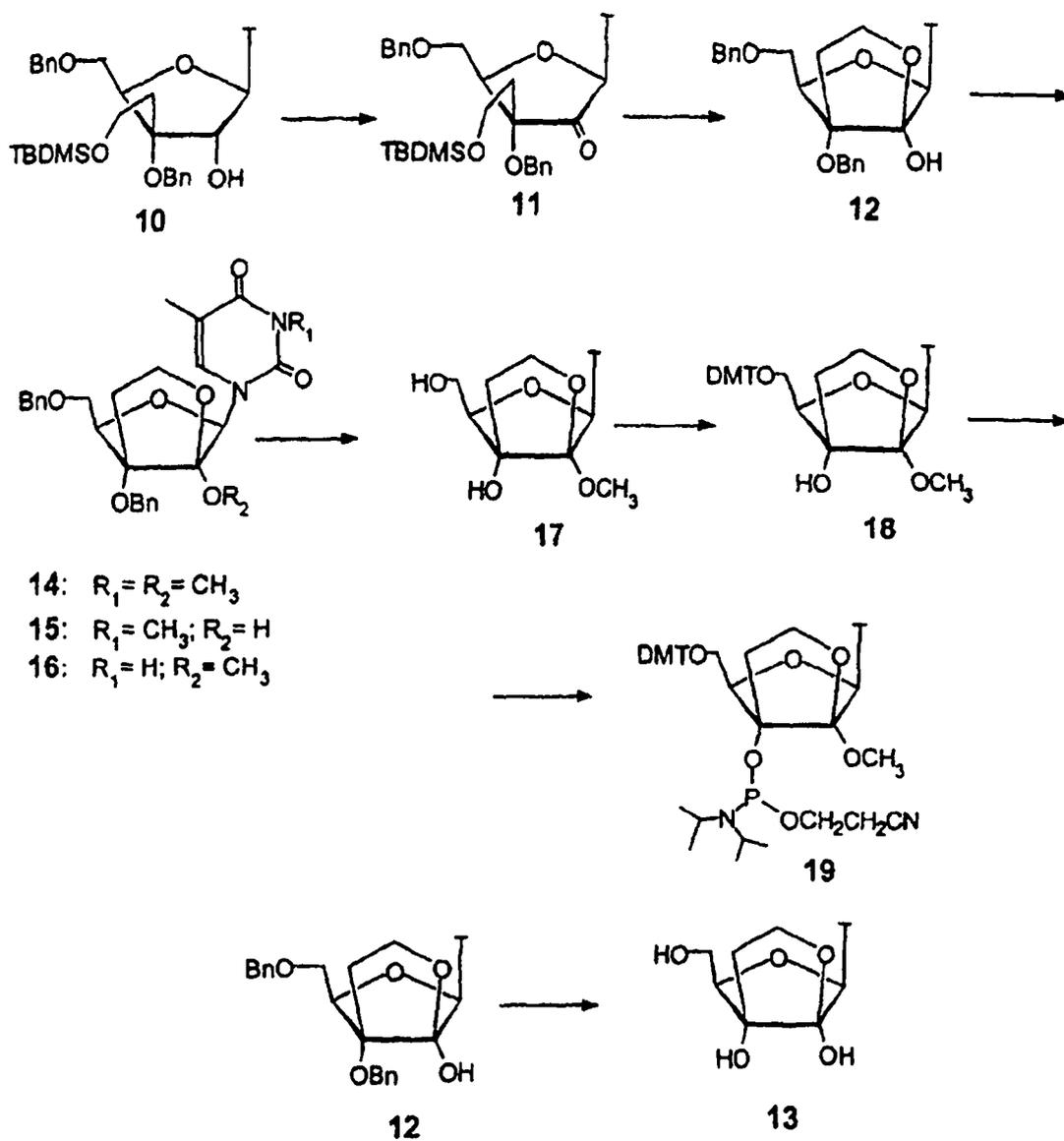
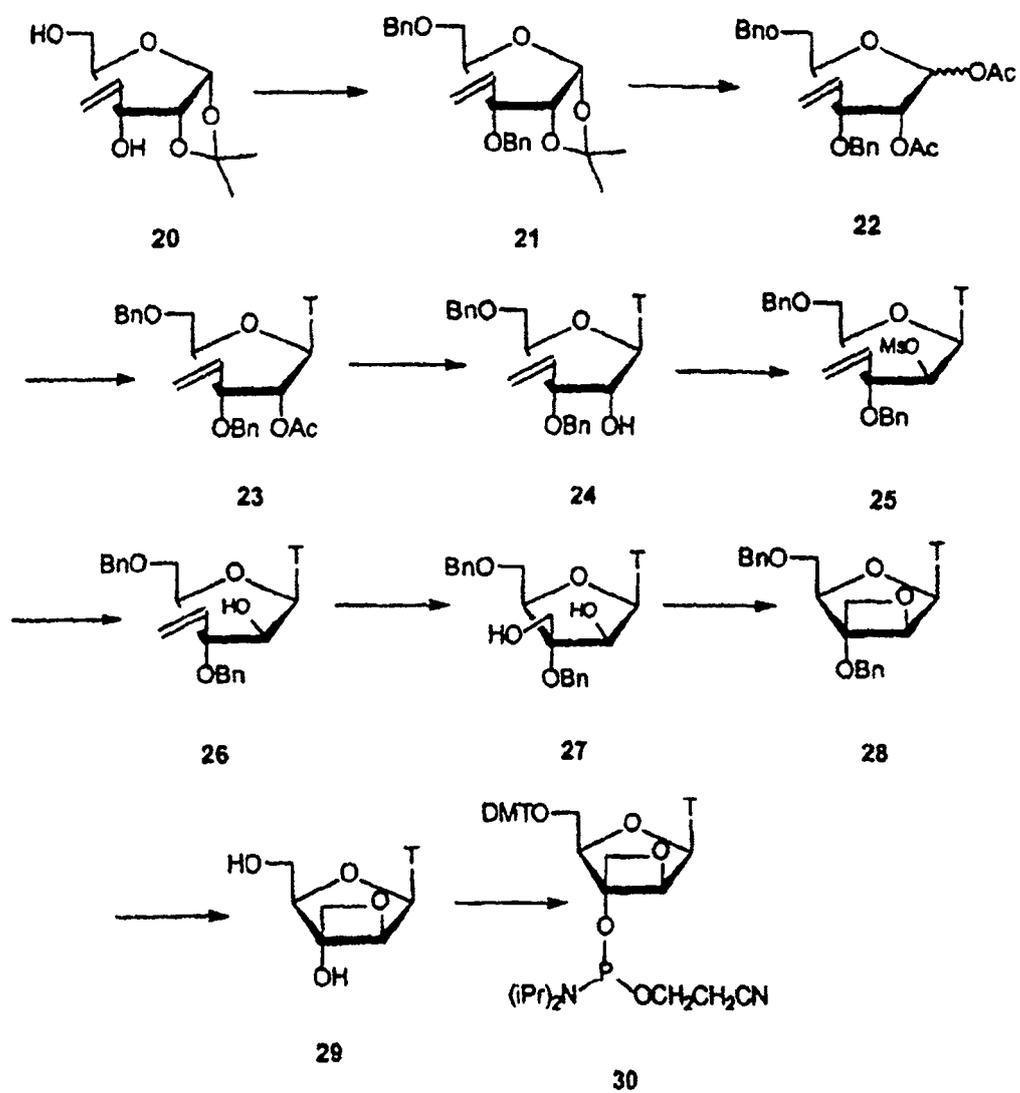


Fig. 25

**Fig. 26**

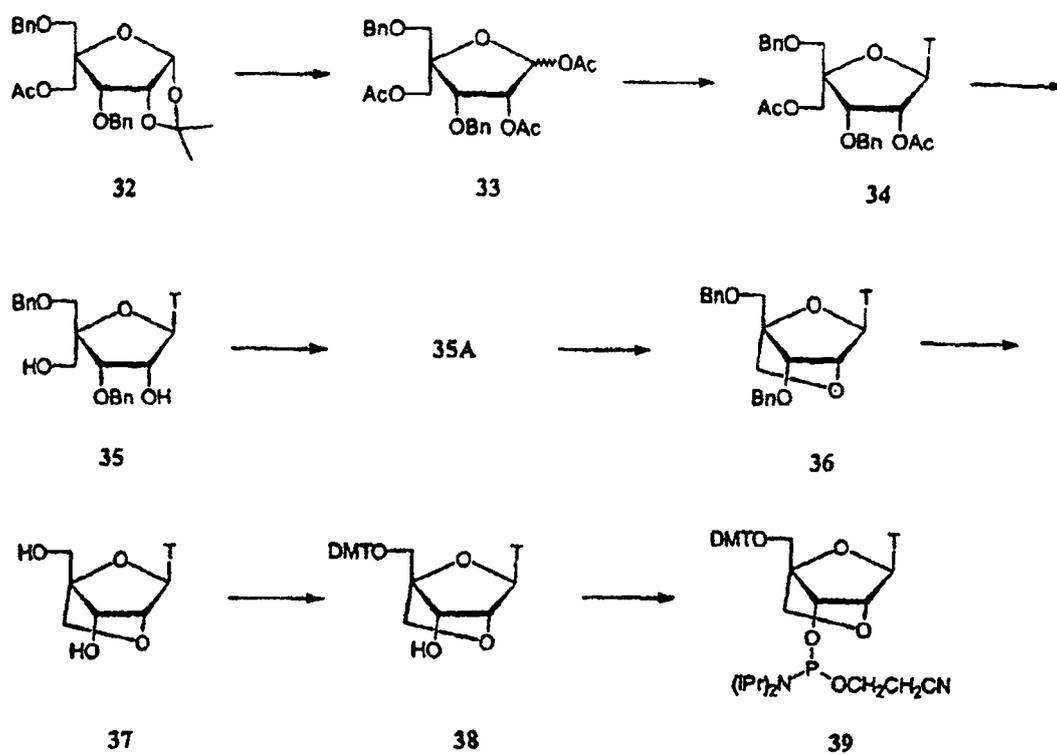


Fig. 27

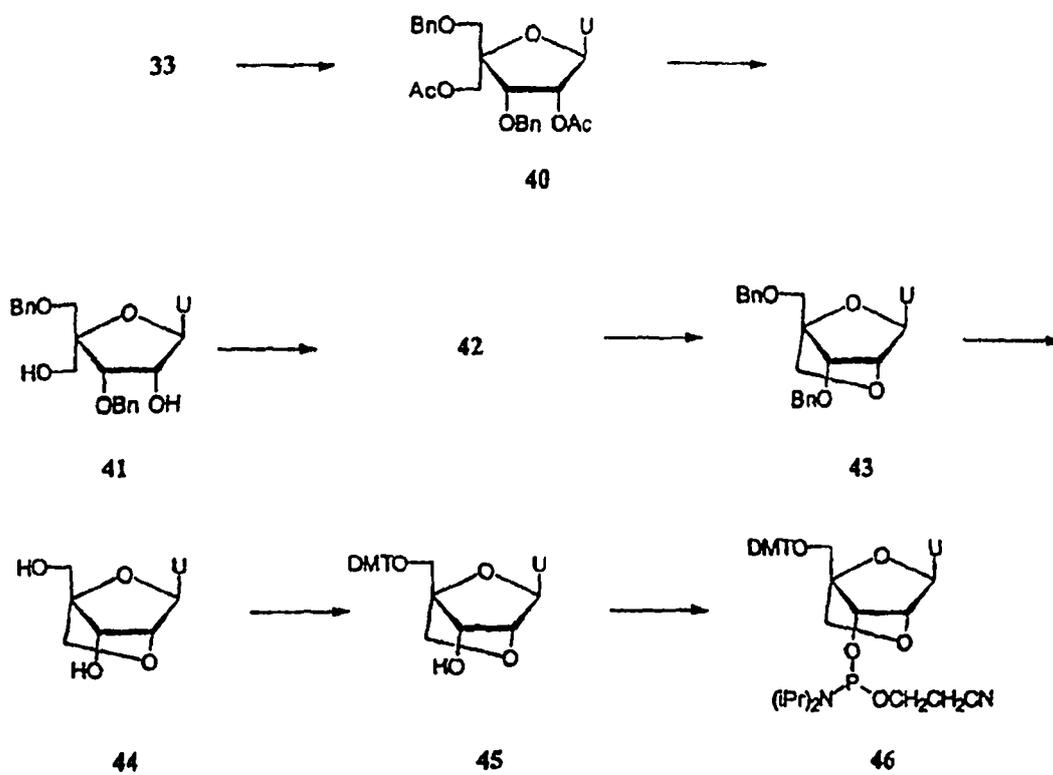


Fig. 28

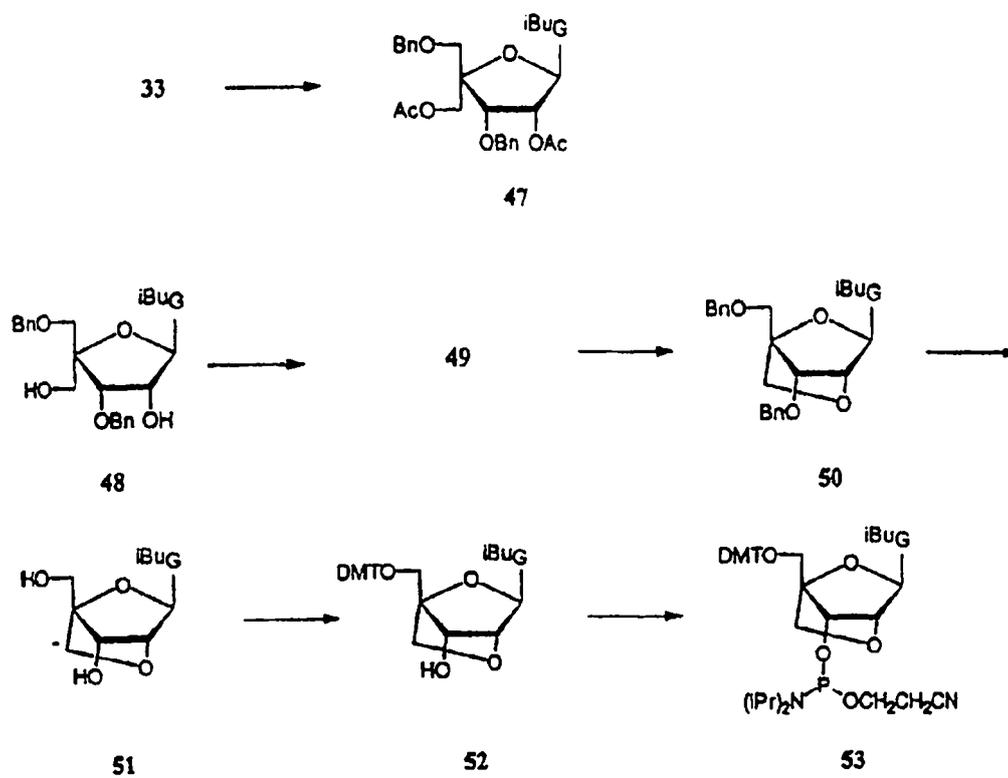


Fig. 29

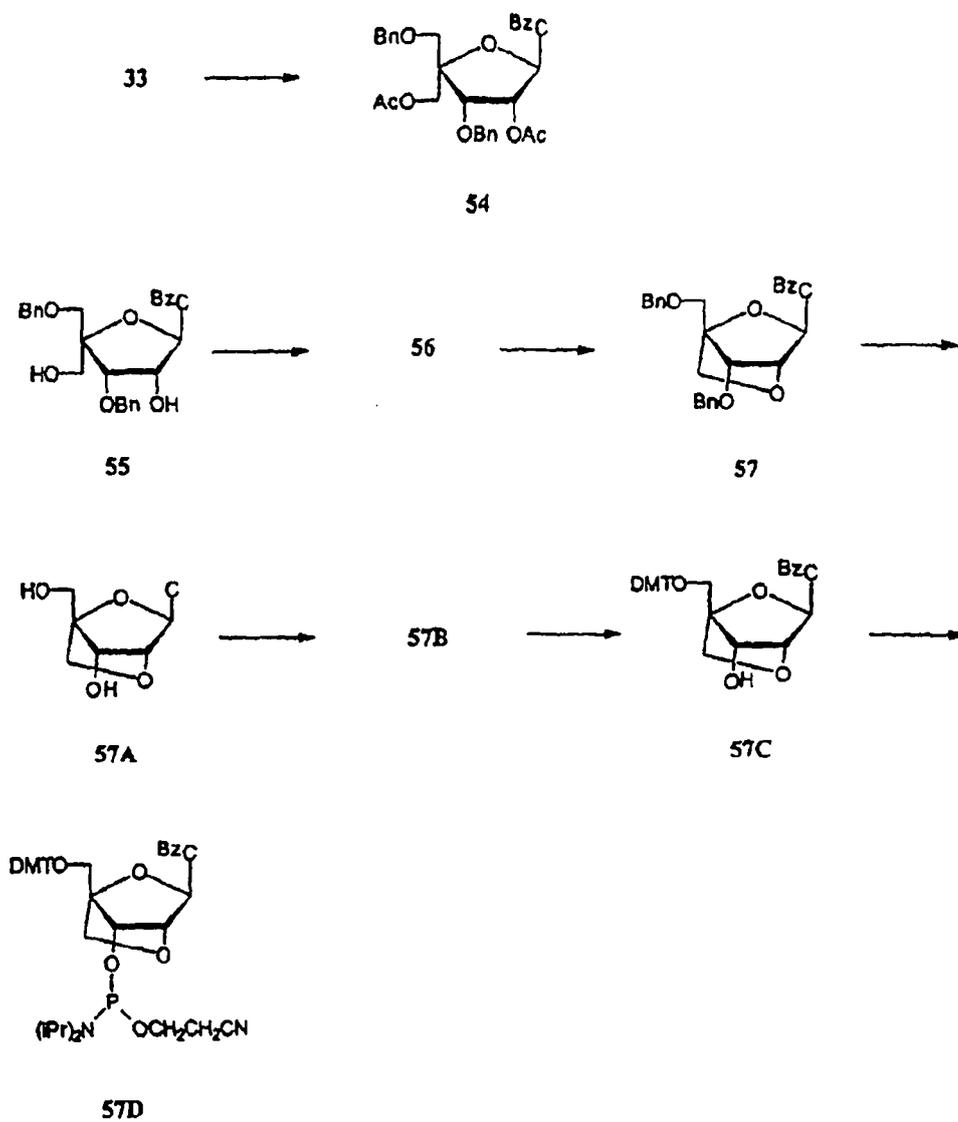


Fig. 30

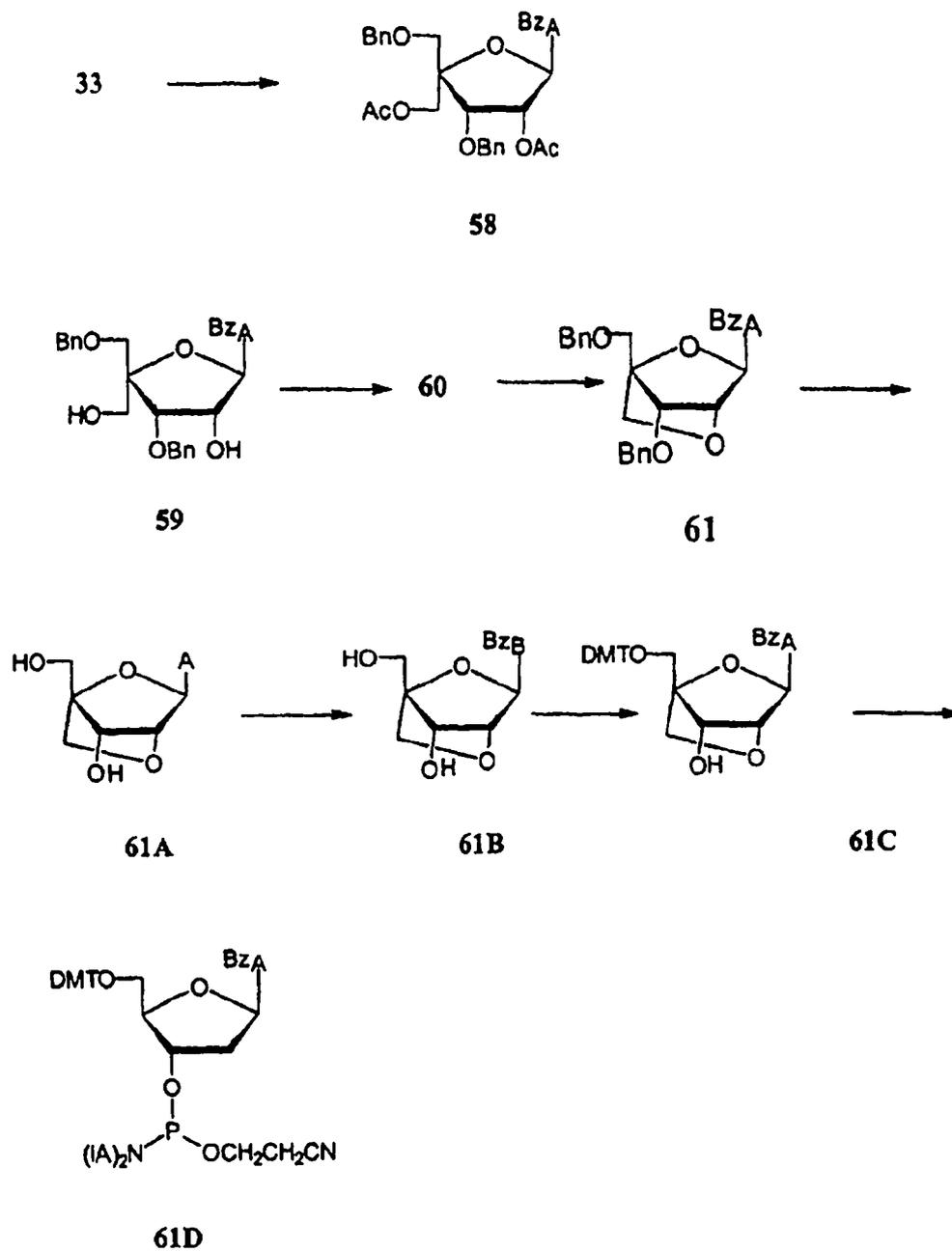


Fig. 31

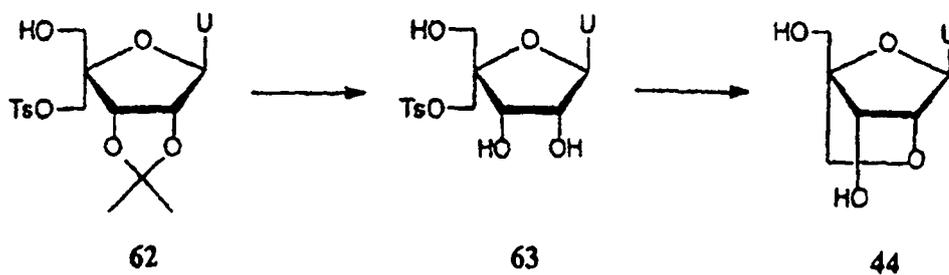


Fig. 32

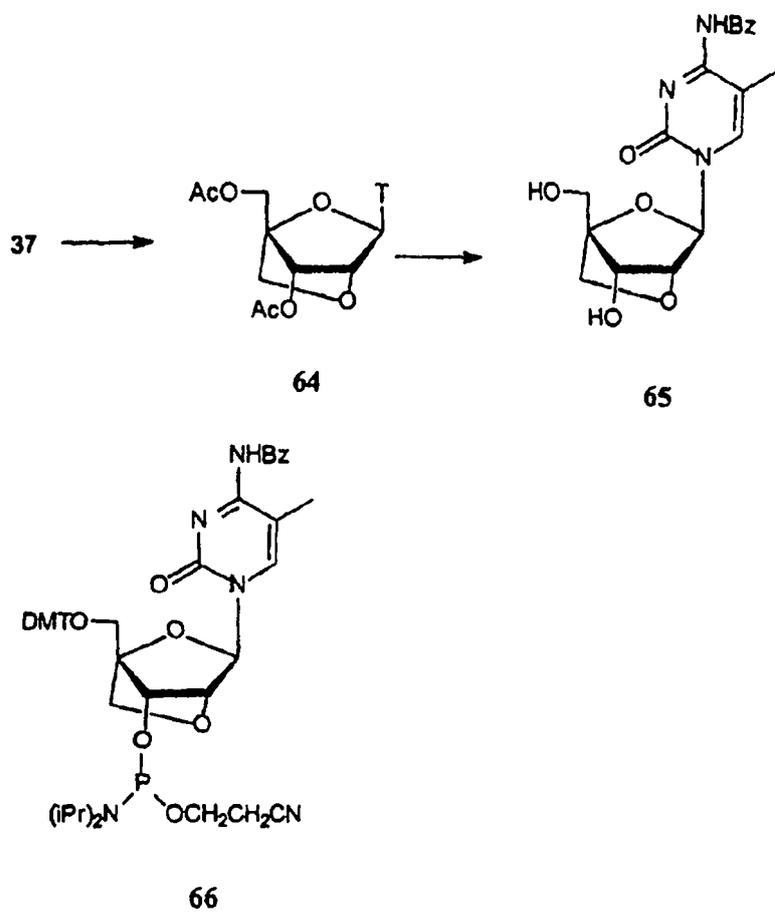


Fig. 33

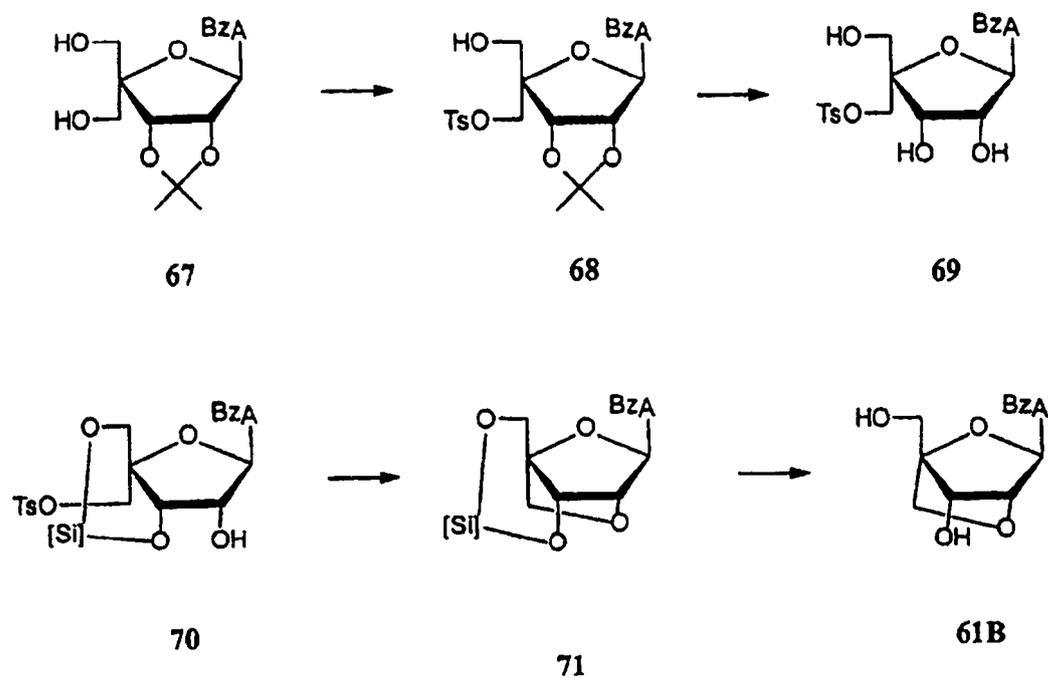


Fig. 34

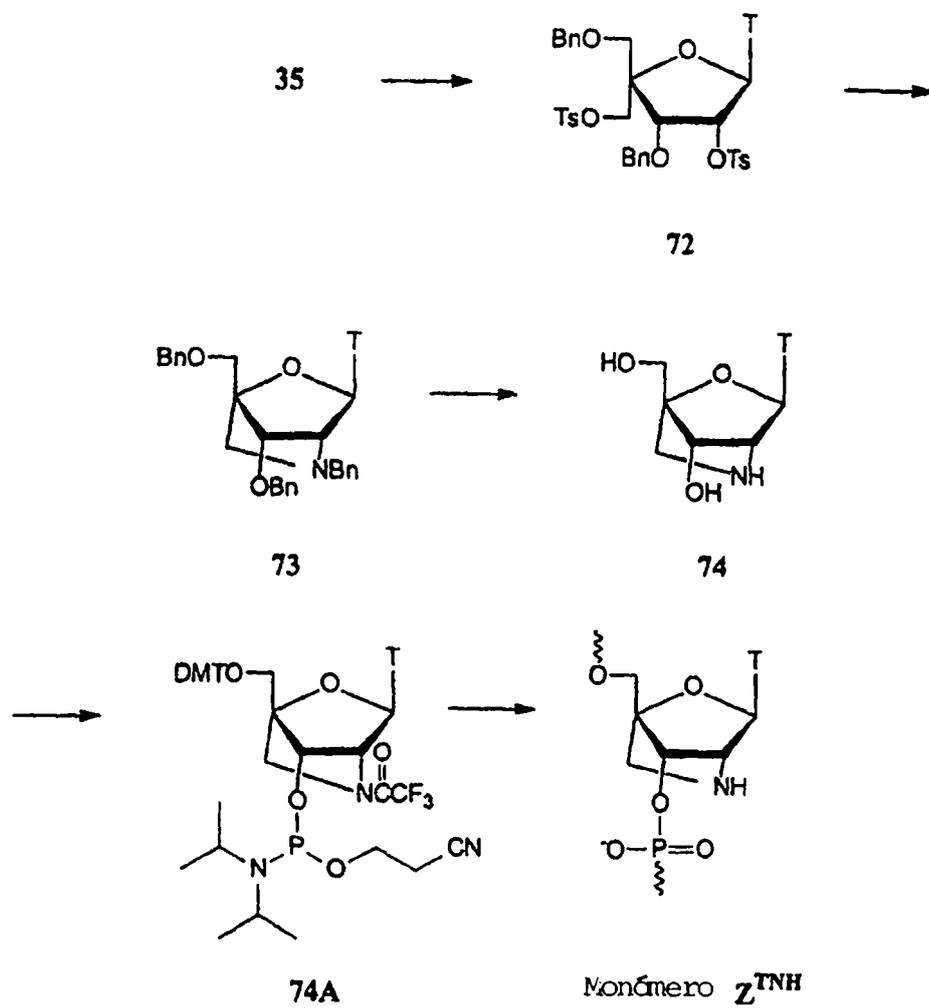


Fig. 35

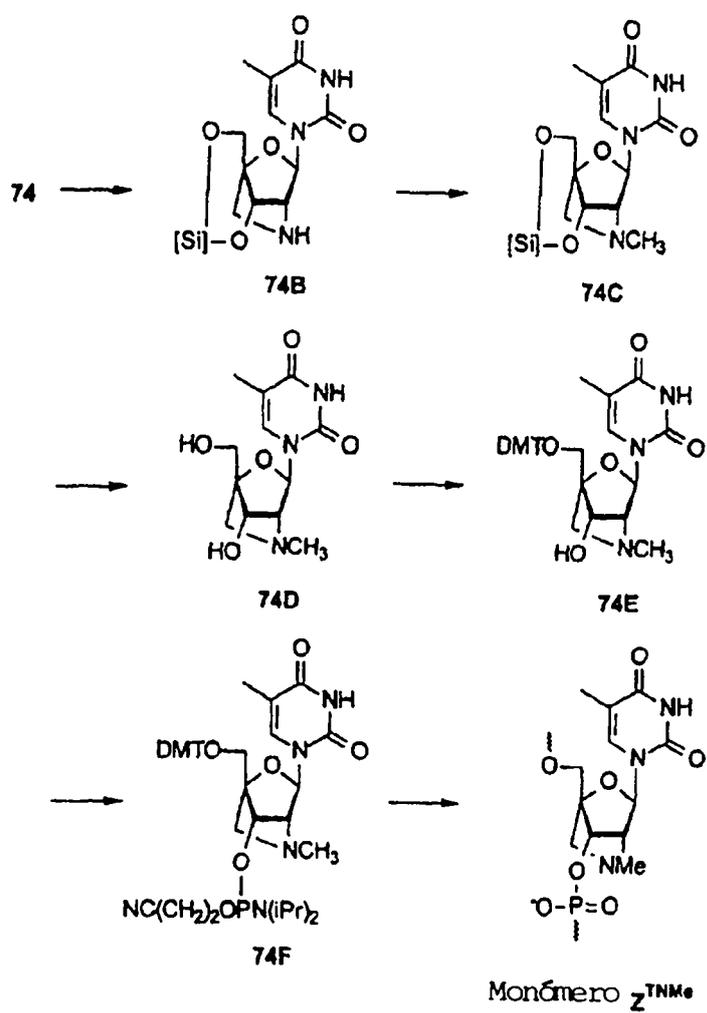


Fig. 36

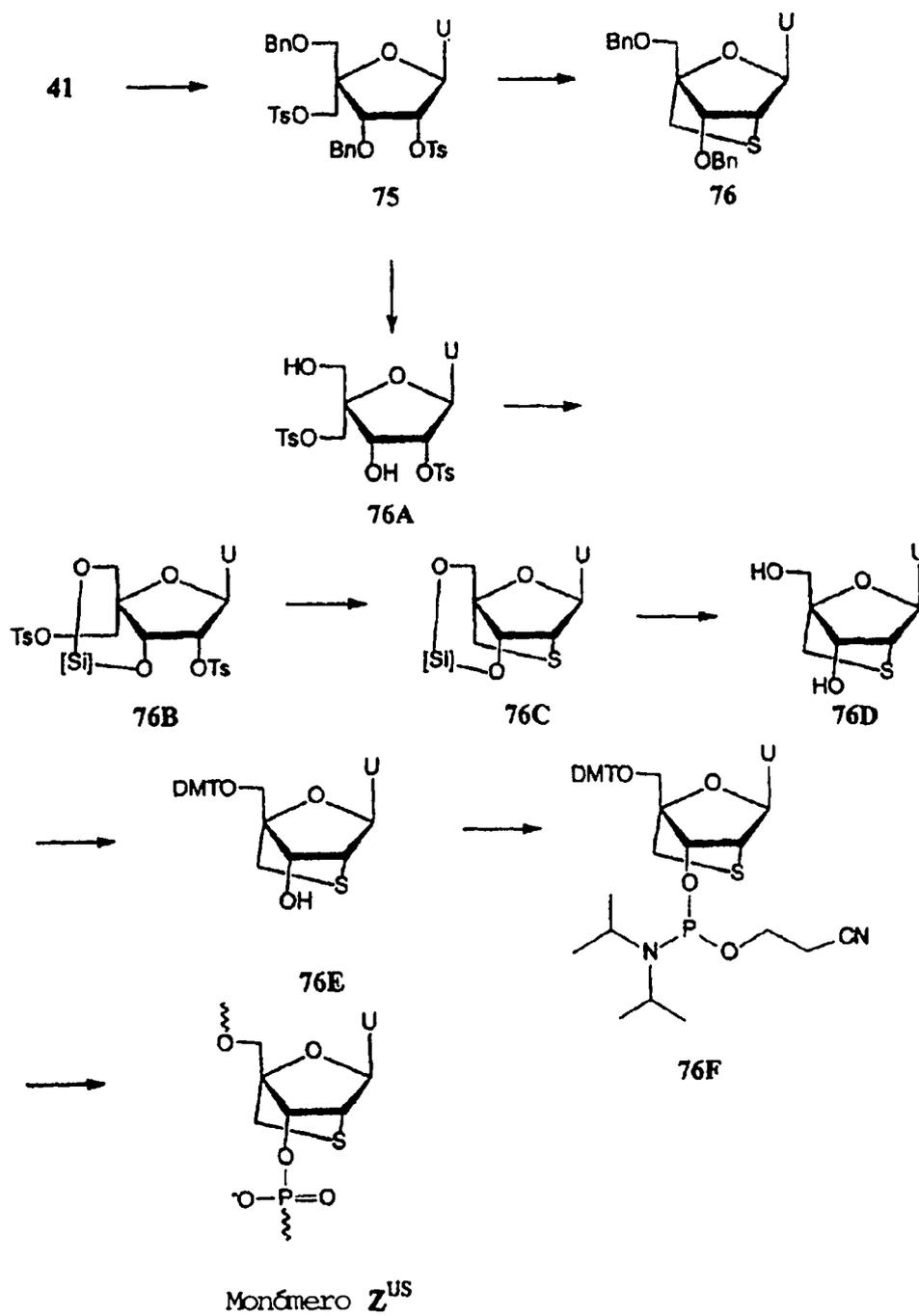
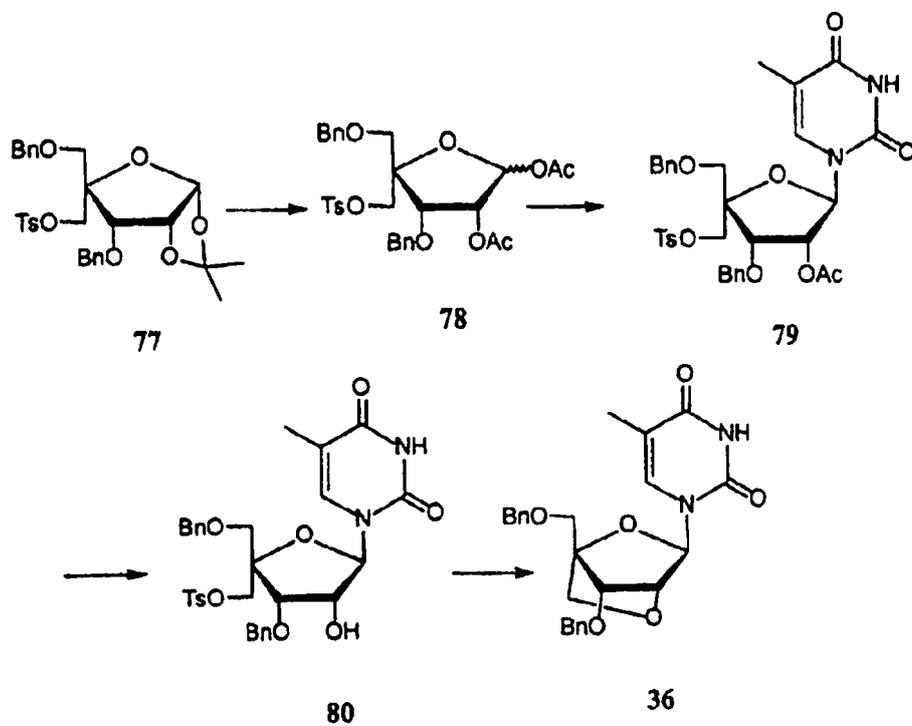


Fig. 37

**Fig. 38**

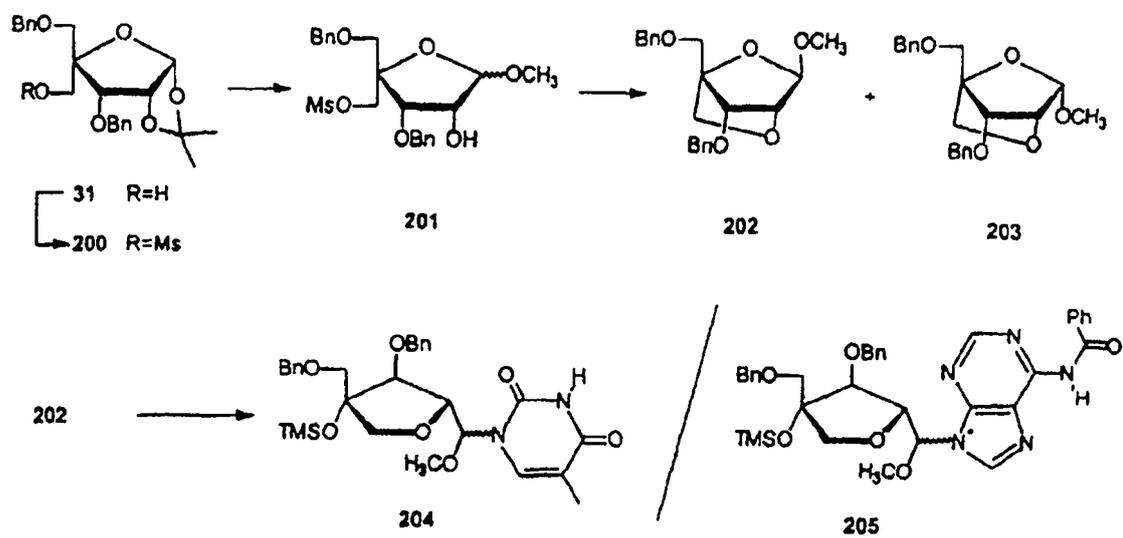


Fig. 39

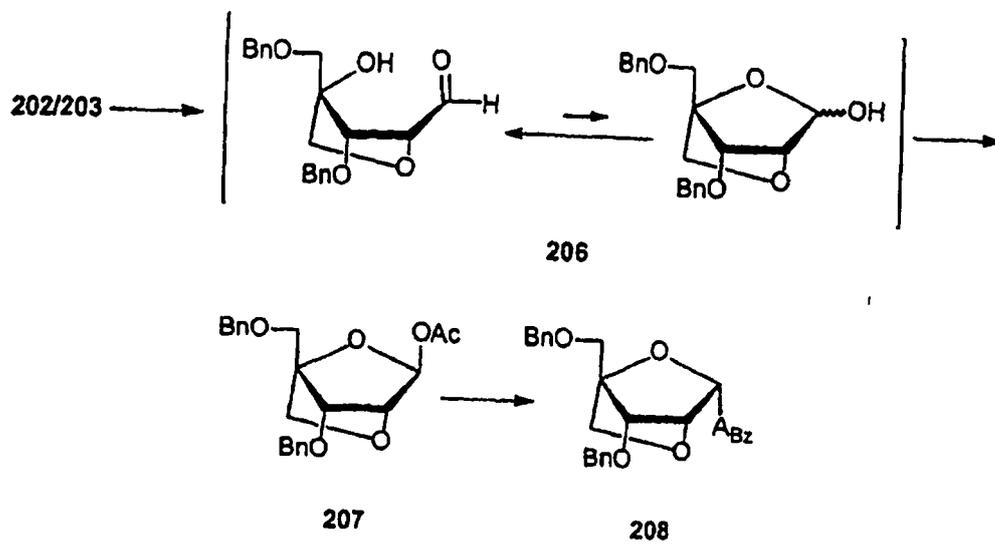


Fig. 40

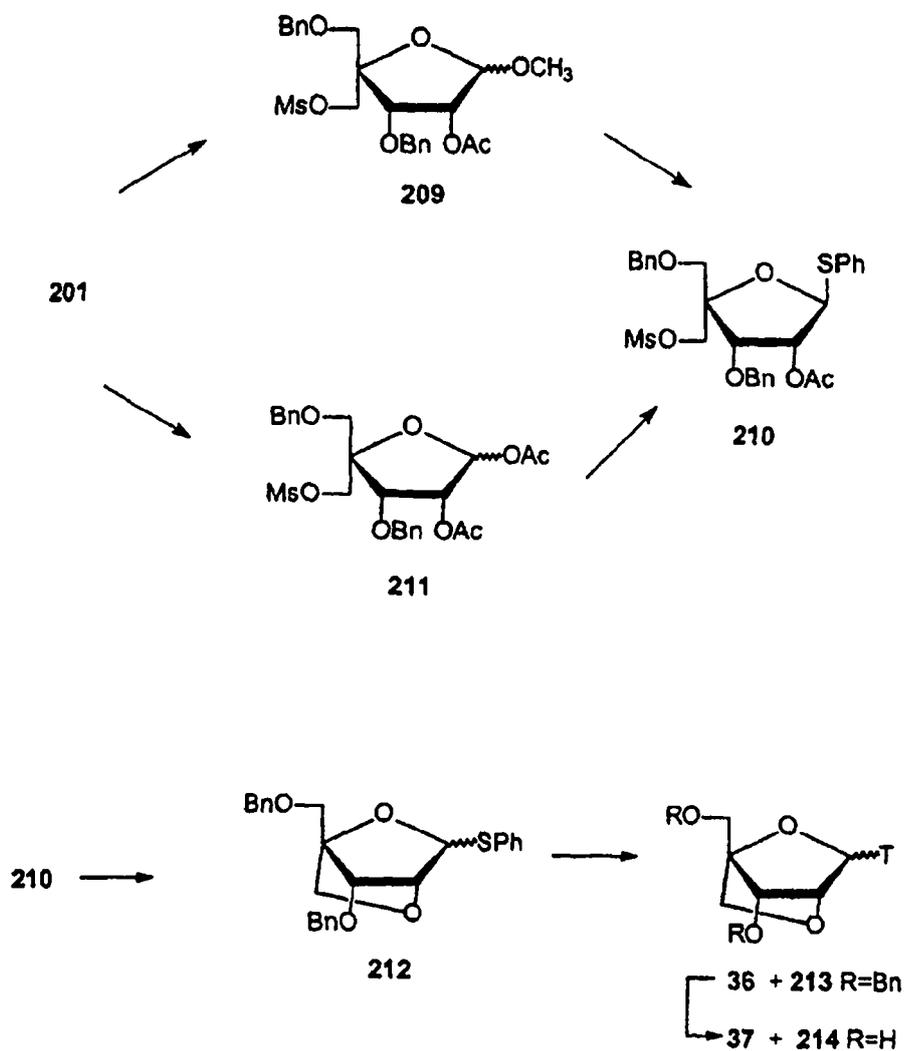


Fig. 41