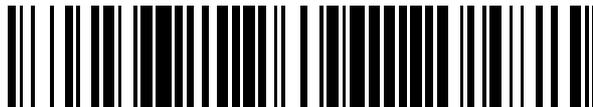


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 507**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
C07H 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08781239 .2**
96 Fecha de presentación: **01.07.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2176280**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

54 Título: **ANÁLOGOS DE ÁCIDO NUCLEICO BICÍCLICOS 6-DISUSTITUIDOS.**

30 Prioridad:
05.07.2007 US 948134 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2012

73 Titular/es:
Isis Pharmaceuticals, Inc.
2855 Gazelle Court
Carlsbad, CA 92010, US

72 Inventor/es:
SWAYZE, Eric, E. y
SETH, Punit, P.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 376 507 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

Análogos de ácido nucleico bicíclicos 6-disustituidos

Campo de la invención

5 En la presente invención se proporcionan nucleósidos bicíclicos 6-disustituidos, compuestos oligoméricos preparados a partir de los mismos y procedimientos *in vitro* del uso de los compuestos oligoméricos. Más particularmente, cada uno de los nucleósidos bicíclicos 6-disustituidos comprende un puente 2'-O-C(R₁)(R₂)-4' o 2'-O-C-(R₃)(R₄)-4' en el que cada R es, independientemente, un grupo sustituyente y R₁ y R₂ incluyen H. En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos se hibridan con un parte de un ARN diana dando como resultado la pérdida de función normal del ARN diana.

10 **Antecedentes de la invención**

La tecnología antisentido es un medio eficaz para reducir la expresión de uno o más productos génicos específicos y puede, por lo tanto, demostrar que es excepcionalmente útil en diversas aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico e investigación. Los nucleósidos modificados químicamente se usan rutinariamente, por incorporación en secuencias antisentido, para potenciar una o más propiedades, tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas, afinidad de unión o perfil de toxicidad reducido. Un grupo de modificaciones químicas de este tipo incluye nucleósidos bicíclicos en los que la parte furanosa del nucleósido incluye un puente de conecta dos átomos en el anillo de furanosa formando así un sistema anular bicíclico. Dichos nucleósidos bicíclicos poseen diversos nombres que incluyen ANB y ANC, por ácidos nucleicos bicíclicos o ácidos nucleicos cerrados, respectivamente.

20 En la bibliografía de patentes y científica se han preparado y descrito diversos ANB, véase por ejemplo: Singh y col., Chem Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y col., Tetrahedron. 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar y col., Bioorg. Med Chem Lett., 1998, 8, 2219-2222; Wengel y col., solicitud internacional PCT WO 98-DK393 19980914; Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039. Los ejemplos de Patentes de Estados Unidos expedidas y solicitudes publicadas incluyen por ejemplo: las Patentes de Estados Unidos 7.053.207, 6.770.748, 6.268.490 y 6.794.499 y las solicitudes de Estados Unidos publicadas 20040219565, 20040014959, 20030207941, 20040192918, 20030224377, 20040143114 y 20030082807.

Muchos ANC son tóxicos. Véase, por ejemplo, Swayze, E. E.; Siwkowski, A. M.; Wancewicz, E. V.; Migawa, M. T.; Wyrzykiewicz, T. K; Hung.G.; Monia, B.P.; Bennett, C. F. Los oligonucleótidos antisentido que contienen ácidos nucleicos cerrados mejoran la fuerza pero producen hepatotoxicidad significativa en animales. Nucl. Acids Res., doi: 10.1093/nar/gk11071 (diciembre del 2006, publicación por internet avanzada).

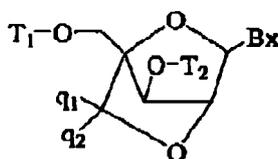
30 Por consiguiente, desde hace tiempo existe una necesidad de agentes que regulen específicamente la expresión de genes mediante mecanismos antisentido. En el presente documento se describen ANB 6-disustituidos o insaturados y compuestos antisentido preparados a partir de los mismos útiles para modular rutas de expresión de genes, incluyendo las que dependen de mecanismos de acción tales como enzimas RNasaH, ARNi y ARNbc, así como otros mecanismos antisentido basados en la degradación diana u ocupación diana. Un experto en la materia, una vez provisto de esta descripción, podrá, sin experimentación excesiva, identificar, preparar y utilizar compuestos antisentido para estos usos.

Breve resumen de la invención

40 En el presente documento se proporcionan nucleósidos bicíclicos 6-disustituidos, compuestos oligoméricos que comprenden estos nucleósidos bicíclicos y procedimientos de uso de los compuestos oligoméricos. En algunas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos confieren propiedades mejoradas a los compuestos oligoméricos en los que se incorporan.

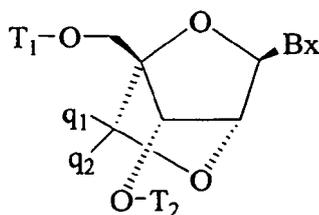
45 Las variables se definen individualmente con mayor detalle en el presente documento. Debe entenderse que los nucleósidos bicíclicos, compuestos oligoméricos y procedimientos de uso de los mismos proporcionados en el presente documento incluyen todas las combinaciones de las realizaciones descritas y variables definidas en su interior.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tiene la Fórmula I:



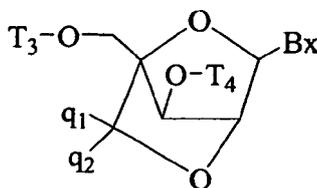
en la que:

- Bx es un resto de base heterocíclica;
 uno de T₁ y T₂ es H o un grupo protector hidroxilo y el otro de T₁ y T₂ es H, un grupo protector hidroxilo o un grupo reactivo de fósforo;
- 5 cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂;
 o q₁ y q₂ juntos son =C(q₃)(q₄);
- 10 cada uno de q₃ y q₄ es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido;
 cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂; y
 cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector,
- 15 en la que el grupo reactivo de fósforo es fosforamida, H-fosfonato, triéster fosfato o un auxiliar quiral que contiene fósforo.
- En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁ y q₂ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, cada uno q₁ y q₂ es, independientemente, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, metilo, etilo o propilo. En ciertas realizaciones, cada uno de q₁ y q₂ es metilo. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁ y q₂ es alquilo C₁-C₆ sustituido.
- En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁ y q₂ es alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁ y q₂ es alquilo C₁-C₆ sustituido en el que el grupo sustituyentes se selecciona entre OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁ u O-C(=O)NJ₁J₂ en el que cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁ y q₂ es alquilo C₁-C₆ sustituido en el que el grupo sustituyente se selecciona entre OJ₁, NJ₁J₂ o CN en el que cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆ o un grupo protector.
- En ciertas realizaciones, q₁ y q₂ juntos, son =C(q₃)(q₄). En ciertas realizaciones, cada uno de q₃ y q₄ es H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₃ y q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₃ y q₄ es metilo. En ciertas realizaciones, cada uno de q₃ y q₄ es metilo.
- 30 En ciertas realizaciones, cada uno de T₁ y T₂ es un grupo protector hidroxilo. En ciertas realizaciones, cada uno de dichos grupos protectores hidroxilo se selecciona, independientemente, entre acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropirano, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 2-trimetilsilietilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, benzoilo, p-fenilbenzoilo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, triisopropilsililo, benzoilformiato, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloilo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, triflato, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo o pixilo sustituido. En ciertas realizaciones, T₁ es acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo o 4,4'-dimetoxitritilo. En ciertas realizaciones, T₁ es 4,4'-dimetoxitritilo.
- En ciertas realizaciones, T₂ es un grupo reactivo de fósforo. En ciertas realizaciones, T₂ es un grupo reactivo de fósforo seleccionado entre diisopropilcianoetoxi fosforamida o H-fosfonato. En ciertas realizaciones, T₂ es diisopropilcianoetoxi fosforamida. En ciertas realizaciones, T₂ es diisopropilcianoetoxi fosforamida y cada uno de q₁ y q₂ es metilo. En ciertas realizaciones, T₂ es diisopropilcianoetoxi fosforamida y q₁ y q₂ juntos, son =C(q₃)(q₄) y cada uno de q₃ y q₄ es H.
- En ciertas realizaciones, Bx es una pirimidina, pirimidina sustituida, purina o purina sustituida. En ciertas realizaciones, Bx es uracilo, 5-metiluracilo, 5-propinil-uracilo, 5-tiazolo-uracilo, timina, citosina, 5-metilcitosina, 5-propinil-citosina, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina o 2,6-diaminopurina.
- 45 En ciertas realizaciones, cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₃.
- En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II:



II.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tienen la Fórmula III:



III

en la que independientemente para cada uno de dicho al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III:

- 5 Bx es un resto de base heterocíclica;
 cada uno de T₃ y T₄ es, independientemente, un grupo de unión de internucleósidos que une el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III al compuesto oligomérico, o uno de T₃ y T₄ es un grupo de unión de internucleósidos que une el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III al compuesto oligomérico y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo terminal 5' ó 3';
 10 cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂;
 o q₁ y q₂ juntos son -C(q₃)(q₄);
 15 cada uno de q₃ y q₄ es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido;
 cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂; y
 cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector
 20 y en la que la expresión "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero que tiene al menos una región que es capaz de hibridar para dar una molécula de ácido nucleico.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuesto oligoméricos, comprendiendo cada uno al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III en la que al menos uno de q₁ y q₂ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, metilo, etilo o propilo. En ciertas realizaciones, cada uno de q₁ y q₂ es metilo.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos comprendiendo cada uno al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, en la que al menos cada q₁ o cada q₂ es alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, al menos cada q₁ o cada q₂ es alquilo C₁-C₆ sustituido en el que el grupo sustituyente se selecciona entre OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁ u O-C(=O)NJ₁J₂ en el que cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector. En ciertas realizaciones, al menos cada q₁ o cada q₂ es alquilo C₁-C₆ sustituido, en el que el grupo sustituyente se selecciona entre OJ₁, NJ₁J₂ o CN, en el que cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆ o un grupo protector.

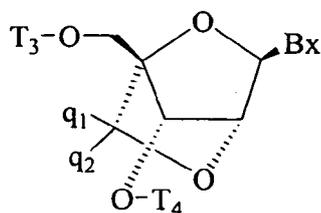
En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos, comprendiendo cada uno al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, en la que para cada nucleósido bicíclico q₁ y q₂ juntos son =C(q₃)(q₄). En ciertas realizaciones, cada q₃ y cada q₄ es H. En ciertas realizaciones, al menos cada q₃ o cada q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, al menos cada q₃ o cada q₄ es metilo. En ciertas realizaciones, cada q₃ y cada q₄ es metilo.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos comprendiendo cada uno al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III y comprendiendo adicionalmente al menos un grupo terminal 3' ó 5'.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos comprendiendo cada uno al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III y comprendiendo adicionalmente una secuencia continua de nucleósidos unidos, en la que cada grupo de unión de internucleósidos es, independientemente, un fosfodiéster o fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada grupo de unión de internucleósidos es un fosforotioato.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos comprendiendo cada uno al menos un

nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV:

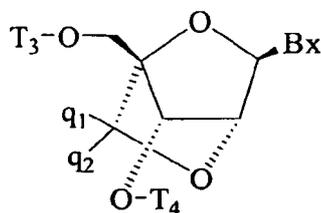


IV.

5 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos, comprendiendo cada uno al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula III. En ciertas realizaciones, la al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos continuos que tiene la Fórmula III se sitúan en el extremo 3' o el 5' del compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, la al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos continuos que tiene la Fórmula III se sitúa en el extremo 3' o el 5' del compuesto oligomérico y al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III situado en el otro extremo 3' o el 5' del compuesto oligomérico.

10 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos, teniendo cada uno una región interna de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas que separan dos regiones externas que comprenden independientemente de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula III. En ciertas realizaciones, cada unidad monomérica en la región interna es básicamente un β -D-2'-desoxirribonucleósido. En ciertas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 14 β -D-2'-desoxirribonucleósidos. En ciertas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 β -D-2'-desoxirribonucleósidos. En ciertas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 β -D-2'-desoxirribonucleósidos. En ciertas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 β -D-2'-desoxirribonucleósidos y cada región externa comprende independientemente de 2 a aproximadamente 3 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III. En ciertas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 β -D-2'-desoxirribonucleósidos y cada región externa comprende independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III. En ciertas realizaciones, la región interna comprende 10 β -D-2'-desoxirribonucleósidos y cada región externa comprende independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III. En ciertas realizaciones, cada región externa comprende independientemente de 2 a aproximadamente 3 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III y la región interna comprende 14 β -D-2'-desoxirribonucleósidos. En ciertas realizaciones, cada región externa independientemente comprende 2 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III y la región interna comprende 14 β -D-2'-desoxirribonucleósidos.

25 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos, teniendo cada uno una región interna de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas que separan dos regiones externas que comprenden independientemente de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula IV:

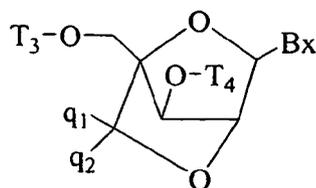


IV.

35 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, comprendiendo de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 subunidades monoméricas de longitud. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, comprendiendo de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 subunidades monoméricas de longitud. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, comprendiendo de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 subunidades monoméricas de longitud. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, comprendiendo de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas de longitud.

En ciertas realizaciones, se proporcionan procedimientos para inhibir la expresión génica que comprenden poner en contacto una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico que comprende al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III.

- 5 En ciertas realizaciones, se proporcionan procedimientos que comprenden poner en contacto una célula con un compuesto oligomérico que comprende al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula III:



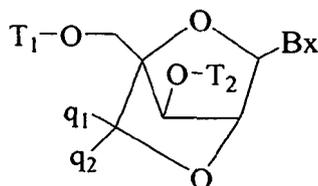
III

en la que independientemente para cada uno de dicho al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III:

- Bx es un resto de base heterocíclica;
- 10 cada uno de T₃ y T₄ es, independientemente, un grupo de unión de internucleósidos que une el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III al compuesto oligomérico o uno de T₃ y T₄ es un grupo de unión de internucleósidos que une el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III al compuesto oligomérico y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo terminal 5' ó 3';
- 15 cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂;
- o q₁ y q₂ juntos son =C(q₃)(q₄);
- 20 cada uno de q₃ y q₄ es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido;
- 25 cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂;
- cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector; y
- en la que dicho compuesto oligomérico comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 subunidades monoméricas y es complementario a un ARN diana.

- En ciertas realizaciones, la célula está en un animal. En ciertas realizaciones, la célula está en un ser humano. En ciertas realizaciones, el ARN diana se selecciona entre ARNm, pre-ARNm y micro ARN. En ciertas realizaciones, el ARN diana es ARNm. En ciertas realizaciones, el ARN diana es ARNm humano. En ciertas realizaciones, por
- 30 consiguiente el ARN diana se escinde inhibiendo su función. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente evaluar la actividad antisentido de dicho compuesto oligomérico sobre dicha célula. En ciertas realizaciones, la evaluación comprende detectar los niveles de ARN diana. En ciertas realizaciones, la evaluación comprende detectar los niveles de una proteína. En ciertas realizaciones, la evaluación comprende la detección de uno o más efectos fenotípicos.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la fórmula:



- 35 en la que:
- Bx es un resto de base heterocíclica;
- 40 uno de T₁ y T₂ es H o un grupo protector hidroxilo y el otro de T₁ y T₂ es H, un grupo protector hidroxilo o un grupo reactivo de fósforo;
- cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂;

o q_1 y q_2 juntos son $=C(q_3)(q_4)$;

cada uno de q_3 y q_4 es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido;

cada uno de J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 , aminoalquilo C_1-C_6 sustituido o un grupo protector, cada uno de J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 , aminoalquilo C_1-C_6 sustituido o un grupo protector; y

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , N_3 , CN , $C(=O)OJ_1$, $C(=O)NJ_1J_2$, $C(=O)J_1$, $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=O)NJ_1J_2$ o $N(H)C(=S)NJ_1J_2$.

En una realización, al menos uno de q_1 y q_2 es alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido. En otra realización, tanto q_1 como q_2 son alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido. En una realización más, tanto q_1 como q_2 son, independientemente, metilo. En otra realización, al menos uno de q_1 y q_2 es alquilo C_1-C_6 sustituido. En una realización más, al menos uno de q_1 y q_2 es $(CH_2)_n-N(H)C(=O)(CH_2)_n-NJ_1J_2$, $(CH_2)_n-N(H)C(=S)NJ_1J_2$, $(CH_2)_n-O-C(=O)NJ_1J_2$ o $(CH_2)_n-C(=O)NJ_1J_2$ en las que un n preferido es 1.

Además, en el presente documento se proporcionan sustituyentes insaturados en el puente, en el que q_1 y q_2 junto con los enlaces que los unen al átomo de carbono 6 del puente son $=C(q_3)(q_4)$. En una realización, cada uno de q_3 y q_4 es, independientemente, H. En otra realización, al menos uno de q_3 y q_4 es halógeno, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido. En una realización más, al menos uno de q_3 y q_4 es metilo. En otra realización, tanto q_3 como q_4 son, independientemente, metilo.

En una realización, cada uno de T_1 y T_2 es un grupo protector hidroxilo, en el que los grupos protectores hidroxilo preferidos incluyen acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropirano, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 2-trimetilsilietilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, benzoílo, p-fenilbenzoílo, 2,6-diclorobencilo, difenil-metilo, p-nitrobencilo, trifenilmetil (tritilo), 4,4'-dimetoxitritilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, triisopropilsililo, benzoilformiato, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloílo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, triflato, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo, 9-fenilxantina-9-il (Pixilo) y 9-(p-metoxifenil)xantina-9-ilo (MOX).

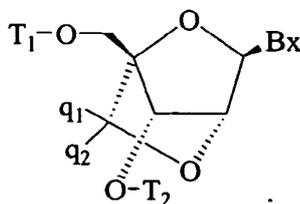
En una realización, T_1 es acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo o 4,4'-dimetoxitritilo, en el que un grupo preferido es 4,4'-dimetoxitritilo. En ciertas realizaciones, T_1 es 4,4'-dimetoxitritilo y T_2 es diisopropilcianoetoxi fosforamidita.

En una realización, T_2 es un grupo reactivo de fósforo, en el que los grupos reactivos de fósforo preferidos incluyen diisopropilcianoetoxi fosforamidita y H-fosfonato.

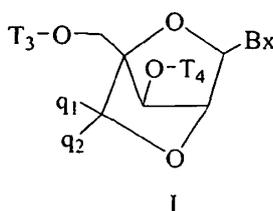
En una realización, Bx es una pirimidina, pirimidina sustituida, purina o purina sustituida. En ciertas realizaciones, Bx es uracilo, 5-metiluracilo, 5-metilcitosina, 5-tiazolo-uracilo, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina o 2,6-diaminopurina.

En una realización, cada uno de J_1 y J_2 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_3 .

En una realización, los nucleósidos bicíclicos tienen la configuración:



Además, se proporcionan compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula I:



en la que:

Bx es un resto de base heterocíclica;

T₃ es hidroxilo, un hidroxilo protegido, un grupo conjugado unido o un grupo de unión de internucleósidos unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una unidad monomérica o un compuesto oligomérico;

T₄ es hidroxilo, un hidroxilo protegido, un grupo conjugado unido o un grupo de unión de internucleósidos unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una unidad monomérica o un compuesto oligomérico;

en la que al menos uno de T₃ y T₄ es un grupo de unión de internucleósidos unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una unidad monomérica o un compuesto oligomérico;

cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂;

o q₁ y q₂ juntos son =C(q₃)(q₄);

cada uno de q₃ y q₄ es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido;

cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆ sustituido, aminoalquilo C₁-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ sustituido o un grupo protector, cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆ sustituido, aminoalquilo C₁-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ sustituido o un grupo protector; y

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂.

En una realización, al menos uno de q₁ y q₂ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En otra realización, tanto q₁ como q₂ son alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En una realización más, tanto q₁ como q₂ son, independientemente, metilo. En otra realización, al menos uno de q₁ y q₂ es alquilo C₁-C₆ sustituido. En una realización más, al menos uno de q₁ y q₂ es (CH₂)_n-N(H)C(=O)NJ₁J₂, (CH₂)_n-N(H)C(=S)NJ₁J₂, (CH₂)_n-O-C(O)NJ₁J₂ o (CH₂)_n-C(=O)NJ₁J₂ en los que un n preferido es 1.

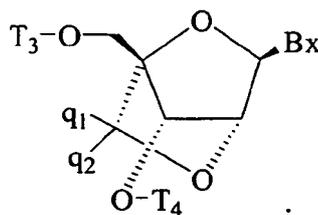
Además, se proporcionan compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico que comprende un sustituyente insaturado en el puente, en el que q₁ y q₂ junto con los enlaces que los unen al átomo de carbono 6 del puente son =C(q₃)(q₄). En una realización, cada uno de q₃ y q₄ es, independientemente, H. En otra realización, al menos uno de q₃ y q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En una realización más, al menos uno de q₃ y q₄ es metilo. En otra realización, tanto q₃ como q₄ son, independientemente, metilo.

En una realización, T₃ es H o un grupo protector hidroxilo. En otra realización T₃ es un grupo de unión de internucleósidos unido a un nucleósido, un nucleótido o una unidad monomérica. En una realización más, T₃ es un grupo de unión de internucleósidos unido a un oligonucleósido o un oligonucleótido. En otra realización, T₃ es un grupo de unión a internucleósidos unido a un compuesto oligomérico.

En una realización, T₄ es H o un grupo protector hidroxilo. En otra realización, T₄ es un grupo de unión de internucleósidos unido a un nucleósido, un nucleótido o una unidad monomérica. En una realización más, T₄ es un grupo de unión de internucleósidos unido a un oligonucleósido o un oligonucleótido. En otra realización, T₄ es un grupo de unión de internucleósidos unido a un compuesto oligomérico.

En una realización, al menos uno de T₃ y T₄ comprende un grupo de unión de internucleósidos seleccionado entre fosfodiéster o fosforotioato.

En una realización, se proporcionan compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico que tiene la configuración:



En una realización, se proporcionan compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico de fórmula I, comprendiendo una secuencia continua de nucleósidos unidos, en la que cada grupo de unión de internucleósidos es, independientemente, un fosfodiéster o un fosforotioato.

5 En una realización, los compuestos oligoméricos comprenden al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos continuos que tiene la Fórmula I. En otra realización, la región de al menos dos nucleósidos bicíclicos continuos que tiene la Fórmula I se sitúa en el extremo 3' o el 5' del compuesto oligomérico. En una realización más, una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos continuos que tiene la Fórmula I se sitúa en el extremo 3' o el 5' del compuesto oligomérico y al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula I se sitúa en el otro del extremo 3' o el 5' del compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que tienen una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos de fórmula I situados en el extremo 3' o el 5' y al menos un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula I situada en el otro del extremo 3' o el 5' del compuesto oligomérico.

10 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que comprenden uno o dos nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I en el extremo 5' y dos o tres nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I en el extremo 3'. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que comprenden uno o dos nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I en el extremo 5', dos o tres nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I en el extremo 3' y una región interna de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 β-D-desoxirribonucleósidos. En ciertas realizaciones, la región interna del compuesto oligomérico abierto comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 β-D-desoxirribonucleósidos. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que comprenden de 10 a 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud.

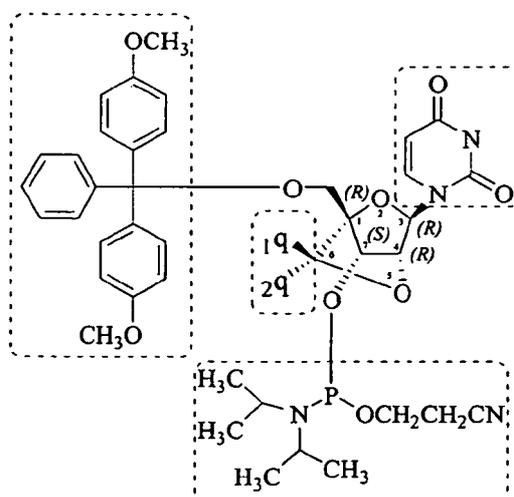
20 En una realización, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. En otra realización, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. En una realización más, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. En otra realización, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud.

Además, se proporcionan procedimientos para la inhibición génica que comprenden poner en contacto una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico de la invención.

Descripción detallada de la invención

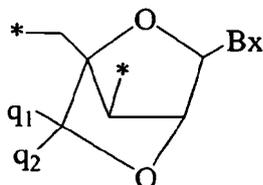
30 En el presente documento se proporcionan nucleósidos bicíclicos 6-disustituidos, compuestos oligoméricos preparados a partir de los mismos y procedimientos para usar los compuestos oligoméricos. Más particularmente, cada uno de los nucleósidos bicíclicos 6-disustituidos comprende un puente entre las posiciones 4' y 2' de la porción de ribosa que tiene una de la fórmulas: 2'-O-C(q₁)(q₂)-4' o 2'-O-C[-(q₃)(q₄)]-4'. En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones oligoméricas se designan para hibridar en una porción de un ARN diana. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos pueden usarse en el diseño de aptámeros que son compuestos oligoméricos capaces de unirse a proteínas aberrantes en una configuración *in vivo*.

40 Los nucleósidos bicíclicos 6-disustituidos se preparan generalmente teniendo grupos reactivos protegidos ortogonalmente y que comprenden adicionalmente un grupo reactivo de fósforo. Dichos nucleósidos bicíclicos son útiles como subunidades monoméricas para la síntesis de oligómeros. En ciertas realizaciones, un ejemplo ilustrativo de una subunidad monomérica de este tipo como se proporciona en el presente documento tiene la fórmula:



en la que los grupos rodeados por cajas de líneas discontinuas son variables. El monómero de nucleósido bicíclico mostrado se denomina genéricamente como una dimetoxitritil fosforamidita o más formalmente usando la nomenclatura de nombres de la IUPAC como (1S,3R,4R,7S)-7-[2-cianoetoxi(diiso-propilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-dimetil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (cuando tanto q_1 como q_2 son metilo).

- 5 En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos 6-disustituídos proporcionados en el presente documento se representan en la Fórmula Ia:



Ia

- 10 en la que cada uno de los asteriscos es, independientemente, un hidroxilo, un hidroxilo protegido, un grupo conjugado opcionalmente unido, un grupo indicador, un grupo terminal, un grupo reactivo de fósforo, un enlace de internucleósido que conecta uno o más nucleósidos, u otro grupo desvelado en el presente documento o útil en una tecnología antisentido.

Bx es un resto de base heterocíclica;

- 15 cada uno de q_1 y q_2 es, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, alquino C_2-C_{12} , alquino C_2-C_{12} sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , SOJ_1 , SO_2J_1 , NJ_1J_2 , N_3 , CN , $C(=O)OJ_1$, $C(=O)NJ_1J_2$, $C(=O)J_1$, $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=NH)NJ_1J_2$, $N(H)C(=O)NJ_1J_2$ o $N(H)C(=S)NJ_1J_2$;

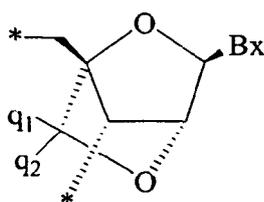
o q_1 y q_2 juntos son $=C(q_3)(q_4)$;

cada uno de q_3 y q_4 es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido;

- 20 cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 , OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , N_3 , CN , $C(=O)OJ_1$, $C(=O)NJ_1J_2$, $C(=O)J_1$, $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=O)NJ_1J_2$ o $N(H)C(=S)NJ_1J_2$; y

cada uno de J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 , aminoalquilo C_1-C_6 o un grupo protector.

- 25 En ciertas realizaciones, se proporcionan se proporcionan nucleósidos bicíclicos 6-disustituídos que tienen la Fórmula Ia y que tienen adicionalmente la configuración ilustrada en la Fórmula IIa:



- 30 En ciertas realizaciones, se proporcionan procedimientos en los que una célula entra en contacto con al menos uno de los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento, en la que el compuesto oligomérico es complementario a un ARN diana. La célula puede residir en un animal, preferentemente un ser humano. El ARN diana se selecciona entre cualquier ARN que dé como resultado algún beneficio, pero preferentemente ARNm, pre-ARNm o micro ARN. En ciertas realizaciones, el ARN diana se escinde como resultado de la interacción con el compuesto oligomérico, inhibiendo por lo tanto su función. La eficacia de los procedimientos proporcionados en el presente documento puede evaluarse considerando una diversidad de criterios o puntos finales, tales como la evaluación de la actividad antisentido detectando los niveles de un ARN diana, detectando el nivel de una proteína o detectando uno o más efectos fenotípicos.

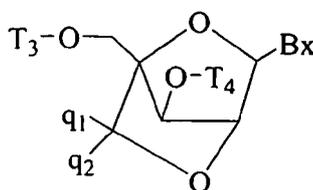
- 35 Los nucleósidos bicíclicos 6-disustituídos proporcionados en el presente documento son útiles para modificar los compuestos oligoméricos en una o más posiciones. Dichos compuestos oligoméricos modificados pueden describirse como que tienen un motivo particular. El término "motivo" se refiere al patrón de nucleósidos en un compuesto oligomérico. El patrón se determina por el posicionamiento de nucleósidos que tienen grupos de azúcares no modificados (β -D-ribonucleósidos y/o β -D-desoxirribonucleósidos) y/o modificados en un compuesto oligomérico. El tipo de enlace de base heterocíclica e internucleósidos usados en cada posición es variable y no es

un factor en la determinación del motivo de un compuesto oligomérico. La presencia de uno o más grupos diferentes que incluyen, pero sin limitación, grupos de protección y grupos conjugados también es un factor en la determinación del motivo.

5 Ciertos motivos que pueden prepararse usando los nucleósidos modificados proporcionados en el presente documento incluyen pero sin limitación un motivo abierto, un motivo de hemímero, un motivo de mero en bloque, un motivo completamente modificado, un motivo posicionalmente modificado y un motivo alternante. Junto con estos motivos también pueden usarse una gran diversidad de enlaces de internucleósidos, incluyendo pero sin limitación enlaces de fosfodiéster y fosforotioato usados de forma uniforme o en combinación. El posicionamiento de los nucleósidos modificados proporcionados en el presente documento y el uso de estrategias de unión puede optimizarse fácilmente para maximizar la actividad de un compuesto oligomérico frente a una diana seleccionada.

10 Las patentes de Estados Unidos representativas que muestran la preparación de motivos representativos incluyen, pero sin limitación, 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922, algunos de los cuales son propiedad comúnmente de la presente solicitud. También se desvelan motivos en las Solicitudes Internacionales PCT/US2005/019219, presentada el 2 de junio de 2005 y publicada como WO 2005/121371 el 22 de diciembre de 2005, y PCT/US2005/019220, presentada el 2 de junio de 2005, y publicada como WO 2005/121372 el 22 de diciembre de 2005.

20 Como se usa en el presente documento el término "gapmer" o "compuesto oligomérico abierto" se refiere a un compuesto oligomérico que comprende una secuencia continua de nucleósidos que tiene 3 regiones, una región interna que tiene una región externa en cada uno de los extremos 5' y 3'. La región interna se diferencia de las regiones externas por tener diferentes grupos de azúcares. Los tipos de nucleósidos que se usan generalmente para diferencial las regiones de un compuesto oligomérico abierto incluyen β -D-ribonucleósidos, β -D-2'-desoxirribonucleósidos, nucleósidos 2'-modificados, nucleósidos 4'-tio modificados, nucleósidos 4'-tio-2'-modificados, y nucleósidos de azúcares bicíclicos modificados. Cada una de las regiones de un compuesto oligomérico abierto está modificada básicamente de forma uniforme, por ejemplo, los grupos de azúcares son idénticos, teniendo la región interna diferentes grupos de azúcares que cada una de las regiones externas. La región interna (el gap) comprende generalmente β -D-desoxirribonucleósidos pero puede ser una secuencia de nucleósidos de azúcares modificados. Un compuesto oligomérico abierto preferido, como se proporciona en el presente documento, comprende una región interna de β -D-desoxirribonucleósidos con cada una de las regiones externas que comprenden nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III.



III

30 En ciertas realizaciones, cada una de las regiones de un compuesto oligomérico abierto están modificadas básicamente de forma uniforme, por ejemplo, los grupos de azúcares son básicamente idénticos, teniendo la región interna diferentes grupos de azúcares, que cada una de las regiones externas. La región interna o el gap generalmente comprende β -D-desoxirribonucleósidos, pero puede ser una secuencia de nucleósidos de azúcares modificados. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos abiertos comprenden una región interna de β -D-desoxirribonucleósidos, comprendiendo ambas regiones externas nucleósidos modificados. Los ejemplos de compuestos oligoméricos abiertos se ilustran en la sección de ejemplos.

40 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que comprenden uno o dos nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I en el extremo 5', dos o tres nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I en el extremo 3' y una región interna de 10 a 16 nucleósidos. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que comprenden un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula I en el extremo 5', dos nucleósidos bicíclicos que tienen la fórmula I en el extremo 3' y una región interna de 10 a 16 nucleósidos. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que comprenden un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula I en el extremo 5', dos nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I en el extremo 3' y una región interna de 10 a 14 nucleósidos. En ciertas realizaciones, la región interna es básicamente una secuencia continua de β -D-desoxirribonucleósidos. En otra realización, se proporcionan compuestos oligoméricos que incluyen adicionalmente uno o más grupos terminales que incluyen pero sin limitación nucleósidos adicionales modificados o no modificados o grupos de conjugados unidos.

50 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que son de aproximadamente 10 a aproximadamente 21 nucleósidos de longitud. En otra realización, se proporcionan compuestos oligoméricos

abiertos que son de aproximadamente 12 a aproximadamente 16 nucleósidos de longitud. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos abiertos que son de aproximadamente 12 a aproximadamente 14 nucleósidos de longitud.

5 Las expresiones "sustituyente" y "grupo sustituyente", como se usan en el presente documento, significa que incluyen grupos que se añaden típicamente a otros grupos o precursores para mejorar las propiedades deseadas o dar los efectos deseados. Los grupos sustituyentes pueden protegerse o desprotegerse y pueden añadirse a un sitio disponible o a muchos sitios disponibles en un precursor. Los grupos sustituyentes pueden también estar sustituidos adicionalmente con otros grupos sustituyentes y pueden unirse directamente o mediante un grupo de enlace, tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo a un precursor. Dichos grupos incluyen, sin limitación, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo (-C(O)R_{aa}), carboxilo (-C(O)O-R_{aa}), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxi sustituido (-O-R_{aa}), arilo, aralquilo, heterocíclicos, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-NR_{bb}R_{cc}), imino (=NR_{bb}), amido (-C(O)N-R_{bb}R_{cc} o -N(R_{bb})C(O)R_{aa}), azido (-N₃), nitro (-NO₂), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)NR_{bb}R_{cc} o -N(R_{bb})C(O)OR_{aa}), ureido (-N(R_{bb})C(O)NR_{bb}R_{cc}), tioureido (-N(R_{bb})C(S)NR_{bb}R_{cc}), guanidinilo (-N(R_{bb})C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}), amidinilo (-C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc} o -N(R_{bb})C(NR_{bb})R_{aa}), tiol (-SR_{bb}), sulfínilo (-S(O)R_{bb}), sulfonilo (-S(O)₂R_{bb}), sulfonamidilo (-S(O)₂NR_{bb}R_{cc} o -N(R_{bb})-S(O)₂R_{bb}) y grupos conjugados, en los que cada R_{aa}, R_{bb} y R_{cc} es, independientemente, H, un grupo químico funcional opcionalmente unido o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida, incluyendo, sin limitación, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo. Los sustituyentes seleccionados en los compuestos descritos en el presente documento están presentes en un grado recurrente.

20 En este contexto, "sustituyente recurrente" significa que un sustituyente puede enumerar otro caso de sí mismo. Debido a la naturaleza recurrente de dichos sustituyentes, teóricamente, puede estar presente un gran número en cualquier reivindicación dada. Un experto en la técnica de la química medicinal y la química orgánica aprecia que el número total de dichos sustituyentes está limitado de forma razonable por las propiedades deseadas del compuesto deseado. Dichas propiedades incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, propiedades físicas, tales como peso molecular, solubilidad o P log, propiedades de aplicación, tales como actividad contra la diana objeto, y propiedades prácticas, tales como facilidad de síntesis.

30 Los sustituyentes recurrentes son un aspecto objeto de la invención. Un experto en la técnica de la química medicinal y orgánica aprecia la versatilidad de dichos sustituyentes. Al grado en el que los sustituyentes recurrentes están presentes en una reivindicación de la invención, el número total se determinará como se ha expuesto anteriormente.

35 El término "acilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical formado por la eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general -C(O)-X, en la que X es típicamente alifático, alicíclico o aromático. Los ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfínulos aromáticos, sulfínulos alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Los grupos acilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

El término "alicíclico" o "alicíclico" se refiere a un sistema de anillos cíclico en el que el anillo es alifático. El sistema de anillos puede comprender uno o más anillos en el que al menos un anillo es alifático. Los alicíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo. Alicíclico, como se usa en el presente documento puede incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

40 El término "alifático", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono en el que la saturación entre dos átomos de carbono cualesquiera es un enlace sencillo, doble o triple. Un grupo alifático contiene preferentemente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo el más preferido de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático puede interrumpirse con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Dichos grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen, sin limitación, polialcoxis, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y poliiminas. Los grupos alifáticos, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

50 El término "alcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno, en el que el átomo de oxígeno se usa para unir el grupo alcoxi a una molécula de partida. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, pero sin limitación, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentoxi, neopentoxi, n-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

55 El término "alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarburo saturado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Los grupos alquilo incluyen típicamente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono (alquilo C₁-C₁₂), siendo el más preferido de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. El término "alquilo inferior", como se usa en el presente documento, incluye de 1 a aproximadamente 6 átomos de

carbono. Los grupos alquilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

5 El término "alquenilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de alquenilo incluyen, pero sin limitación, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos, tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alquenilo incluyen típicamente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferido de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

10 El término "alquinilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero sin limitación, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo y similares. Los grupos alquinilo incluyen típicamente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferido de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquinilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

15 El término "aminoalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo amino-sustituido. Este término pretende incluir grupos alquilo C₁-C₁₂ que tienen un sustituyente amino en cualquier posición y en el que el grupo alquilo une al grupo aminoalquilo a la molécula de partida. Las porciones alquilo y/o amino del grupo aminoalquilo pueden estar sustituidas adicionalmente con grupos sustituyentes.

20 Las expresiones "aralquilo" y "arilalquilo", como se usan en el presente documento, se refieren a un radical formado entre un grupo alquilo y un grupo arilo en el que el grupo alquilo se usa para unir el grupo aralquilo a una molécula de partida. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, bencilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales unidos al alquilo, el arilo o ambos grupos que forman el grupo radical.

25 Las expresiones "arilo" y "aromático", como se usan en el presente documento, se refieren a radicales de un sistema de anillos carbocíclico mono- o policíclico que tienen uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares. Los sistemas de anillos arilo preferidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

Los términos "halo" y "halógeno", como se usan en el presente documento, se refieren a un átomo seleccionado entre flúor, cloro, bromo y yodo.

35 El término "haloalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo que tienen el significado que se ha definido anteriormente en el que uno o más hidrógenos se reemplazan por un halógeno. Se incluyen específicamente radicales monohaloalquilo, dihaloalquilo y poli-haloalquilo. Un radical monohaloalquilo, por ejemplo, puede tener un átomo de yodo, bromo, cloro o flúor en el radical. Los radicales dihalo y polihaloalquilo pueden tener dos o más de los mismos átomos halo o una combinación de diferentes radicales halo. Los ejemplos de radicales haloalquilo incluyen fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo, difluoroclorometilo, diclorofluorometilo, difluoroetilo, difluoropropilo, dicloroetilo y dicloropropilo. El término "perhaloalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo en el que todos los átomos de hidrógeno se reemplazan por átomos de halógeno. "Haloalquileno" se refiere a un grupo haloalquilo unido en dos o más posiciones. Los ejemplos incluyen fluorometileno (-CFH-), difluorometileno (-CF₂-), clorometileno (-CHCl-) y similares.

45 Las expresiones "heteroarilo" y "heteroaromático", como se usan en el presente documento, se refieren a un radical que comprende un anillo aromático mono- o poli-cíclico, un sistema de anillos o un sistema de anillos condensado en el que al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo también pretende incluir sistemas de anillos condensados que incluyen sistemas en los que uno o más de los anillos condensados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo incluyen típicamente un átomo en el anillo seleccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero sin limitación, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo y similares. Los radicales heteroarilo pueden estar unidos a una molécula de partida directamente o a través de un resto de unión, tal como un grupo alifático o heteroátomo. Los grupos heteroarilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

El término "heteroarilalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo como se ha definido previamente que tiene un radical alquilo que puede unir el grupo heteroarilalquilo a una molécula de partida. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, piridinilmetilo, pirimidiniletilo, naftiridinilpropilo y similares. Los grupos

heteroarilalquilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales en uno o ambas porciones heteroarilo o alquilo.

La expresión "radical heterocíclico", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de anillos de radicales mono-, o poli-cíclicos que incluye al menos un heteroátomo y está insaturado, parcialmente saturado o completamente saturado, incluyendo por lo tanto grupos heteroarilo. Heterocíclico también pretende incluir sistemas de anillos condensados en los que uno o más de los anillos condensados contienen al menos un heteroátomo y los otros anillos pueden contener uno o más heteroátomos u opcionalmente no contienen heteroátomos. Un grupo heterocíclico incluye típicamente al menos un átomo seleccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen, [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y similares. Los grupos heterocíclicos, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

El término "hidrocarbilo" incluye grupos que comprenden C, O y H. Se incluyen grupos lineales, ramificados y cíclicos que tienen cualquier grado de saturación. Dichos grupos hidrocarbilo pueden incluir uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S y pueden estar adicionalmente mono o poli sustituidos con uno o más grupos sustituyentes.

La expresión "estructura mono o policíclica", como se usa en el presente documento incluye todos los sistemas de anillos que son sencillos o policíclicos que tienen anillos que están condensados o unidos y pretende incluir sistemas de anillos sencillos y mixtos seleccionados individualmente entre alifático, alicíclico, arilo, heteroarilo, aralquilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroaromático, heteroarilalquilo. Dichas estructuras mono y policíclicas pueden contener anillos que son uniformes o tienen grados variables de saturación, incluyendo completamente saturados, parcialmente saturados o completamente insaturados. Cada anillo puede comprender átomos en el anillo seleccionados entre C, N, O y S para dar lugar a anillos heterocíclicos, así como anillos que comprenden únicamente átomos de C en el anillo que pueden estar presentes en un motivo mixto, tal como, por ejemplo bencimidazol, en el que un anillo sólo tiene átomos de carbono en el anillo y el anillo condensado tiene dos átomos de nitrógeno. Las estructuras mono o policíclicas pueden estar sustituidas adicionalmente con grupos sustituyentes, tales como, por ejemplo, ftalimida que tiene dos grupos =O unidos a uno de los anillos. En otro aspecto, las estructuras mono o policíclicas pueden estar unidas a una molécula de partida directamente a través de un átomo del anillo, a través de un grupo sustituyente o un resto de unión bifuncional.

El término "oxo" se refiere al grupo (=O).

La expresión "ácido nucleico bicíclico", "ANB", "nucleósido bicíclico" o "nucleótido bicíclico" se refiere a un nucleósido o nucleótido en el que la porción de furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos de carbono en el anillo de furanosa, formando de este modo un sistema de anillos bicíclico.

La expresión "compuesto oligomérico quimérico" o "oligonucleótido quimérico" se refiere a un compuesto oligomérico o un oligonucleótido que tiene al menos un azúcar, una nucleobase o un enlace internucleósido que está modificada con relación a nucleósidos unidos de origen natural. Los restos de azúcares, nucleobases y enlaces de internucleósidos pueden estar independientemente modificados o sin modificar, en los que cada nucleósido y cada enlace pueden ser iguales o diferentes.

Las expresiones "compuesto estable" y "estructura estable" pretenden indicar un compuesto que es lo suficientemente fuerte para sobrevivir al aislamiento a un grado útil de pureza de una mezcla de reacción, y formulación en un agente terapéutico eficaz. Únicamente se contemplan compuestos estables en el presente documento.

Pueden usarse grupos de unión o restos de unión bifuncionales, tales como los conocidos en la técnica con los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento. Los grupos de unión son útiles para la fijación de grupos funcionales químicos, grupos conjugados, grupos informadores y otros grupos para sitios selectivos en un precursor, tal como, por ejemplo, un compuesto oligomérico. En general un resto de unión bifuncional comprende un hidrocarbilo que tiene dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona para unirse a una molécula de partida o compuesto de interés y el otro se selecciona para unir básicamente cualquier grupo seleccionado, tal como un grupo químico funcional o un grupo conjugado. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende una estructura de cadena o un oligómero de unidades de repetición, tal como etilenglicol o unidades de aminoácidos. Los ejemplos de grupos funcionales que se usan de forma rutinaria en grupos de unión bifuncionales incluyen, pero sin limitación, electrófilos para la reacción con grupos nucleófilos y nucleófilos para la reacción con grupos electrófilos. En ciertas realizaciones, los restos de unión bifuncionales incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, dobles o triples enlaces), y similares. Algunos ejemplos no limitantes de restos de unión bifuncionales incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) y ácido 6-aminohexanoico (AHEX o AHA). Otros grupos de unión incluyen, pero sin limitación, alquilo C₁-C₁₀ sustituido, alquinilo C₂-C₁₀ sustituido o sin sustituir o alquinilo C₂-C₁₀ sustituido o sin sustituir, en los que una lista no limitante de grupos sustituyentes preferidos incluye hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alquenoilo y alquinilo.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos se modifican con la unión covalente de uno o más grupos terminales 5' o 3'. La expresión "grupo terminal", como se usa en el presente documento, pretende incluir grupos útiles conocidos por el experto que pueden colocarse en uno o ambos de los extremos 3' y 5' de un compuesto oligomérico para diversos fines, tales como permitir el seguimiento del compuesto oligomérico (un marcador fluorescente u otro grupo informador), mejorar la farmacocinética o farmacodinámica del compuesto oligomérico (un grupo para mejorar la captación y administración) o mejorar una o más propiedades deseables del compuesto oligomérico (grupo para mejorar la estabilidad de la nucleasa o la afinidad de unión). En ciertas realizaciones, los grupos terminales 3' y 5' incluyen, sin limitación, uno o más nucleósidos modificados o no modificados, grupos conjugados, grupos de sellado, restos fosfato y grupos protectores.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos están modificados por la unión covalente de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico adjunto, incluyendo, pero sin limitación la farmacodinámica, farmacocinética, unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y aclaración. Los grupos conjugados se usan de forma rutinaria en la técnica química y están unidos directamente o a través de un resto de unión o un grupo de unión opcional a un precursor, tal como un compuesto oligomérico. Una lista preferida de grupos conjugados incluye, sin limitación, intercaladores, moleculares informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesterolos, tiocolesterolos, restos de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoreceínas, rodaminas, coumarinas y tintes.

La expresión "grupo protector", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto químico inestable que se conoce en la técnica para proteger grupos reactivos incluyendo, sin limitación, grupos hidroxilo, amino y tiol, frente a reacciones no deseadas durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores se usan típicamente selectivamente y/u ortogonalmente para proteger sitios durante las reacciones en otros sitios reactivos y después pueden eliminarse para dejar el grupo desprotegido para que esté disponible para reacciones adicionales. Los grupos protectores que se conocen en la técnica se describen generalmente en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1999).

Los grupos pueden incorporarse selectivamente en compuestos oligoméricos de la invención como precursores. Por ejemplo, un grupo amino puede colocarse en un compuesto de la invención como un grupo azido que puede convertirse químicamente en el grupo amino en un punto deseado en la síntesis. Generalmente, los grupos están protegidos o presentes como precursores que serán inertes a reacciones que modifiquen otras áreas de la molécula de partida para la conversión en sus grupos finales en un momento apropiado. Se analizan grupos protectores o precursores adicionales representativos en Agrawal, y col., *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, Eds, Humana Press; Nueva Jersey, 1994; Vol. 26, págs. 1-72.

Los ejemplos de grupos protectores hidroxilo incluyen, pero sin limitación, acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropirano, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, bis(2-acetoxietoxi)metilo (ACE), 2-trimetilsililetilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, [(trisisopropilsilil)oxi]metilo (TOM), formiato de benzoílo, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloílo, benzoílo, p-fenilbenzoílo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, trifenilmetilo (tritilo), monometoxitritilo, dimetoxitritilo (DMT), trimetoxitritilo, 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo (FPMP) y pixilo sustituido. En los que los grupos protectores hidroxilo más preferidos incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2,6-diclorobencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, benzoílo, mesilato, tosilato, dimetoxitritilo (DMT) y pixilo sustituidos.

Los ejemplos de grupos protectores amino incluyen, pero sin limitación, grupos protectores carbamato, tales como 2-trimetilsililetoxicarbonilo (Teoc), 1-metil-1-(4-bifenilil)-etoxicarbonilo (Bpoc), t-butoxicarbonilo (BOC), alilloxi-carbonilo (Alloc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y benciloxicarbonilo (Cbz); grupos protectores amida, tales como formilo, acetilo, trihaloacetilo, benzoílo y nitrofenilacetilo; grupos protectores sulfonamida, tales como 2-nitrobencenosulfonilo; y grupos protectores imina e imida cíclica, tales como ftalimido y ditiasuccinoílo. Los ejemplos de tiol grupos protectores incluyen, pero sin limitación, trifenilmetilo (tritilo), bencilo (Bn) y similares.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos se preparan conectando nucleósidos con enlaces de internucleósidos que contienen fósforo opcionalmente protegido. Los grupos protectores representativos para enlaces de internucleósidos que contienen fósforo, tales como enlaces fosfodiéster y fosforotioato incluyen grupos β -cianoetilo, difenilsililetilo, δ -cianobutenilo, ciano p-xililo (CPX), N-metil-N-trifluoroacetil etilo (META), acetoxi fenoxi etilo (APE) y buteno-4-ilo. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 4.725.677 y Re. 34.069 (β -cianoetilo); Beaucage, S.L. y Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 49 Nº 10, págs. 1925-1963 (1993); Beaucage, S.L. y Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 49 Nº 46, págs. 10441-10488 (1993); Beaucage, S.L. y Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 48 Nº 12, págs. 2223-2311 (1992).

La expresión "protegido ortogonalmente" se refiere a grupos funcionales que están protegidos con diferentes clases de grupos protectores, en los que cada clase de grupo protector puede eliminarse en cualquier orden y en presencia de todas las demás clases (véase, Barany, G. y Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 7363; *mencionado anteriormente*, 1980, 102, 3084.) La protección ortogonal se usa ampliamente, por ejemplo, en síntesis automática de oligonucleótidos. Un grupo funcional se desbloquea en presencia de uno o más de otros grupos funcionales

protegidos que no se ven afectados por el procedimiento de desbloqueo. Este grupo funcional desbloqueado es de alguna manera reactivo y hasta cierto punto un grupo de protección ortogonal adicional se elimina bajo un conjunto diferente de condiciones de reacción. Esto permite que la química selectiva llegue a un compuesto deseado o a un compuesto oligomérico.

5 En algunas realizaciones, se proporcionan compuestos que tienen grupos fosforosos reactivos útiles para la formación de enlaces internucleósido, incluyendo, por ejemplo, enlaces internucleósido fosfodiéster y fósforotioato. Dichos grupos fosforosos reactivos se conocen en la técnica y contienen átomos de fósforo en un estado de valencia P^{III} o P^V y se limitan a, fosforoamidita, H-fosfonato, triésteres de fosfato y auxiliares quirales que contienen fósforo. Una síntesis de fase sólida sintética preferida utiliza fosforamiditas (química P^{III}) como fosfitos reactivos. Los
10 compuestos fosfito intermedios se oxidan posteriormente al estado P^V usando procedimientos conocidos para producir, en determinadas realizaciones, enlaces internucleótido fosfodiéster o fósforotioato. En Tetrahedron Report Número 309 (Beaucage y Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311) se describen fosfatos y fosfitos reactivos adicionales.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "enlace internucleósido o grupo de enlace internucleósido" significa incluir todos los modos de grupos de enlace internucleósido conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, grupos de enlace internucleósido que contienen fósforo tales como fosfodiéster y fósforotioato, grupos de enlace internucleósido que no contienen fósforo, tales como formacetyl y metileneimino y grupos de enlace internucleósido neutros, no iónicos, tales como amida-3 ($3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5'$), amida-4 ($3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5'$).

20 Los ejemplos específicos de compuestos oligoméricos útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen, por ejemplo, enlaces internucleósido de origen no natural. Se definen dos clases principales de enlaces internucleósido por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces internucleósido modificados que tienen un átomo de fósforo incluyen, pero sin limitación, fósforotioatos, fósforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos incluyendo 3'-alquileo fosfonatos, 5'-
25 alquileo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos de estos unidos en 2'-5' y los que tienen polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleósido es un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos que tienen polaridad invertida pueden comprender un solo enlace 3' a 3' y el enlace 3'-más internucleótido, es decir, un solo resto de nucleósido invertido que puede ser abásico (la nucleobase está ausente o tiene un grupo hidroxilo en
30 lugar del mismo). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas ácidas libres.

Las Patentes de Estados Unidos representativas que instruyen sobre la preparación de los enlaces anteriores que contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050, algunas de las cuales son
35 comúnmente propiedad con esta solicitud.

Los enlaces internucleósido modificados que no tienen ningún átomo de fósforo incluyen, pero sin limitación, los que están formados por enlaces internucleósido alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósido heteroatómicos mixtos y alquilo o cicloalquilo o uno o más enlaces internucleósido, heteroatómicos o heterocíclicos
40 de cadena corta. Estos incluyen los que tienen estructuras siloxano; estructuras sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras formacetyl y tioformacetyl; estructuras formacetyl y tioformacetyl metileno; estructuras riboacetyl; estructuras que contienen alqueno; estructuras sulfamato; estructuras metileneimino y metilenediazino; estructuras sulfonato y sulfonamida; estructuras amida; y otras que tienen partes mixtas de componentes N, O, S y CH_2 . En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleósido" se refiere a una secuencia de dos o más nucleósidos
45 que están unidas por enlaces internucleósido que no tienen átomos de fósforo.

Las Patentes de Estados Unidos representativas que instruyen sobre la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.445.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439 algunas de las cuales son comúnmente propiedad con esta
50 solicitud.

Los grupos de enlace internucleósido también incluyen grupos de enlace internucleósido neutros que pueden incluir o no un átomo de fósforo. Como se usa en el presente documento, la frase "enlace internucleósido neutro" pretende incluir enlaces internucleósido que son no iónicos. Dichos enlaces internucleósido neutros incluyen, pero sin
55 limitación, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI ($3'-CH_2N(CH_3)-O-5'$), amida-3 ($3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5'$), amida-4 ($3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5'$), formacetal ($3'-O-CH_2-O-5'$) y tioformacetal ($3'-S-CH_2-O-5'$). Otros enlaces internucleósido neutros incluyen enlaces no iónicos que comprenden siloxano (dialquilsiloxano), éster carboxilato, carboxamida, sulfuro, éster y amidas sulfonato (véase, por ejemplo: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 y 4, (páginas 40-65)). Otros enlaces
60 internucleósido neutros incluyen enlaces no iónicos que comprenden partes mixtas de componentes N, O, S y CH_2 .

Los compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y por tanto dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y a otras formas estereoisoméricas que, en cuanto a estereoquímica absoluta, pueden definirse como (R) o (S), α o β o como (D) o (L) tal como para aminoácidos y nucleósidos. Todos estos isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras son aplicables a los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento. Los isómeros ópticos pueden prepararse a partir de sus precursores ópticamente activos respectivos mediante los procedimientos descritos anteriormente o por resolución de mezclas racémicas. La resolución puede realizarse en presencia de un agente de resolución, por cromatografía o por cristalización repetida o por cualquier combinación de estas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Otros detalles con respecto a resoluciones pueden encontrarse en Jacques, y col., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (John Wiley & Sons, 1981). Cuando los compuestos descritos en el presente documento comprenden dobles enlaces olefínicos, otra insaturación u otros centros de asimetría geométrica, y salvo que se especifique de otra manera, se pretende que los compuestos incluyan los dos isómeros geométricos E y Z o isómeros cis y trans. Del mismo modo, también pretenden incluirse todas las formas tautoméricas. La configuración de cualquier doble enlace carbono-carbono que aparezca en el presente documento se selecciona solo por conveniencia y no pretende denominar ninguna configuración particular, salvo que el texto así lo indique; por tanto un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-heteroátomo, representado arbitrariamente en el presente documento como trans, pueden ser cis, trans o una mezcla de las dos en cualquier proporción.

Como se usa en el presente documento la expresión "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero que tiene al menos una región que puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico. La expresión "compuesto oligomérico" incluye oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos y oligonucleósidos así como miméticos de nucleótidos y/o polímeros mixtos que comprenden componentes de ácidos nucleicos y de ácidos no-nucleicos. La expresión "compuesto oligomérico" también incluye polímeros que comprenden subunidades monoméricas unidas en las que las subunidades monoméricas incluyen nucleósidos, nucleósidos modificados, análogos de nucleósidos, miméticos de nucleósidos así como componentes de ácidos no nucleicos tales como grupos conjugados. En algunas realizaciones, mezclas de subunidades monoméricas, tales como pero sin limitación, las enumeradas proporcionan compuestos oligoméricos que poseen propiedades mejoradas para usos tales como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Los nucleósidos bicíclicos proporcionados en el presente documento se clasifican como nucleósidos modificados ya que la base y el azúcar de ribosa están aún presentes. Las subunidades monoméricas pueden estar unidas por enlaces internucleósido fosfodiéster de origen natural o como alternativa mediante cualquiera de una pluralidad de enlaces internucleósido descritos en el presente documento tales como, pero sin limitación, enlaces internucleósido fosforotioato o mezclas de los mismos.

En general, un compuesto oligomérico comprende una estructura de subunidades monoméricas unidas en las que cada subunidad monomérica unida está directa o indirectamente conectada a un resto base heterocíclico. Los compuestos oligoméricos también pueden incluir subunidades monoméricas que no estén unidas a un resto base heterocíclico proporcionando así sitios abásicos. Los enlaces que unen las subunidades monoméricas, los restos azúcar o sustitutos y los restos base heterocíclicos pueden modificarse independientemente. La unidad de enlace azúcar, que puede o no incluir una base heterocíclica, puede sustituirse con un mimético tal como los monómeros en ácidos nucleicos peptídicos. La capacidad para modificar o sustituir partes o monómeros enteros en cada posición de un compuesto oligomérico da lugar a una gran cantidad de motivos posibles.

De manera rutinaria, los compuestos oligoméricos se preparan linealmente pero pueden unirse o prepararse de otra manera para ser circulares y también pueden incluir ramificaciones. Los compuestos oligoméricos pueden combinarse para formar construcciones bicatenarias tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar composiciones bicatenarias. Las composiciones bicatenarias pueden estar unidas o separadas y pueden incluir salientes en los extremos.

Como se sabe en la técnica, un nucleósido es una combinación base-azúcar. La parte base del nucleósido es normalmente un resto base heterocíclico. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son purinas y pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que adicionalmente incluyen un grupo fosfato unido covalentemente a la parte azúcar del nucleósido. Para estos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido al resto 2', 3' o 5' hidroxilo del azúcar. Durante la formación de los oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal pueden unirse para formar una estructura circular por hibridación o por formación de un enlace covalente. Sin embargo, generalmente se desean estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura del oligonucleótido, los grupos fosfato normalmente se denominan formadores de enlaces internucleósido del oligonucleótido. El enlace internucleósido normal del ARN y ADN es un enlace fosfodiéster en dirección 3' a 5'.

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN). Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces internucleósido covalentes. La expresión "análogo oligonucleotídico" se refiere a oligonucleótidos que poseen una o más partes de origen no natural. Dichos oligonucleótidos de origen no natural a menudo se desean sobre las formas de origen natural debido a sus propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad para la diana de ácido nucleico potenciada y estabilidad en presencia de nucleasas aumentada.

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleósido" se refiere a una secuencia de nucleósidos que está unida por enlaces internucleósido que no tienen átomos de fósforo. Los enlaces internucleósido de este tipo incluyen alquilo, cicloalquilo, alquilo heteroátomo mixto, cicloalquilo heteroátomo mixto de cadena corta, uno o más heteroátomos de cadena corta y uno o más heterociclos de cadena corta. Estos enlaces internucleósido incluyen, pero sin limitación, siloxano, sulfuro, sulfóxido, sulfona, acetilo, formaceto, tioformaceto metileno formaceto, tioformaceto, alqueno, sulfamato, metilenoimino, metilenoimidazino, sulfonato, sulfonamida, amida y otros que poseen partes de componentes N, O, S y CH₂ mixtas.

Las Patentes de Estados Unidos representativas que instruyen sobre la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero sin limitación: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439, algunas de las cuales son del mismo solicitante de la presente solicitud.

Como se usa en el presente documento, la expresión "nucleobase" o "resto base heterocíclico" pretende ser sinónimo de "base de ácido nucleico o mimético del mismo". En general, una nucleobase es un resto mono o poliheterocíclico que puede unir hidrógeno a una base de un ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento la expresión "nucleobase no modificada" o "nucleobase natural" incluye las bases de purina, adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina, timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Como se usa en el presente documento la expresión "nucleobase modificada" incluye otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metil citosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (CH-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquinilo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituídas, 5-halo, particularmente, 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituídos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina, 3-deazaguanina y 3-deazaadenina, bases universales, bases hidrófobas, bases promiscuas, bases de tamaño ampliado, bases fluoradas como se define en el presente documento. Las nucleobases modificadas adicionalmente incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidin(1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiaca citidin (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotizin-2(3H)-ona), fijaciones G tales como fenoxazina citidin sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), citidin carbazol (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), citidin piridoindol (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2 ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina está sustituida con otros heterociclos, por ejemplo 7-deazaadenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras nucleobases incluyen las descritas en la Patente de Estados Unidos 3.687.808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por English y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 y las descritas por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993.

Las nucleobases modificadas incluyen, pero sin limitación, bases universales, bases hidrófobas, bases promiscuas, bases de tamaño ampliado y bases fluoradas como se define en el presente documento. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la presente invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituídas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de los dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, páginas. 276-278) y actualmente son sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las Patentes de Estados Unidos representativas que instruyen sobre la preparación de algunas de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero sin limitación, la patente de Estados Unidos 3.687.808 indicada anteriormente, así como las patentes de Estados Unidos: 4.845.205; 5.130.302; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096 y 5.681.941, algunas de las cuales son del mismo solicitante de la presente solicitud y la Patente de Estados Unidos 5.750.692 que es del mismo solicitante de la presente solicitud.

Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento también pueden comprender uno o más nucleósidos que poseen restos de azúcar modificados. El anillo de azúcar furanosilo puede modificarse de diversas maneras incluyendo la sustitución con un grupo sustituyente (2', 3', 4' o 5'), formador de puentes para formar un ANB y la sustitución de 4'-O con un heteroátomo tal como S o N(R). Algunas Patentes de Estados Unidos representativas que instruyen sobre la preparación de dichos azúcares modificados incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; 5.700.920; 6.600.032 y la solicitud internacional PCT/US2005/019219, presentada

el 2 de junio del 2005 y publicada como WO 2005/121371 el 22 de diciembre del 2005, algunas de las cuales son del mismo solicitante de la presente solicitud. Una lista representativa de azúcares modificados preferidos incluye, pero sin limitación, azúcares sustituidos que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ o 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ (2'-MOE o simplemente MOB); azúcares 4'-tio modificados y azúcares bicíclicos modificados.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "mimético nucleosídico" pretende incluir aquellas estructuras usadas para sustituir el azúcar o el azúcar y la base sin la unión a una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como por ejemplo miméticos nucleosídicos que poseen miméticos de azúcar morfolino o biciclo [3.1.0] hexilo, por ejemplo, unidades de azúcar no furanosa con un enlace fosfodiéster. La expresión "sustituto de azúcar" coincide con el término "mimético nucleosídico" ligeramente más amplio pero solo pretende indicar la
10 sustitución de la unidad de azúcar (anillo de furanosa). La expresión "mimético nucleotídico" pretende incluir aquellas estructuras usadas para sustituir el nucleósido y la unión a una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como por ejemplo ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos unidos por -N(H)-C(=O)-O u otros enlaces no fosfodiéster).

15 En algunas realizaciones, los "compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento poseen una longitud de 8 a 40 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados. Un experto habitual en la materia apreciará que estos compuestos oligoméricos representan una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados, o cualquier intervalo en su interior.

20 En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención poseen una longitud de 8 a 20 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados. Un experto habitual en la materia apreciará que estos compuestos oligoméricos representan una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados o cualquier intervalo en su interior.

25 En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención poseen una longitud de 10 a 16 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados. Un experto habitual en la materia apreciará que estos compuestos oligoméricos representan una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados o cualquier intervalo en su interior.

30 En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención poseen una longitud de 12 a 16 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados. Un experto habitual en la materia apreciará que estos compuestos oligoméricos representan una longitud de 12, 13, 14, 15 ó 16 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados o cualquier intervalo en su interior.

En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención poseen una longitud de 10 a 14 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados. Un experto habitual en la materia apreciará que estos compuestos oligoméricos representan una longitud de 10, 11, 12, 13, 14 nucleósidos y/o nucleósidos o miméticos modificados o cualquier intervalo en su interior.

35 En algunas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que poseen cualquiera de una diversidad de intervalos de longitud de subunidades monoméricas unidas. En algunas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que constan de X-Y subunidades monoméricas unidas en las que cada X e Y se seleccionan independientemente de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50; siempre que X < Y. Por ejemplo, en
40 algunas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que comprenden: 8-9, 8-10, 8-11, 8-12, 8-13, 8-14, 8-15, 8-16, 8-17, 8-18, 8-19, 8-20, 8-21, 8-22, 8-23, 8-24, 8-25, 8-26, 8-27, 8-28, 8-29, 8-30, 9-10, 9-11, 9-12, 9-13, 9-14, 9-15, 9-16, 9-17, 9-18, 9-19, 9-20, 9-21, 9-22, 9-23, 9-24, 9-25, 9-26, 9-27, 9-28, 9-29, 9-30, 10-11, 10-12, 10-13, 10-14, 10-15, 10-16, 10-17, 10-18, 10-19, 10-20, 10-21, 10-22, 10-23, 10-24, 10-25, 10-26, 10-27, 10-28, 10-29, 10-30, 11-12, 11-13, 11-14, 11-15, 11-16, 11-17, 11-18, 11 - 19, 11-20, 11-21, 11-22, 11-23, 11-24, 11-25,
45 11-26, 11-27, 11-28, 11-29, 11-30, 12-13, 12-14, 12-15, 12-16, 12-17, 12-18, 12-19, 12-20, 12-21, 12-22, 12-23, 12-24, 12-25, 12-26, 12-27, 12-28, 12-29, 12-30, 13-14, 13-15, 13-16, 13-17, 13-18, 13-19, 13-20, 13-21, 13-22, 13-23, 13-24, 13-25, 13-26, 13-27, 13-28, 13-29, 13-30, 14-15, 14-16, 14-17, 14-18, 14-19, 14-20, 14-21, 14-22, 14-23, 14-24, 14-25, 14-26, 14-27, 14-28, 14-29, 14-30, 15-16, 15-17, 15-18, 15-19, 15-20, 15-21, 15-22, 15-23, 15-24, 15-25, 15-26, 15-27, 15-28, 15-29, 15-30, 16-17, 16-18, 16-19, 16-20, 16-21, 16-22, 16-23, 16-24, 16-25, 16-26, 16-27, 16-28, 16-29, 16-30, 17-18, 17-19, 17-20, 17-21, 17-22, 17-23, 17-24, 17-25, 17-26, 17-27, 17-28, 17-29, 17-30, 18-19, 18-20, 18-21, 18-22, 18-23, 18-24, 18-25, 18-26, 18-27, 18-28, 18-29, 18-30, 19-20, 19-21, 19-22, 19-23, 19-24, 19-25, 19-26, 19-27, 19-28, 19-29, 19-30, 20-21, 20-22, 20-23, 20-24, 20-25, 20-26, 20-27, 20-28, 20-29, 20-30, 21-22, 21-23, 21-24, 21-25, 21-26, 21-27, 21-28, 21-29, 21-30, 22-23, 22-24, 22-25, 22-26, 22-27, 22-28, 22-29, 22-30, 23-24, 23-25, 23-26, 23-27, 23-28, 23-29, 23-30, 24-25, 24-26, 24-27, 24-28, 24-29, 24-30, 25-26, 25-27, 25-28, 25-29, 25-30, 26-27, 26-28, 26-29, 26-30, 27-28, 27-29, 27-30, 28-29, 30-28 o 29-30 subunidades monoméricas unidas.

En algunas realizaciones, los intervalos para longitud de los compuestos oligoméricos incluyen 8-16, 8-20, 8-40, 10-12, 10-14, 10-16, 10-18, 10-20, 10-21, 12-14, 12-16, 12-18, 12-20 y 12-24 subunidades monoméricas unidas .

En algunas realizaciones, las oligomerización de nucleósidos modificados y no modificados y miméticos de los

mismos, puede realizarse de acuerdo con procedimientos documentados para la síntesis de ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217; Gait y col., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA:Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36; Gallo y col., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713) según sea apropiado. Procedimientos adicionales para la síntesis en fase sólida pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos de Caruthers Nos: 4.415.732; 4.458.066; 4.500.707; 4.668.777; 4.973.679 y 5.132.418; y en las Patentes de Estados Unidos de Koster Nos: 4.725.677 y Re. 34.069.

Diversos fabricantes proporcionan el equipo disponible en el mercado, normalmente usado para el medio de soporte basado en la síntesis de compuestos oligoméricos y compuestos relacionados, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Adicionalmente, o como alternativa, para dicha síntesis, conocida en la materia, puede emplearse cualquier otro medio. Las técnicas de fase sólida adecuadas incluyen técnicas de síntesis automática, como se describe en F. Eckstein (ed.), Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, Oxford University Press, Nueva York (1991).

La síntesis de ARN y análogos relacionados con respecto a la síntesis de ADN y análogos relacionados se ha aumentado así como los esfuerzos en el aumento de ARNi. Las estrategias principales de síntesis de ARN que actualmente se usan en el mercado incluyen 5'-O-DMT-2'-O-t-dibutildimetilsililo (TBDMS), 5'-O-DMT-2'-O-[1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo] (FPMP), 2'-O-[(triisopropilsilil)oxi]metil (2'-O-CH₂-O-Si(iPr)₃) (TOM) y el 5'-O-silil éter-2'-ACE (5'-O bis (trimetiloxi) ciclododeciloxilil éter (DOD)-2'-O-bis(2-acetoetoxi)metilo) (ACE). Una lista actual de algunas de las principales compañías que actualmente ofrecen productos de ARN incluye Pierce Nucleic Acid Technologies, Dharmacon Research Inc., Ameri Biotechnologies Inc. e Integrated DNA Technologies, Inc. Una compañía, Princeton Separations, comercializa un activador de síntesis de ARN que publicita que reduce los tiempos de acoplamiento especialmente con química TOM y TBDMS.

Los principales grupos que se usan para la síntesis de ARN comercial son:

TBDMS = 5'-O-DMT-2'-O-t-dibutildimetilsililo;

TOM = 2'-O-[(triisopropilsilil)oxi]metilo;

DOD/ACE = (5'-O-bis (trimetilsiloxi)ciclododeciloxilil éter-2'-O-bis (2-acetoetoxi)metilo)

FPMP = 5'-O-DMT-2'-O-[1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo]

En algunas realizaciones, las estrategias de síntesis de ARN indicadas anteriormente y las estrategias que serían un híbrido de lo anterior, por ejemplo, usando un grupo protector 5' de una estrategia con un grupo protector 2'-O de otra estrategia, se incluyen como procedimientos para la preparación de oligómeros aplicables en el presente documento.

En el contexto de la presente invención, "hibridación" significa el emparejamiento de cadenas complementarias de compuestos oligoméricos. En algunas realizaciones, un mecanismo de emparejamiento implica enlaces hidrógeno, que pueden enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre bases de nucleósidos y de nucleótidos complementarias (nucleobases) de las cadenas de los compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de enlaces hidrógeno. La hibridación puede producirse en diversas circunstancias.

Un compuesto oligomérico puede hibridarse específicamente cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una pérdida de actividad y existe un grado de complementariedad suficiente para impedir la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico y en condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

El término "complementario", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento exacto de dos nucleobases independientemente de su localización. Por ejemplo, si una nucleobase, en una posición determinada, de un compuesto oligomérico puede unirse, mediante enlaces hidrógeno, a una nucleobase a una determinada posición de un ácido nucleico diana, siendo el ácido nucleico diana un ADN, ARN o una molécula oligonucleotídica, entonces la posición del enlace hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN o molécula oligonucleotídica adicional son complementarios entre sí cuando, en cada molécula, un número suficiente de posiciones complementarias están ocupadas por nucleobases que pueden unirse entre sí mediante enlaces de hidrógeno. Por tanto, que puede "hibridarse específicamente" y "complementario" son expresiones que se usan para indicar un grado de emparejamiento o complementariedad exacto suficiente sobre un número de nucleobases suficiente de tal manera que se produce la unión específica y estable entre los oligonucleótidos y un ácido nucleico diana.

En la materia se entiende que la secuencia de un compuesto oligomérico no requiere tener una complementariedad del 100% con su ácido nucleico diana para poder hibridarse específicamente. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de manera que los segmentos que intervienen o adyacentes no estén implicados en el suceso de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle o una estructura en horquilla). Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento pueden comprender una complementariedad de secuencia de al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95% o al menos aproximadamente el un 99% con una región diana dentro de la secuencia de ácido nucleico diana a la cual se dirige. Por ejemplo, un compuesto oligomérico en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto oligomérico son complementarias con una región diana, y por lo tanto se hibridaría específicamente, representaría una complementariedad del 90%. En este ejemplo, el resto de nucleobases no complementarias pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí ni ser nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto oligomérico que tiene una longitud de 18 nucleobases que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría una complementariedad global del 77,8% con el ácido nucleico diana y así podría incluirse dentro del ámbito descrito en el presente documento. El porcentaje de complementariedad de un compuesto oligomérico con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamiento local de bases) y programas PowerBLAST conocidos en la materia (Altschul y col, *J. Mol Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656).

Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento también incluyen, sin limitación, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia externa de guía (SEG), empalmadores alternos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Como tal, estos compuestos oligoméricos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en forma de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Una vez introducido en un sistema, los compuestos oligoméricos de la invención pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la modificación del ácido nucleico diana.

Un ejemplo no limitante de dicha enzima es la ARNasa H, una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. En la materia se sabe que compuestos oligoméricos monocatenarios, que son "similares a ADN", producen ARNasa H. Por tanto, la activación de RNasa H da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando así enormemente la eficacia de la inhibición de la expresión de genes mediada por oligonucleótidos. Se han supuesto funciones similares para otras ribonucleasas tales como las de la familia de enzimas RNasa III y ribonucleasa L.

Aunque una forma de compuesto oligomérico es un oligonucleótido antisentido monocatenario, en muchas especies se ha observado que la introducción de estructuras bicatenarias, tales como moléculas de ARN bicatenario (ARNbc), inducen una reducción fuerte y específica, mediada por oligonucleótidos antisentido, de la función de un gen o sus productos génicos asociados. Este fenómeno se produce tanto en plantas como en animales y se piensa que tiene una conexión evolutiva contra la defensa viral y el silenciando de transposones.

En algunas realizaciones, pueden emplearse "segmentos diana adecuados" en una exploración para detectar compuestos oligoméricos adicionales que modulen la expresión de una proteína seleccionada. Los "moduladores" son aquellos compuestos oligoméricos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína y que comprende al menos una parte de 8 nucleobases que es complementaria a un segmento diana adecuado. El procedimiento de exploración comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana adecuado de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína, con uno o más moduladores candidatos y seleccionar para detectar uno o más moduladores candidatos que disminuyan o aumenten la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína. En algunas realizaciones, una vez que se demuestra que el modulador o los moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido, el modulador puede entonces emplearse en otros estudios de investigación de la función del péptido o usarse como un agente de investigación de diagnóstico o terapéutico.

En algunas realizaciones, pueden combinarse segmentos diana adecuados con sus respectivos compuestos oligoméricos antisentido complementarios para formar oligonucleótidos bicatenarios (dúplex) estabilizados. En la materia, se ha observado que, dichos restos oligonucleotídicos bicatenarios modulan la expresión diana y regulan la traducción así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas (Fire y col., *Nature*, 1998, 391, 806-811; Timmons y Fire, *Nature* 1998, 395, 854; Timmons y col, *Gene*, 2001, 263, 103-112; Tabara y col, *Science*, 1998, 282, 430-431; Montgomery y col, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 15502-15507; Tuschl y col, *Genes Dev.*, 1999, 13, 3191-3197; Elbashir y col, *Nature*, 2001, 411, 494-498; Elbashir y col, *Genes Dev.* 2001, 15, 188-200). Por ejemplo, se ha observado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex con la diana, desencadenando de esta manera la degradación enzimática de la diana (Tijsterman y col., *Science*, 2002, 295, 694-697).

En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento también pueden aplicarse en las áreas de descubrimiento de fármacos y de validación de dianas. Los compuestos oligoméricos también pueden usarse, junto con las dianas identificadas en el presente documento, en proyectos de descubrimiento de fármacos para aclarar la relación que existe entre las proteínas y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular un péptido diana que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos oligoméricos, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de la diana y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o con una muestra tratada con un compuesto oligomérico adicional de la presente invención. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como una diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad afección o fenotipo particular.

Como se usa en el presente documento, el término "dosis" se refiere a una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionado en una sola administración. En algunas realizaciones, una dosis puede administrarse en dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen no fácilmente ajustado mediante una sola inyección. En algunas realizaciones, para conseguir la dosis deseada pueden usarse dos o más inyecciones. En algunas realizaciones, para minimizar la reacción, en el sitio de inyección en un individuo, puede administrarse una dosis en dos o más inyecciones.

En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención modificados químicamente poseen una mayor afinidad por los ARN diana que por los ADN no modificados. En algunas de estas realizaciones, esta mayor afinidad proporciona, a su vez, una fuerza aumentada permitiendo administrar dosis inferiores de dichos compuestos, reducir la posible toxicidad, mejorar el índice terapéutico y disminuir el coste de terapia global.

El efecto de modificaciones de nucleósidos sobre la actividad de ARNi se evalúa de acuerdo con la bibliografía existente (Elbashir y col., *Nature* (2001), 411, 494-498; Nishikura y col., *Cell* (2001), 107, 415-416; y Bass y col., *Cell* (2000), 101, 235-238).

Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento pueden usarse para diagnóstico, terapia, profilaxis y como para la investigación de reactivos y kits. Adicionalmente, los oligonucleótidos antisentido, que pueden inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, los usan frecuentemente los expertos en la materia para aclarar la función de genes particulares o para diferenciar entre funciones de diversos miembros de una ruta biológica. Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento, tanto en solitario como en combinación con otros compuestos oligoméricos o productos terapéuticos, pueden usarse como herramientas en el análisis diferencial y/o combinatorio para aclarar patrones de expresión de una parte o de todo el complemento de genes expresados en las células y tejidos. Los compuestos oligoméricos también pueden usarse eficazmente como cebadores y sondas en condiciones que favorecen la amplificación o detección de genes, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas y en la amplificación de las moléculas de ácido nucleico para la detección o para su uso en estudios adicionales. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente de los cebadores y sondas, de la invención con un ácido nucleico puede detectarse por medios conocidos en la materia. Dichos medios pueden incluir la conjugación de una enzima con el oligonucleótido, el radiomarcado del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usen dichos medios de detección para detectar el nivel de proteínas seleccionadas en una muestra.

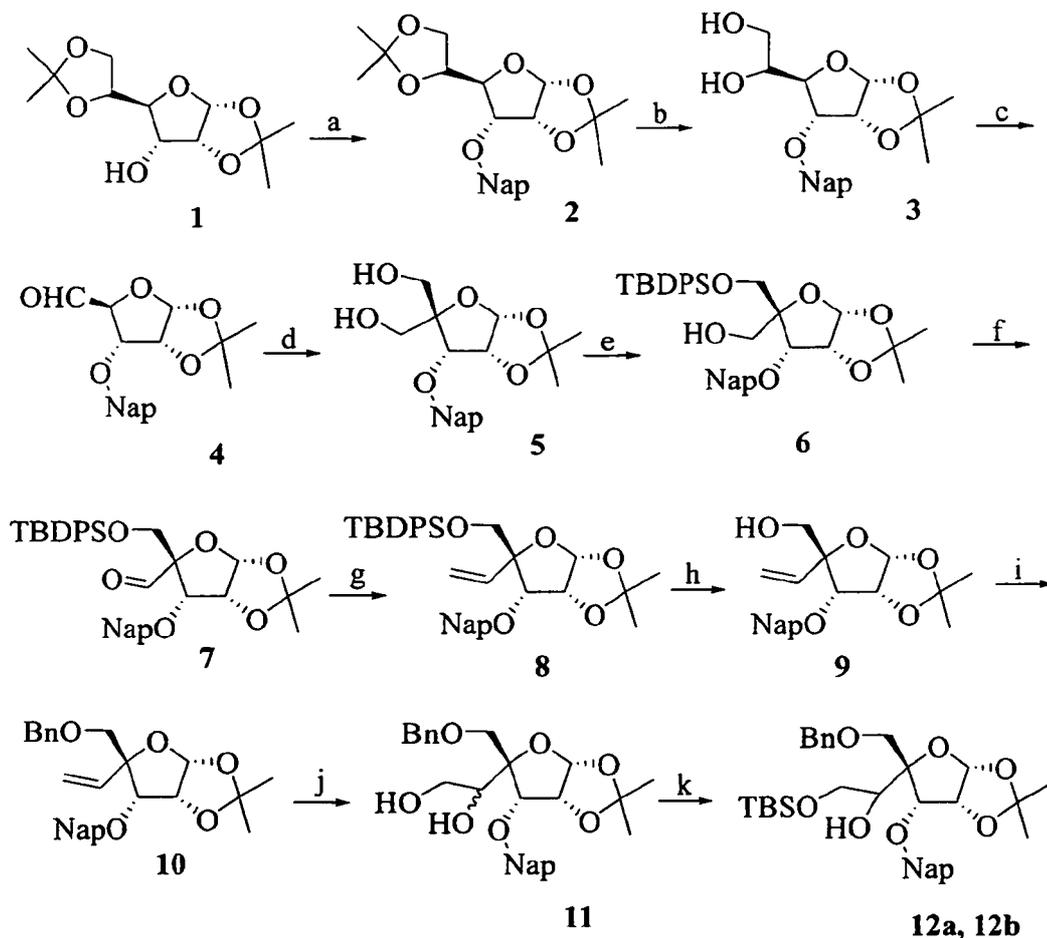
Como un ejemplo no limitante, se comparan patrones de expresión, en las células o tejidos tratados con uno o más compuestos oligoméricos, con células o tejidos control no tratados con los compuestos oligoméricos y los patrones producidos se analizan para determinar niveles de expresión de genes diferenciales que se relacionan, por ejemplo, para asociar una enfermedad, una ruta de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o no estimuladas y en presencia o ausencia de otros compuestos y o compuestos oligoméricos que influyen en los patrones de expresión.

Los ejemplos de procedimientos de análisis de expresión de genes, conocidos en la materia, incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 17-24; Celis, y col., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de expresión de genes) (Madden, y col., *Drug Discov. Today*, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación de los ADNc digeridos por enzimas de restricción) (Prashar y Weissman, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis total de expresión de genes) (Sutcliffe, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, y col., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Jungblut, y col., *Electrophoresis*, 1999, 20, 10-2100), secuenciación de etiqueta de secuencia expresada (EST) (Celis, y col., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Larsson, y col., *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143-57), huella dactilar sustractiva de ARN (SuRF) (Fuchs, y col., *Anal. Biochem.*, 2000, 286, 91-98; Larson, y col., *Citometry*, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, y col., *J. Cell Biochem. Suppl.*, 1998, 31, 286-96), técnicas FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) (Going y Gusterson, *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, *Com. Chem. High Throughput Screen*, 2000, 3.235-41).

Aunque en el presente documento se proporcionan monómeros, oligómeros y procedimientos descritos con especificidad de acuerdo con algunas de sus realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención sin pretender limitarla.

Ejemplo 1

5 Esquema 1



A) Compuesto 1

10 Se añadió cuidadosamente hidruro sódico (2,39 g, 59,8 mmol) a una solución fría (0 °C) de 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- α -D-alfufuranosa disponible en el mercado, Compuesto 1 (12,0 g, 46 mmol) en DMF (75 ml). Después de agitar durante 20 minutos, a la reacción se le añadió bromuro de naftilo (11,12 g, 50,8 mmol) y la agitación continuó durante 2 horas más. La reacción se inactivó cuidadosamente con agua, después se vertió en EtOAc, la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, EtOAc del 10% al 33%/hexanos) proporcionó el alcohol, Compuesto 2 en forma de un sólido de color blanco (18,1 g, 98%).

15 B) Compuesto 5

El Compuesto 2 (18 g, 46 mmol) se disolvió en ácido acético glacial (150 ml) y agua (60 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas después de que se concentrara al vacío. Después, el residuo se disolvió en EtOAc y la fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó y se concentró, proporcionando el Compuesto 3 en bruto, que se usó sin purificación adicional.

20 Se añadió una solución de peryodato sódico (48 mmol, 10 g) en agua (350 ml) a una solución del Compuesto 3 que se ha obtenido anteriormente, en 1,4-dioxano (140 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 90 minutos, la reacción se extrajo con EtOAc y la fase orgánica se lavó adicionalmente con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró, proporcionando el aldehído, Compuesto 4, que se usó sin purificación adicional.

El Compuesto 4 en bruto anterior, se disolvió en una mezcla de THF:H₂O (1:1, 100 ml) y la reacción se enfrió en un

baño de hielo. A la reacción se le añadieron formaldehído (25 ml, 35% p/p) y NaOH 1 N (100 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, a la reacción se le añadió formaldehído (5 ml) y la agitación continuó durante 32 horas más. Después, la reacción se concentró a sequedad y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. Las fases se separaron, la fase orgánica se lavó con más cantidad de NaOH 1 N, agua y salmuera, se secó y se concentró, proporcionando el diol, Compuesto 5 (12,96 g, 80%, tres etapas) en forma de un sólido de color blanco.

C) Compuesto 6

Se añadió cloruro de terc-butildifenilsililo (0,75 ml, 2,9 mmol) a una solución fría (0 °C) del Compuesto 5 (1 g, 2,8 mmol) y trietilamina (0,45 ml, 3,2 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se vertió en EtOAc y se lavó secuencialmente con HCl al 5%, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc del 10% al 40%/hexanos) proporcionó el alcohol, Compuesto 6 (1,02 g, 61%) en forma de un aceite (también se aislaron 0,42 g del diol protegido con sililo regioisomérico).

D) Compuesto 7

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (1,6 ml, 22,4 mmol) a una solución fría (-78 °C) de cloruro de oxalilo (0,98 ml, 11,2 mmol) en CH₂Cl₂ (70 ml). Después de agitar durante 30 minutos, a la reacción se le añadió una solución del Compuesto 6 (4,8 g, 8,0 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml). La agitación continuó durante 45 minutos a -78 °C y a la reacción se le añadió trietilamina (4,72 ml, 33,7 mmol). La reacción se agitó a -78 °C durante 15 minutos después de lo cual el baño de hielo se retiró y la reacción se dejó calentar gradualmente durante 45 minutos. Después, la reacción se vertió en CH₂Cl₂ y la fase orgánica se lavó secuencialmente con HCl acuoso al 5%, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío, proporcionando el aldehído, Compuesto 7, que se usó sin purificación adicional.

E) Nucleósido 8

Se añadió gota a gota nBuLi (2,5 M, 4,34 ml, 10,9 mmol) a una solución fría (0 °C) en agitación de bromuro de trifetilfosfonio (3,88 g, 10,9 mmol) en THF seco (60 ml). Después de agitar durante 1 hora, la solución de color rojo se enfrió a -78 °C y a la reacción se le añadió gota a gota una solución de aldehído 7 anterior (8,4 mmol) en THF seco (15 ml). La reacción se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente y la agitación continuó durante 16 horas más. Después, la reacción se interrumpió cuidadosamente usando NH₄Cl saturado y se repartió entre EtOAc y agua. La fase orgánica se lavó secuencialmente con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc al 10% en hexanos) proporcionó olefina, Compuesto 8 (4,84 g, 97% de 26) en forma de un aceite incoloro.

F) Nucleósido 9

Se añadió fluoruro de tetrabutylamonio (1 M en THF, 10,00 ml, 10,0 mmol) a una solución del Compuesto 8 (4,83 g, 8,1 mmol) en THF (35 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas después de lo cual el disolvente se retiró al vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc al 40% en hexanos) proporcionó alcohol, Compuesto 9 (2,79 g, 97%) en forma de un aceite incoloro.

G) Nucleósido 10

Se añadió hidruro sódico (60% p/p en aceite mineral, 0,4 g, 10 mmol) a una solución fría (0 °C) del Compuesto 9 (1,44 g, 4,1 mmol) y bromuro de bencilo (0,71 ml, 6,0 mmol) en DMF (16 ml). Después de agitar durante 1 hora a 0 °C, la reacción se interrumpió cuidadosamente con agua y se repartió entre EtOAc y agua. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc del 10 al 25% en hexanos) proporcionó la olefina, Compuesto 10 (1,84 g, cuantitativo) en forma de un aceite incoloro.

H) Nucleósido 11

Se añadió tetróxido de osmio (OsO₄, solución al 25% en iPrOH, 1 ml) a una solución del Compuesto 10 (1,80 g, 4,0 mmol) y N-metilmorfolin-N-óxido (NMO, 0,94 g, 8,0 mmol) en acetona al 95%/agua (25 ml). Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente, a la reacción se le añadió más cantidad de una solución de OsO₄ (0,5 ml) y NMO (0,40 g). Después de agitar durante un total de 48 horas, la reacción se diluyó con EtOAc, se lavó con NaHSO₃ al 10% y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc del 40 al 50% en hexanos) proporcionó el diol, Compuesto 11 (1,68 g, 87%, mezcla de isómeros de aprox. 1:1) en forma de un aceite incoloro.

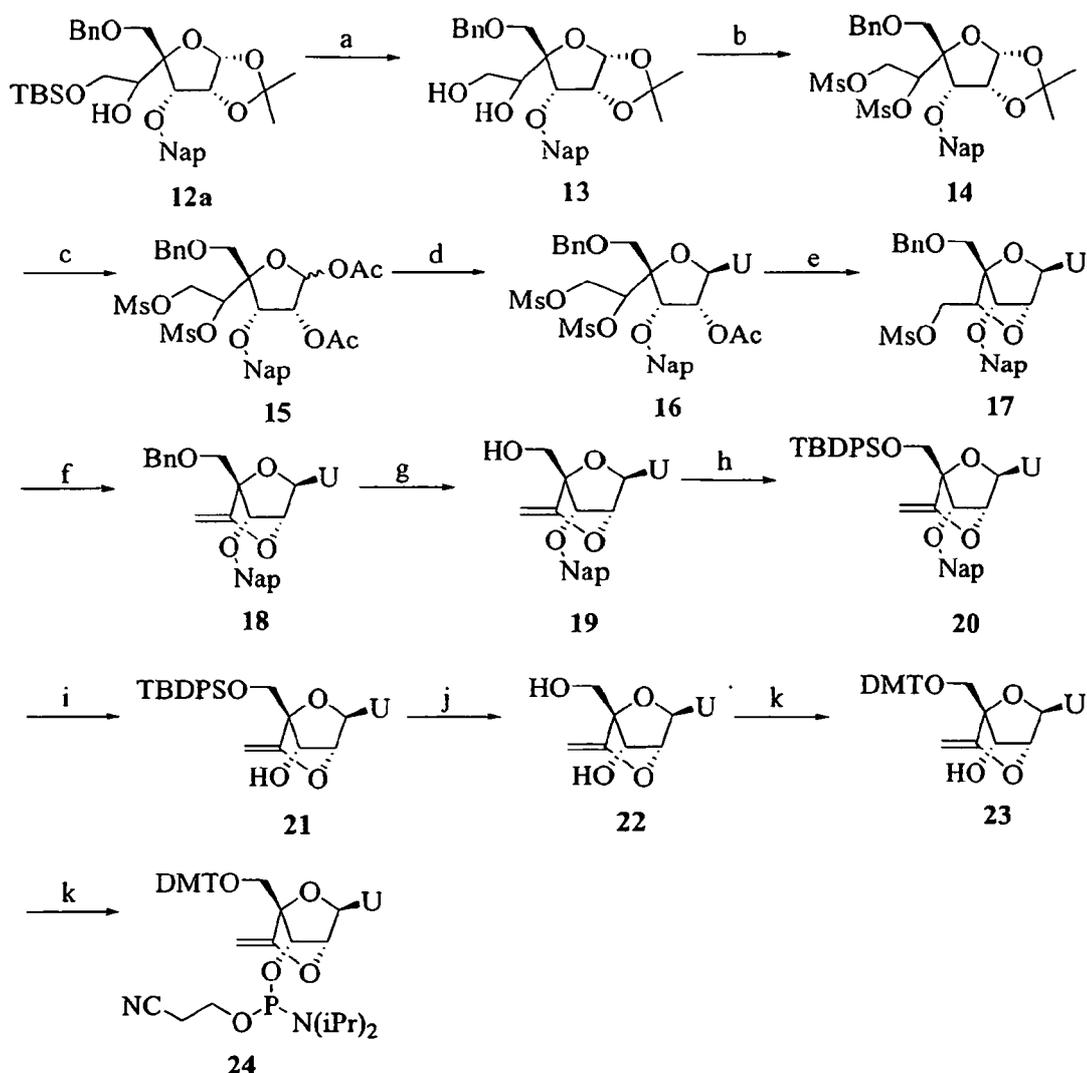
I) Nucleósidos 12a y 12b

Se añadió TBSCl (0,66 g, 4,4 mmol) a una solución fría (0 °C) del Compuesto 11 (1,63 g, 3,4 mmol) en piridina (17 ml). Después de agitar durante 4 h a 0 °C, la reacción se diluyó con EtOAc, la fase orgánica se lavó con agua y

salmuera, se secó y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO_2 , eluyendo con EtOAc del 10 al 20% en hexanos) proporcionó los alcoholes, compuestos 12a y 12b (0,90 g y 1,17 g, estereoquímica absoluta no asignada) en forma de aceites incoloros.

Ejemplo 2

5 Esquema 2



(a) $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$, Et_3N , THF, 84% (b) MsCl , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , 79% (c) AcOH , Ac_2O , H_2SO_4 , 44% (d) Uracilo, BSA, TMSOTf , CH_3CN (e) K_2CO_3 , MeOH, 51% de 154 (f) TBAF, THF, 80 °C, 16 h (g) BCl_3 , CH_2Cl_2 (h) TBDPSCI, imidazol, DMF (i) DDQ, CH_2Cl_2 , H_2O (j) $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$, Et_3N , THF (k) DMTCl , piridina (l) $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, tetrazol, NMI, DMF.

Compuesto 13

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (1,56 ml, 9,6 mmol) a una solución del Compuesto 12a (0,95 g, 1,6 mmol, estereoquímica absoluta del grupo hidroxilo no asignada) y trietilamina (0,56 ml, 4,0 mmol) en THF (16 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, el THF se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO_2 , eluyendo con EtOAc del 40 al 50% en hexanos) proporcionó el diol, Compuesto 13 (0,65 g, 84%).

Compuesto 14

Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,32 ml, 4,1 mmol) a una solución fría (0 °C) del Compuesto 13 (0,65 g, 1,4 mmol), trietilamina (0,57 ml, 4,1 mmol) y dimetilaminopiridina (49 mg, 0,4 mmol) en diclorometano (4 ml). La reacción se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas después de lo cual se diluyó con

EtOAc. La fase orgánica se lavó secuencialmente con HCl al 5%, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc al 40% en hexanos) proporcionó el dimesilato, Compuesto 14 (0,68 g, 79%).

Compuesto 154

5 Se añadió ácido sulfúrico concentrado (3 gotas) a una solución del Compuesto 14 (0,68 g, 1,1 mmol), ácido acético (2 ml) y anhídrido acético (0,4 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se concentró a alto vacío. El residuo se diluyó con EtOAc, se lavó cuidadosamente con una solución saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc del 40 al 50% en hexanos) proporcionó el diacetato, Compuesto 15 (0,32 g, 44%).

10 Compuesto 17

Se añadió N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (0,58 ml, 2,4 mmol) a una suspensión del Compuesto 15 (0,32 g, 0,5 mmol) y uracilo (0,11 g, 0,9 mmol) en CH₃CN (3 ml). Después de calentar a 40°C durante 15 min para obtener una solución transparente, a la reacción se le añadió triflato de trimetilsililo (0,13 ml, 0,7 mmol). Después de calentar a reflujo durante 2 h, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en EtOAc. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío, proporcionando el nucleósido en bruto, Compuesto 16, que se usó sin purificación adicional.

15 Se añadió K₂CO₃ (0,14 mg, 1,0 mmol) a una solución del nucleósido en bruto, Compuesto 16 (anterior) en MeOH (5 ml). Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente, el disolvente se retiró al vacío y el residuo se repartió entre EtOAc y salmuera. La fase orgánica se recogió, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío, proporcionando 6 (estereoquímica absoluta no determinada). La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con acetona al 25% en CHCl₃) proporcionó el nucleósido, Compuesto 17 (0,14 g, 51% de 4).

20 Compuesto 18

Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (solución 1 M en THF, 0,10 ml, 0,1 mmol) a una solución del Compuesto 17 en THF (0,05 ml). El calentamiento de la reacción a 100 °C durante 16 horas proporcionó el nucleósido, Compuesto 18. CLEM: tiempo de retención 3,81 min; M+H calc. 499,18, observado 499,0.

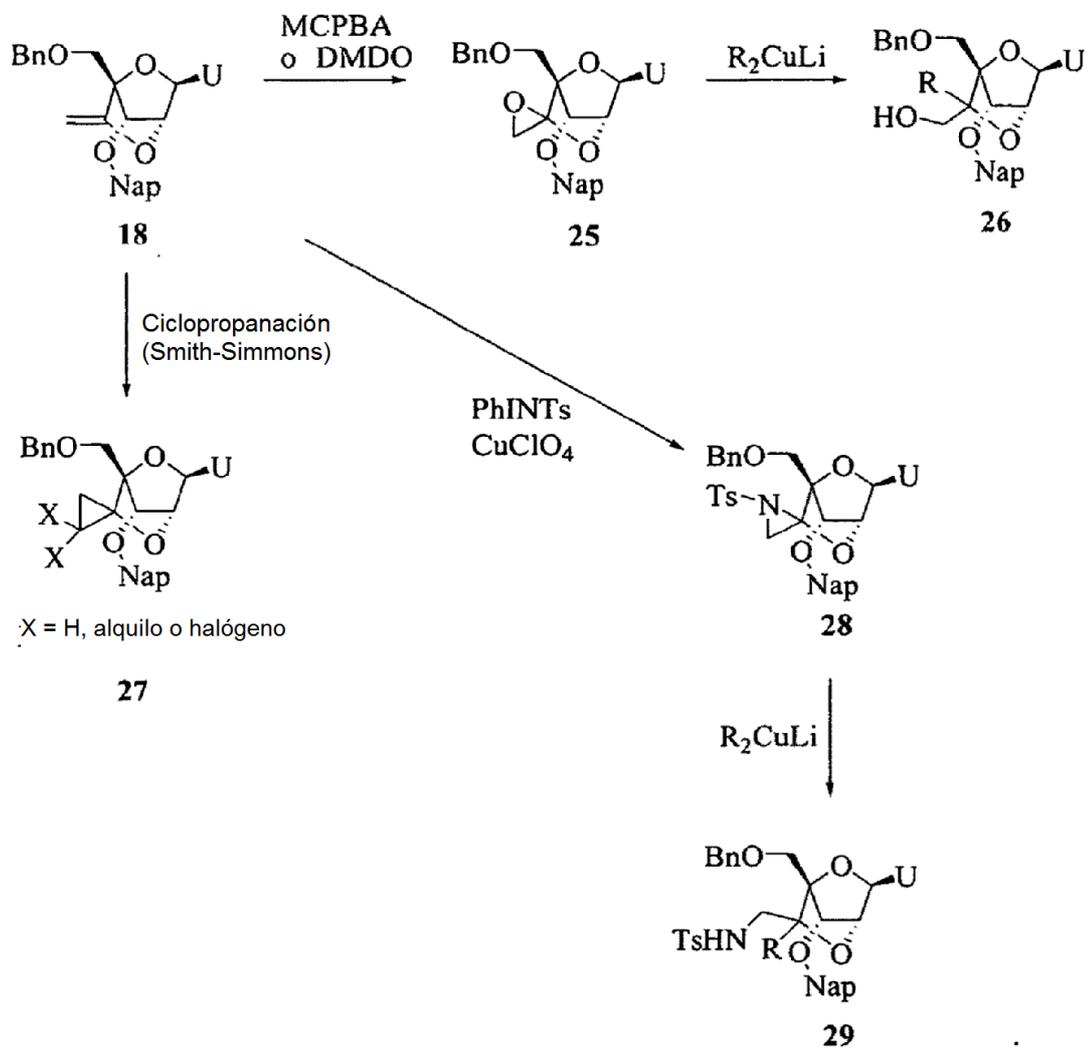
25 Compuesto 24

El grupo protector de bencilo en Compuesto 18 se retira usando BCl₃ en diclorometano a temperaturas entre -78 °C y 0 °C, proporcionando el Compuesto 19. El alcohol primario del Compuesto 19 se protegió como el TBDPS éter, proporcionando el Compuesto 20. Después, el grupo protector 3'O-Nap se eliminó usando DDQ en diclorometano y agua, proporcionando el Compuesto 21. La eliminación del grupo protector 5'O-TBDPS proporciona el Compuesto 22. El 5'-hidroxilo se protegió usando DMTCl en piridina, proporcionando el Compuesto 23 que se fosforiló, proporcionando la amidita, Compuesto 24.

30

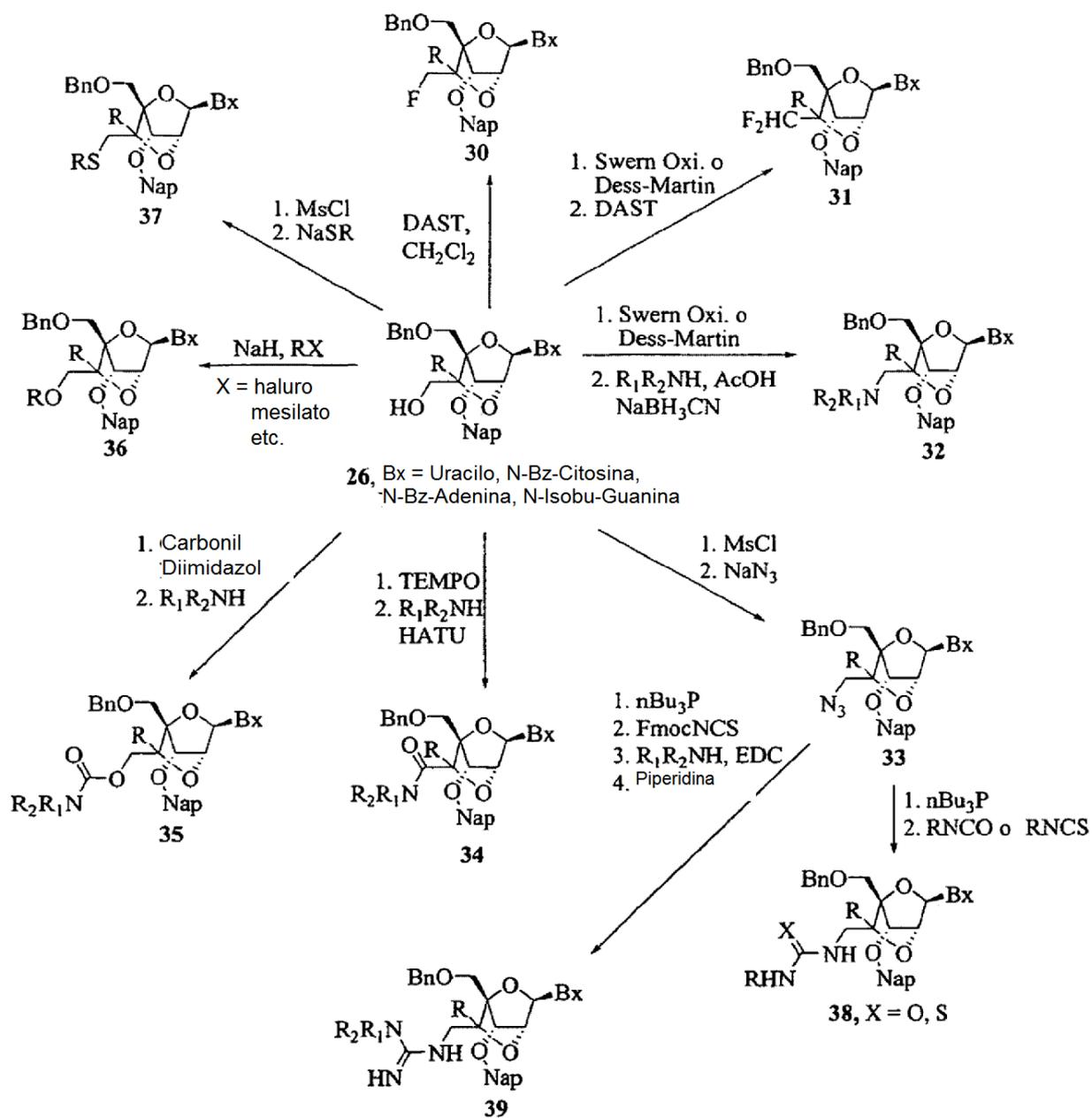
Ejemplo 3

Esquema 3



Ejemplo 4

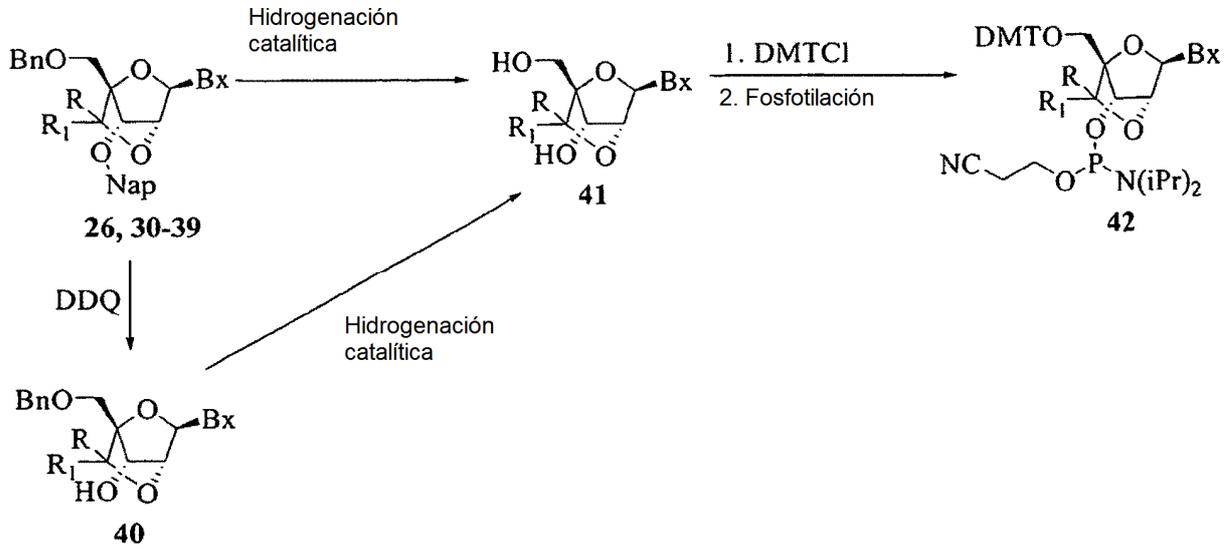
Esquema 4



5 cada uno de R, R₁ y R₂ es independientemente H, halógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquilo sustituido, alqueno sustituido, alquino sustituido o un grupo protector.

Ejemplo 5

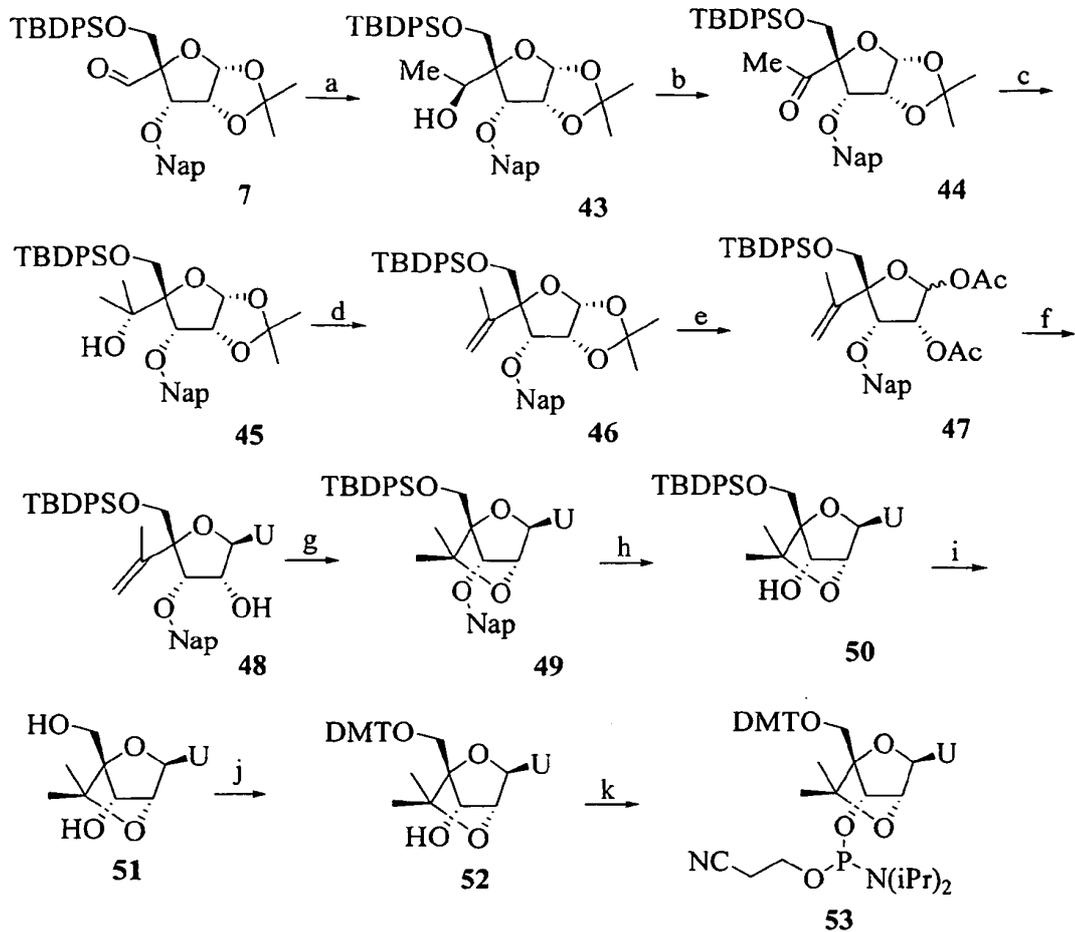
Esquema 5



5 cada uno de R y R₁ es independientemente H, halógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquilo sustituido, alqueno sustituido, alquino sustituido o un grupo protector.

Ejemplo 6

Esquema 6



A) Compuesto 43

Una suspensión de cloruro de cerio III (2,96 g, 12,0 mmol) en THF (50 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió bromuro de metil magnesio (8,6 ml de una solución 1,4 M en THF, 12 mmol) durante 5 minutos y la agitación continuó durante 90 minutos más después de lo cual la reacción se enfrió a -78 °C. A la reacción se le añadió una solución del Compuesto 78 en THF (20 ml). Después de agitar durante 90 minutos más, la reacción se interrumpió con una solución sat. de NH₄Cl y se vertió en EtOAc. La fase orgánica se lavó secuencialmente con HCl acuoso al 5%, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc al 20%/hexanos) proporcionó el alcohol, Compuesto 43 (4,37 g).

B) Compuesto 44

Se añadió gota a gota (1,41 ml, 19,9 mmol) dimetilsulfóxido a una solución fría (-78 °C) de cloruro de oxalilo (0,87 ml, 10,0 mmol) en CH₂Cl₂ (70 ml). Después de agitar durante 30 minutos, a la reacción se le añadió una solución del Compuesto 43 (4,35 g, 7,1 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml). La agitación continuó durante 45 minutos a -78 °C y a la reacción se le añadió trietilamina (4,20 ml, 30,0 mmol). La reacción se agitó a -78 °C durante 15 minutos después de lo cual el baño de hielo se retiró y la reacción se dejó calentar gradualmente durante 45 minutos. Después, la reacción se vertió en CH₂Cl₂ y la fase orgánica se lavó secuencialmente con HCl acuoso al 5%, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío, proporcionando la cetona, Compuesto 44, que se usó sin purificación adicional.

C) Compuesto 45

Una suspensión de cloruro de cerio III (543 mg, 2,2 mmol) en THF (120 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. La reacción se enfrió en un baño de hielo, se añadió bromuro de metil magnesio (14,7 ml de una solución 3 M en dietiléter, 44 mmol) durante 15 minutos y la agitación continuó durante 90 minutos más después de lo cual la reacción se enfrió a -78 °C. A la reacción se le añadió una solución del Compuesto 44 (anterior) en THF (100 ml) y después de la agitación durante 90 minutos más, la mezcla se inactivó con una solución saturada de NH₄Cl y se vertió en EtOAc. La fase orgánica se lavó secuencialmente con HCl acuoso al 5%, NaHCO₃ saturada y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío. La filtración a través de un lecho de gel de SiO₂ con elución de EtOAc proporcionó el alcohol, Compuesto 45 (11,8 g). Los espectros de RMN ¹H y CLEM son coherentes con la estructura.

D) Compuesto 46

Se disolvió Compuesto 45 (11,8 g, 18,8 mmoles) en piridina (94 ml) y cloruro de tionilo (2,75 ml, 37,6 mmoles) y después se calentó a 60°C durante 1 hora. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en EtOAc y salmuera. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío. La filtración a través de un lecho de SiO₂ y la elución con EtOAc proporcionó el alqueno, Compuesto 46 (9,8 g). Los espectros de RMN ¹H y CLEM son coherentes con la estructura.

E) Compuesto 47

Se añadió H₂SO₄ concentrado (2 gotas) a una solución del Compuesto 46 (anterior) en ácido acético glacial (100 ml) y anhídrido acético (9,8 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se vertió en EtOAc y la fase orgánica se lavó con agua, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío, proporcionando el diacetato, Compuesto 47 (10,38 g), que se usó directamente en la siguiente etapa. Los espectros de RMN ¹H y CLEM son coherentes con la estructura.

F) Compuesto 48

Se añadió N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (16,4 ml, 66,8 mmol) a una suspensión del Compuesto 47 (10,38 g, 15,9 mmol) y uracilo (3,6 g, 31,8 mmol) en CH₃CN (100 ml). Después del calentamiento a 40 °C durante 15 minutos para conseguir una solución transparente, la reacción se enfrió a 0 °C y a la reacción se le añadió triflato de trimetilsililo (5,8 ml, 31,8 mmol). Después del calentamiento a 70 °C durante 4 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en EtOAc. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío, proporcionando nucleósido en bruto en forma de un monoacetato, que se usó sin purificación adicional.

El monoacetato de nucleósido en bruto se trató con NH₃ 7 N/MeOH (300 ml) durante 12 horas y después la reacción se concentró al vacío. La filtración a través de un lecho de gel de SiO₂ y la elución con MeOH al 5%/EtOAc, proporcionó el nucleósido, Compuesto 48 (8,46 g, 80% del Compuesto 47). Los espectros de RMN ¹H y CLEM son coherentes con la estructura.

G) Compuesto 49

Se trató Compuesto 48 (7,46 g, 11,3 mmoles) con acetato de mercurio (II) (7,9 g, 24,8 mmoles) en diclorometano

(125 ml) durante 16 horas a temperatura ambiente. En este momento, se añadió NaCl saturado (ac.) (30 ml) con agitación durante 15 minutos. Después, se añadió más cantidad de NaCl saturado (ac.) y la fase orgánica se separó, se secó (Na_2SO_4) y se concentró al vacío, proporcionando el cloruro de mercurio en bruto. La espuma resultante se disolvió en tolueno (125 ml) y se trató con AIBN (100 mg) e hidruro de tributilestano (Bu_3SnH , 7,6 ml, 28,3 mmoles).
 5 La reacción continuó a temperatura ambiente durante 1 hora y se calentó a 50°C con agitación durante 1 hora más. Después, se añadió tetracloruro de carbono (30 ml) con agitación durante 1 hora. Se añadió diclorometano, la fase orgánica se decantó, se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía en columna (SiO_2 , eluyendo con EtOAc al 30%/hexanos a EtOAc al 50%/hexanos) proporcionó el nucleósido, Compuesto 49 (5,08 g, 68% del Compuesto 48). Los espectros de RMN ^1H y CLEM son coherentes con
 10 la estructura.

H) Compuesto 50

Se añadió 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) (2,4 g, 10,6 mmol) a una solución del Compuesto 49 (4,7 g, 7,9 mmol) en diclorometano (50 ml) y H_2O (3 ml). Después de agitar durante 16 horas, la reacción se concentró al vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. Después, la fase orgánica se lavó secuencialmente con agua, agua: NaHCO_3 saturado (1:1) y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO_2 , usando un gradiente de MeOH del 2% al 5%/CH $_2$ Cl $_2$) proporcionó el nucleósido, Compuesto 50 (4,1 g, 99%) en forma de un sólido de color blanco. Los espectros de RMN ^1H y CLEM son coherentes con la estructura.
 15

I) Compuesto 51

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (6 ml) a una solución del Compuesto 50 (3,8 g, 7,27 mmol) y trietilamina (2,5 ml) en THF (20 ml) en un tubo de polipropileno. Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción se concentró al vacío y se añadió agua (30 ml) con agitación vigorosa. El sólido de color blanco resultante se recogió por filtración y se secó al vacío, proporcionando el nucleósido, Compuesto 51 (1,73 g, 84%) en forma de un sólido de color blanco. Los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y CLEM son coherentes con la estructura.
 20

J) Compuesto 52

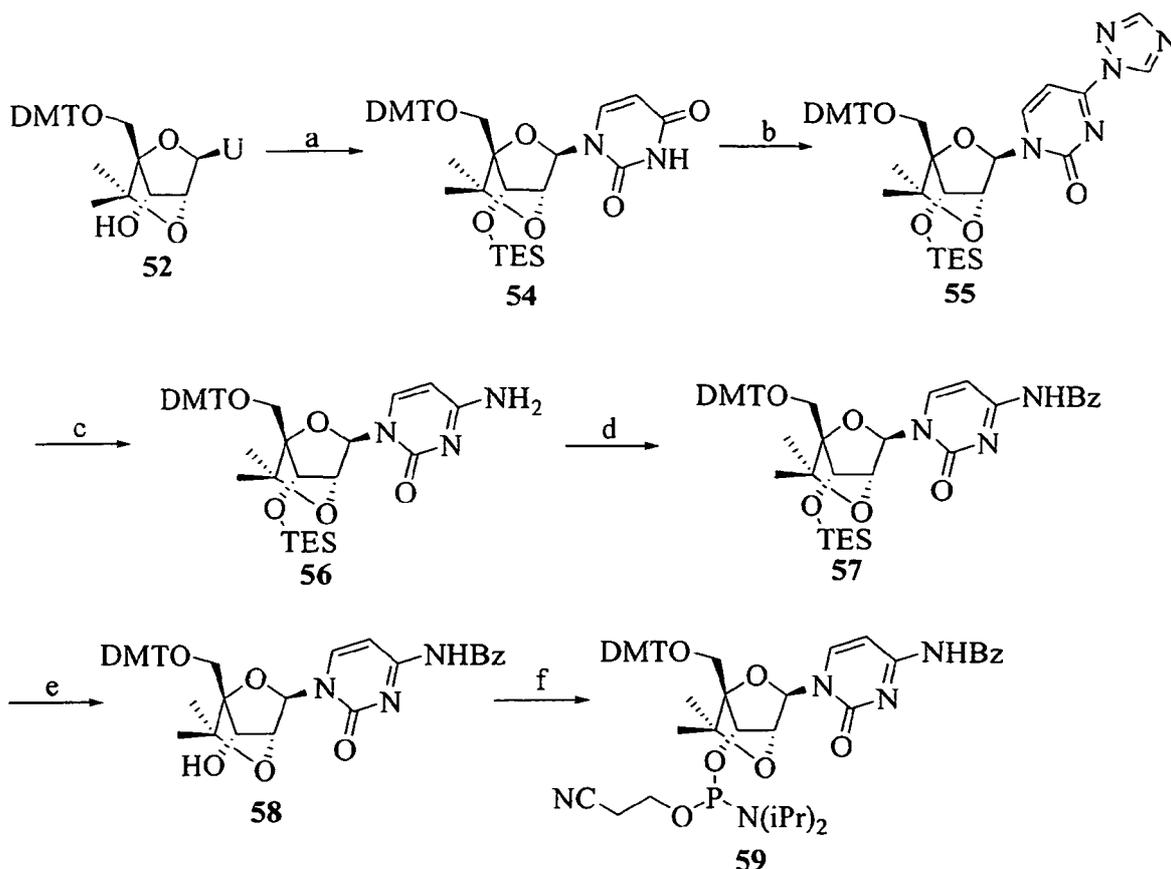
Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (2,5 g, 7,4 mmol) a una solución del Compuesto 51 (1,62 g, 5,7 mmoles) en piridina (30 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas, la reacción se vertió en EtOAc y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO_2 , eluyendo con acetona al 30%/diclorometano) proporcionó el nucleósido, Compuesto 52 (3,03 g, 91%) en forma de un sólido. Los espectros de RMN ^1H y CLEM son coherentes con la estructura.
 25

K) Compuesto 53

Se añadió 2-cianoetil tetraisopropilfosforodiamidita (1,1 ml, 3,5 mmol) a una solución del Compuesto 52 (1,35 g, 2,3 mmol), tetrazol (129 mg, 1,8 mmol) y N-metilimidazol (46 μl , 0,58 mmol) en DMF (18 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se vertió en EtOAc y la fase orgánica se lavó con salmuera al 90% y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO_2 , eluyendo con EtOAc al 60%/hexanos) proporcionó la fosforamidita, Compuesto 53 en forma de un sólido de color blanco (1,6 g, 94%). Los espectros de RMN ^1H y CLEM son coherentes con la estructura. RMN ^{31}P (CDCl_3) δ : 150,08, 149,22.
 30
 35

Ejemplo 7

Esquema 7



Esquema 6 (a) TESCOI, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, ta; (b) POCl₃, 1,2,4-Triazol, Et₃N, CH₃CN, ta; (c) NH₃ acuoso, 1,4-dioxano, ta; (d) Bz₂O, DMF, ta; (e) Et₃N·3HF, Et₃N, THF, ta; (f) CNCH₂CH₂OP(N-iPr)₂, Tetrazol, NMI, DMF.

A) Compuesto 54

5 Se añadió cloruro de trietilsililo (868 µl, 5,17 mmol) a una solución del Compuesto 52 (1,52 g, 2,6 mmol) e imidazol (0,74 g, 10,3 mmol) en DMF (25 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se vertió en EtOAc y la fase orgánica se extrajo secuencialmente con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc del 25% al 50%/hexanos) proporcionó el nucleósido, Compuesto 54 (1,7 g, 95%) en forma de un sólido de color blanco. Los espectros de RMN ¹H y CLEM son coherentes con la estructura.

B) Compuesto 57

15 Se añadió oxloruro de fósforo (1,8 ml, 19,4 mmol) a una suspensión fría (0 °C) de 1,2,4-triazol (4 g, 58 mmol) en CH₃CN (25 ml). Después de agitar durante 15 minutos, a la reacción se le añadió trietilamina (13,4 ml, 97 mmol) y la agitación continuó durante 30 minutos. A la reacción se le añadió una solución del Compuesto 54 (1,7 g, 2,4 mmol) en CH₃CN (20 ml) a 0 °C. Después de agitar durante 10 minutos, el baño de hielo se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después, el disolvente se retiró al vacío y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. Después, la fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío, proporcionando el Compuesto 55 en bruto, que se usó sin purificación adicional.

20 Se añadió amoniaco acuoso (5 ml) a una solución del Compuesto 55 (anterior) en dioxano (20 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se concentró al vacío y se secó a alto vacío durante 8 horas, proporcionando el nucleósido, Compuesto 56, que se usó sin purificación adicional.

25 Se añadió anhídrido benzoico (0,814 g, 3,6 mmol) a una solución del Compuesto 56 (anterior) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 h, la reacción se vertió en EtOAc y la fase orgánica se extrajo con NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc del 40% al 60%/hexanos) proporcionó el nucleósido, Compuesto 57 (1,57 g, 81% del Compuesto 54) en forma de un sólido de color blanco. Los espectros de RMN ¹H y CLEM son coherentes con la estructura.

C) Compuesto 58

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (1,6 ml) a una solución del Compuesto 57 (1,57 g, 1,95 mmol) y trietilamina (0,7 ml) en THF (8 ml) de un tubo de polipropileno. Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se concentró al vacío, el residuo se disolvió en EtOAc, la fase orgánica se lavó secuencialmente con agua, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con MeOH al 10%/CHCl₃ que contenía Et₃N al 1%) proporcionó el nucleósido, Compuesto 58 (1,2 g, 89%) en forma de un sólido de color blanco. Los espectros de RMN ¹H y CLEM son coherentes con la estructura.

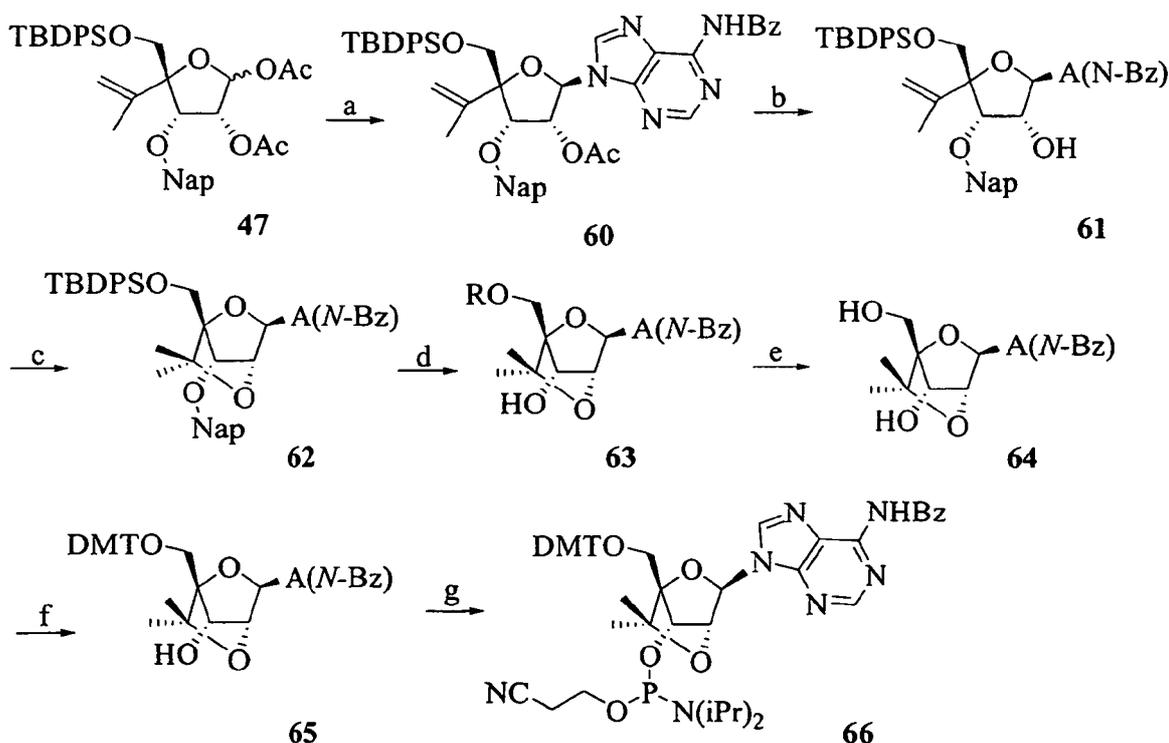
D) Compuesto 59

Se añadió 2-cianoetil tetraisopropilfosfordiamidita (0,83 ml, 2,6 mmol) a una solución del Compuesto 58 (1,2 g, 1,7 mmol), tetrazol (91 mg, 1,4 mmol) y N-metilimidazol (34 µl, 0,43 mmol) en DMF (9 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se vertió en EtOAc, la fase orgánica se lavó con salmuera al 90% y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (SiO₂, eluyendo con EtOAc al 60%/hexanos) proporcionó la fosforamidita, Compuesto 59 en forma de un sólido de color blanco (0,83 g, 54%). Los espectros de RMN ¹H y CLEM son coherentes con la estructura. RMN ³¹P (CDCl₃) δ: 150,29, 129,51.

15 Ejemplo 8

Preparación del Compuesto 66

Esquema 8



Esquema 8 (a) 6-N-benzoiladenina, BSA, TMSOTf, CH₃CN, reflujo, 8 h; (b) NH₃/MeOH; (c) Hg(OAc)₂; AIBN, Bu₃SnH; (d) DDQ, CH₂Cl₂, H₂O, ta; (e) Et₃N.3HF, Et₃N, THF, ta, 16 h; (f) DMTCI, piridina, ta, 16 h; (g) CNCH₂CH₂OP(N-iPr)₂, tetrazol, NMI, DMF.

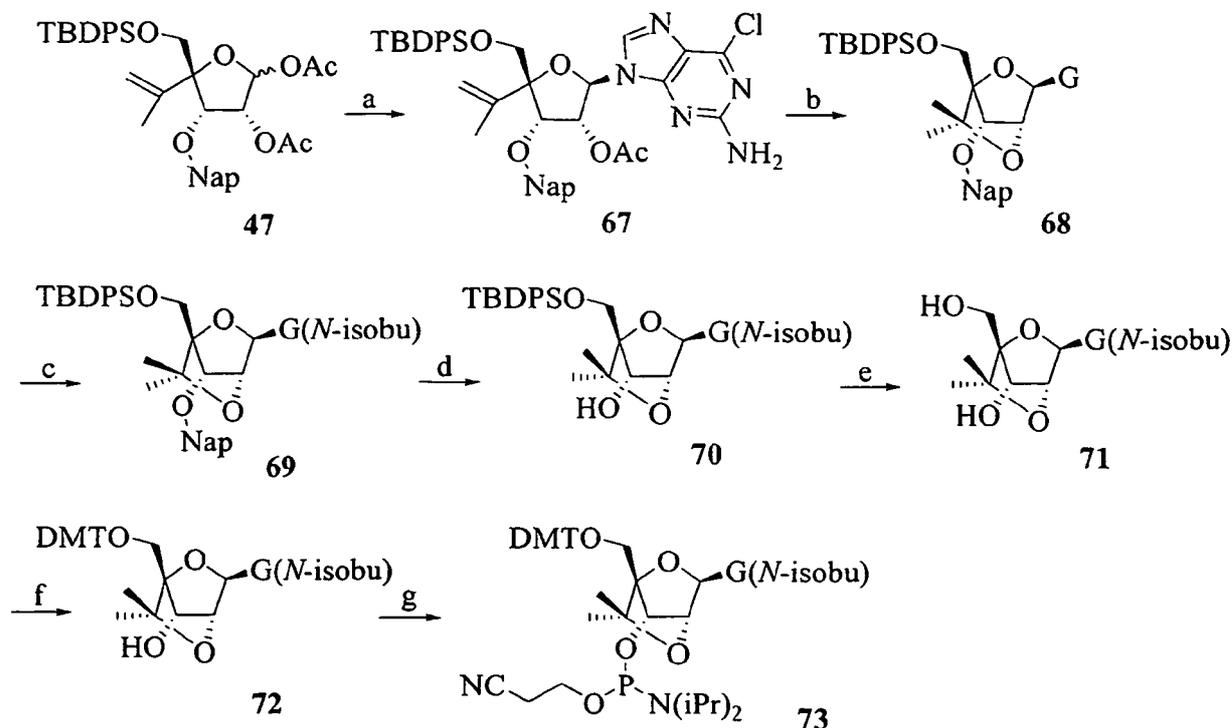
El Compuesto 47 se preparó como por el procedimiento ilustrado en el Ejemplo 6.

Ejemplo 9

Preparación del Compuesto 73

25

Esquema 9



Esquema 9 (a) 2-amino-6-cloropurina, BSA, TMSOTf, CH₃CN, reflujo, 2 h; (b) 3-hidroxiopropionitrilo, NaH, THF, 4 h; Hg(OAc)₂; AIBN, Bu₃SnH (c) anhídrido isobutérico, DMAP, DMF, 60 °C, 24 h; (d) DDQ, CH₂Cl₂, H₂O, ta, 16 h; (e) Et₃N·3HF, Et₃N, THF, ta; (f) DMTCl, piridina, ta; (g) CNCH₂CH₂OP(N-iPr)₂, tetrazol, NMI, DMF.

El Compuesto 47 se preparó como por el procedimiento ilustrado en el Ejemplo 6.

Ejemplo 10

Síntesis de fosforamiditas nucleósidos

La preparación de fosforamiditas nucleósidos se realizó siguiendo los procedimientos que se ilustran en el presente documento y en la técnica, tal como, pero sin limitación, en la Patente de Estados Unidos 6.426.220 y en el documento publicado PCT WO 02/36743.

Ejemplo 11

Síntesis de oligonucleótidos y oligonucleósidos

Los compuesto oligoméricos usados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse de manera conveniente y rutinaria mediante las técnicas bien conocidas de síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis lo comercializan diversos fabricantes, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Adicionalmente o como alternativa, para dicha síntesis, pueden emplearse otros medios conocidos en la materia. Para preparar oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados se conoce bien el uso de técnicas similares.

Oligonucleótidos: Los oligonucleótidos fosfodiéster (P=O) no sustituidos y sustituidos pueden sintetizarse en un sintetizador de ADN automático (Applied Biosystems modelo 394) usando química convencional de fosforamiditas con oxidación por yodo.

Los fosforotioatos (P=S) se sintetizan de manera similar a los oligonucleótidos fosfodiéster con las siguientes excepciones: la tiación se efectúa utilizando una solución de disulfuro fenilacetil 0,2 M en 3-picolina al 50% en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces fosfito. El tiempo de la etapa de reacción de la tiación aumenta a 180 segundos y es posterior a la etapa normal de protección. Después de escisión a partir de la columna CPG y desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55° C (12-16 horas), los oligonucleótidos se recuperan por precipitación con más de 3 volúmenes de etanol a partir de una solución de NH₄OAc 1 M. Los oligonucleótidos fosfinato pueden prepararse como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.508.270.

Los oligonucleótidos alquil fosfonato pueden prepararse como se describe en la Patente de Estados Unidos 4.469.863.

Los oligonucleótidos 3'-desoxi-3'-metilen fosfonato pueden prepararse como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.610.289 ó 5.625.050.

Los oligonucleótidos fosforamidita pueden prepararse como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.256.775 o en la Patente de Estados Unidos 5.366.878.

- 5 Los oligonucleótidos alquilfosfonotioato pueden prepararse como se describe en las solicitudes PCT publicadas PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como WO 94/17093 y WO 94/02499, respectivamente).

Los oligonucleótidos 3'-desoxi-3'-amino fosforamidato pueden prepararse como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.476.925.

Los oligonucleótidos fosfotriéster pueden prepararse como se describe en la Patente de Estados 5.023.243.

- 10 Los oligonucleótidos boranofosfato pueden prepararse como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.130.302 y 5.177.198.

15 Oligonucleósidos: Los oligonucleósidos unidos a metilen-metil-imino, identificados también como oligonucleósidos unidos a MMI, los oligonucleósidos unidos a metilen-dimetil-hidrazo, identificados también como oligonucleósidos unidos a MDH, los oligonucleósidos unidos a metilen-carbonil-amino, identificados también como oligonucleósidos unidos a amida-3 y los oligonucleósidos unidos a metilen-amino-carbonilo, identificados también como oligonucleósidos unidos a amida-4, así como los compuestos oligoméricos de estructura mixta que poseen, por ejemplo, uniones MMI y P=O o P=S alternativas, pueden prepararse como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.378.825; 5.386.023; 5.489.677; 5.602.240 y 5.610.289.

20 Los oligonucleósidos unidos a formacetal y tioformacetal pueden prepararse como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.264.562 y 5.264.564.

Los oligonucleósidos unidos a óxido de etileno pueden prepararse como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.223.618.

Ejemplo 12

Aislamiento de oligonucleótidos

25 Después de la escisión a partir del soporte sólido de vidrio poroso controlado y desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55° C durante 12-16 horas, los oligonucleótidos u oligonucleósidos se recuperan por precipitación de NH₄OAc 1 M con >3 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados se analizan por espectroscopia de masas por electropulverización (determinación del peso molecular) y por electroforesis capilar en gel. Las cantidades
30 relativas de enlaces fosforotioato y fosfodiéster obtenidas en la síntesis se determina por la relación del peso molecular correcto con respecto al producto -16 uma (+/-32 +/-48). Para algunos estudios, los oligonucleótidos se purifican por HPLC, como describen Chiang y col., J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con material purificado por HPLC son generalmente similares a los obtenidos con material no purificado por HPLC.

Ejemplo 13

Síntesis de oligonucleótidos usando un formato de placa de 96 pocillos

35 Los oligonucleótidos pueden sintetizarse mediante química de fosforamidita P(III) en fase sólida sobre un sintetizador automático capaz de ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato de 96 pocillos. Los enlaces internucleósido fosfodiéster se consiguen por oxidación con yodo acuoso. Los enlaces internucleótido fosforotioato se generan por su sulfuración utilizando 3,4,5-trisubstituido-1,2,4-benzoditiol-3-ona 1,1 dióxido (Reactivo Beaucage) en acetronitrilo anhidro. Las betacianoetil-diisopropil fosforamiditas de base protegida convencionales se adquieren a
40 partir de proveedores comerciales (por ejemplo PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, o Pharmacia, Piscataway, NJ). Los nucleósidos no convencionales se sintetizan mediante procedimientos convencionales o patentados. Estos se utilizan como beta-cianoetil-diisopropil fosforamiditas de base protegida.

Los oligonucleótidos se escinden a partir del soporte y se desprotegen con NH₄OH concentrado a temperatura elevada (55-60° C) durante 12-16 horas y el producto liberado se seca después al vacío. Después, el producto seco
45 se resuspende en agua estéril para conseguir una placa maestra a partir de la cual todas las muestras analíticas y de la placa de ensayo se diluyen utilizando pipetas robóticas.

Ejemplo 14

Análisis de oligonucleótidos usando un formato de placa de 96 pocillos

50 La concentración del oligonucleótido en cada pocillo se valoró por dilución de muestras y espectroscopia de absorción UV. La integridad de longitud completa de los productos individuales se evaluó por electroforesis capilar (EC) en cualquier formato de 96 pocillos (Beckman P/ACE™ MDQ) o, para muestras preparadas individualmente, en

un aparato de EC comercial (por ejemplo, Beckman P/ACE™ 5000, ABI 270). La composición de las bases y estructural se confirmó por análisis de masa de los compuestos oligoméricos utilizando espectroscopia de masa por electropulverización. Todas las placas de ensayo evaluadas de diluyeron de la placa maestra usando pipetas robóticas sencillas y multicanal. Se consideró que las placas eran aceptables si al menos el 85% de los compuestos oligoméricos en la placa tenían al menos una longitud completa de un 85%.

Ejemplo 15

Cultivo celular y tratamiento con oligonucleótidos

El efecto de los compuestos oligoméricos sobre la expresión de ácido nucleico diana puede evaluarse en cualquiera de una diversidad de tipos celulares siempre que el ácido nucleico diana este presente a niveles que puedan medirse. Esto puede determinarse de manera rutinaria usando, por ejemplo, análisis por PCR o por transferencia de Northern. Las líneas celulares derivadas de tejidos y especies múltiples pueden obtenerse de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA).

El siguiente tipo celular se proporciona con fines ilustrativos, pero de manera rutinaria, siempre que la diana se exprese en el tipo celular seleccionado, pueden usarse otros tipos de células. Esto puede determinarse fácilmente por procedimientos rutinarios en la materia, por ejemplo, por análisis de transferencia de Northern, ensayos de protección con ribonucleasa o RT-PCR.

Células B.END: La línea celular endotelial de cerebro de ratón b.END se obtuvo gracias al Dr. Werner Risau del Max Plank Institute (Bad Nauheim, Alemania). Las células b.END se cultivaron de manera rutinaria en DMEM, con alta concentración de glucosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente un 90% se sometieron, de manera rutinaria, a pases por tripsinización y dilución. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria nº 353872, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de aproximadamente 3.000 células/por pocillo para su uso, incluyendo pero sin limitación, experimentos de transfección de compuestos oligoméricos.

Los experimentos implican el tratamiento de células con compuestos oligoméricos:

Cuando las células alcanzan la confluencia apropiada, se tratan con los compuestos oligoméricos usando un procedimiento de transfección como se describe.

LIPOFECTIN™

Cuando las células alcanzan una confluencia del 65-75% se tratan con oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcla con LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio con suero reducido Opti-MEM™-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para conseguir la concentración deseada de oligonucleótido y una concentración de LIPOFECTIN™ de 2,5 ó 3 µg/ml por oligonucleótido 100 nM. Esta mezcla de transfección se incubaba a temperatura ambiente durante aproximadamente 0,5 horas. Para el cultivo de las células en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavan una vez con OPTI-MEM™-1 100 µl y después se tratan con 130 µl de la mezcla de transfección. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos u otras placas de cultivo tisular convencionales se tratan de manera similar, usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido. Las células se tratan y los datos se obtienen por duplicado o por triplicado. Después de aproximadamente 4-7 horas de tratamiento a 37° C, el medio que contiene la mezcla de transfección se sustituye por medio de cultivo recién preparado. Las células se recogen 16-24 horas después del tratamiento con el oligonucleótido.

Otros reactivos de transfección adecuados, conocidos en la materia, incluyen, pero sin limitación, CYTOFECTIN™, LIPOFECTAMINE™, OLIGOFECTAMINE™ y FUGENE™. Otros procedimientos de transfección adecuados, conocidos en la materia incluyen, pero sin limitación, electroporación.

Ejemplo 16

Análisis de inhibición de una expresión diana por oligonucleótidos

La modulación antisentido de una expresión diana puede evaluarse en una diversidad de formas conocidas en la materia. Por ejemplo, niveles de ARNm diana puede cuantificarse, por ejemplo, por análisis de transferencia de Northern, reacción competitiva en cadena de polimerasa (PCR), o PCR en tiempo real. Actualmente se desea la PCR cuantitativa en tiempo real. Los análisis de ARN pueden realizarse sobre ARN celular total o ARNm poli(A)+. Un procedimiento de análisis de ARN es el uso de ARN celular total, como se describe en otros ejemplos en el presente documento. En la materia se conocen bien procedimientos para el aislamiento de ARN. El análisis de transferencia de Northern es también rutinario en la materia. La PCR cuantitativa en tiempo real puede realizarse convenientemente usando el sistema de Detección de Secuencias disponible en el mercado ABI PRISM™ 7600, 7700 ó 7900, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles de proteína de una diana pueden cuantificarse de diversidad de formas bien conocidas en la materia, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia de Western (inmunotransferencia), ensayo de inmunoabsorbencia ligado a enzimas (ELISA) o separación de células activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a una diana pueden identificarse y obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, tales como a partir del catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse mediante procedimientos convencionales, bien conocidos en la materia, de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales. Por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., en *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997 instruyen sobre procedimientos para la preparación de antisuero policlonal. Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 11.4.1-11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997 instruyen sobre procedimientos para la preparación de anticuerpos monoclonales

Los procedimientos de inmunoprecipitación son convencionales en la materia y pueden encontrarse, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998. El análisis de transferencia de Western (inmunotransferencia) es convencional en la materia y puede encontrarse, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997. Los ensayos de inmunoabsorbencia ligados a enzimas (ELISA) son convencionales en la materia y pueden encontrarse, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991.

Ejemplo 17

Diseño de ensayos fenotípicos y estudios *in vivo* para el uso de inhibidores diana

20 *Ensayos fenotípicos*

Una vez identificados los inhibidores diana mediante los procedimientos descritos en el presente documento, se realizan investigaciones adicionales con los compuestos oligoméricos en uno o más ensayos fenotípicos, cada uno con criterios de valoración que pueden medirse predictivos de eficacia en el tratamiento de una patología o afección particular.

25 Los ensayos fenotípicos, kits y reactivos para su uso se conocen bien en la materia y en el presente documento se usan para investigar la función y/o asociación de una diana en individuos sanos y enfermos. Los ensayos fenotípicos representativos, que pueden adquirirse a partir de los diversos proveedores comerciales incluyen los que determinan la viabilidad celular, la citotoxicidad, proliferación o supervivencia celular (Molecular Probes, Eugene, OR; PerkinElmer, Boston, MA), los ensayos basados en proteínas que incluyen ensayos enzimáticos (Panvera, LLC, Madison, WI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Oncogene Research Products, San Diego, CA), regulación celular, traducción de señal, inflamación, procesos oxidativos y apoptosis (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI), ensayos de acumulación de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), de angiogénesis, ensayos de formación de tubos, ensayos de citocinas y hormonas y ensayos metabólicos (Chemicon International Inc., Temecula, CA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

35 En un ejemplo no limitante, las células determinadas como apropiadas para un ensayo fenotípico particular (es decir, células MCF-7 seleccionadas para estudios de cáncer de mama; adipocitos para estudios de obesidad) se tratan con un inhibidor diana identificado a partir de los estudios *in vivo* así como con compuestos control a concentraciones óptimas, que se determinan mediante los procedimientos descritos anteriormente. Al final del periodo de tratamiento, las células tratadas y no tratadas se analizan mediante uno o más procedimientos específicos para el ensayo para determinar resultados fenotípicos y criterios de valoración.

Los criterios de valoración fenotípicos incluyen cambios en la morfología celular a lo largo del tiempo o en la dosis del tratamiento así como cambios en los niveles de los componentes celulares, tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas, sacáridos o metales. Las mediciones del estado celular que incluyen pH, estado del ciclo de la célula, captación o excreción de indicadores biológicos por la célula, también son criterios de valoración de interés.

45 La medición de la expresión de uno o más de los genes de la célula después del tratamiento también se usa como un indicador de la eficacia o fuerza de los inhibidores de una diana. Los genes característicos o los genes que se sospecha que están asociados con una patología, afección o fenotipo específico se miden tanto en células tratadas como en células no tratadas.

Estudios in vivo

50 Los sujetos individuales de los estudios *in vivo* descritos en el presente documento son animales vertebrados de sangre caliente que incluyen seres humanos.

Ejemplo 18

Aislamiento de ARN

Aislamiento de ARNm poli(A)+

En algunas realizaciones, el ARNm poli(A)+ se aísla de acuerdo con Miura y col., (Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764). Otros procedimientos para el aislamiento de ARNm poli(A)+ son rutinarios en la materia. Brevemente, para células que se cultivan en placas de 96 pocillos, el medio de cultivo se retira de las células y cada pocillo se lava con PBS frío 200 µl. A cada pocillo se le añaden 60 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, NP-40 0,5%, complejo vanadil-ribonucleósido 20 mM), la placa se agita suavemente y después se incuba a temperatura ambiente durante cinco minutos. Cincuenta y cinco (55) µl de lisado se transfieren a placas de 96 pocillos revestidas con Oligo d(T) (AGCT Inc., Irvine CA). Las placas se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavan 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,3 M). Después del lavado final, las placas se secan sobre toallitas de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado y después se secan al aire durante 5 minutos. A cada pocillo se le añaden 60 µl de tampón de elución (Tris-HCl 5 mM, pH 7,6), previamente calentado a 70 °C, la placa se incuba sobre una placa caliente a 90 °C durante 5 minutos y el eluido se transfiere después a una placa nueva de 96 pocillos.

Las células cultivadas en placas de 10 mm u otro tipo de placas convencionales pueden tratarse de manera similar usando volúmenes apropiados de todas las soluciones.

15 *Aislamiento de ARN total*

El ARN total se aísla usando un kit y tampones RNEASY 96TM proporcionados por Qiagen Inc. (Valencia, CA) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. En resumen, para células cultivadas en placas de 96 pocillos, el medio de cultivo se retira de las células y cada pocillo se lava con PBS frío 200 µl. A cada pocillo se le añade tampón RLT 150 µl y la placa se agita vigorosamente durante 20 segundos. Después, a cada pocillo se le añaden 150 µl de etanol al 70% y el contenido se mezcla pipeteando tres veces hacia arriba y hacia abajo. Después, las muestras se transfieren a la placa de 96 pocillos RNEASY 96TM conectada a un colector QIAVACTM equipado con una bandeja de recogida de residuos y conectada a una fuente de vacío. El vacío se aplica durante 1 minuto. A cada pocillo de la placa RNEASY 96TM se le añaden 500 µl de Tampón RW1 y se incuba durante 15 minutos y se aplica de nuevo vacío durante 1 minuto. A cada pocillo de la placa RNEASY 96TM se le añaden otros 500 µl de Tampón RW1 y se aplica vacío durante 2 minutos. Después, a cada pocillo de la placa RNEASY 96TM se le añade 1 ml de Tampón RPE y se aplica vacío durante un periodo de 90 segundos. Después se repite el lavado con Tampón RPE y se aplica vacío durante 3 minutos más. Después la placa se retira del colector QIAVACTM y se seca sobre toallitas de papel. Después la placa se vuelve a conectar al colector QIAVACTM equipado con una rejilla de tubos de recogida que contiene tubos de recogida de 1,2 ml. A continuación el ARN se eluye pipeteando, en cada pocillo, 140 µl de agua sin ARNs, se incuba durante 1 minuto y después se aplica vacío durante 3 minutos.

El pipeteo repetitivo y la etapas de elución pueden automatizarse usando un Bio-Robot 9604 QIAGEN (Qiagen, Inc., Valencia CA). Básicamente, después del lisado de las células en la placa de cultivo, la placa se transfiere a la plataforma robótica donde se realiza el pipeteo, el tratamiento con DNasa y las etapas de elución.

Ejemplo 19

35 **Análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm diana**

En algunas realizaciones, la cuantificación de los niveles de ARNm diana se realiza por PCR cuantitativa en tiempo real usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISMTM 7600, 7700 ó 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este es un sistema de detección por fluorescencia, no basado en gel, de tubo cerrado, que permite la cuantificación de alto rendimiento de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. A diferencia de la PCR convencional, en la que los productos de amplificación se cuantifican después de finalizar la PCR, en la PCR cuantitativa en tiempo real los productos se cuantifican según se van acumulando. Esto se consigue incluyendo en la reacción PCR una sonda oligonucleotídica que se hibrida específicamente entre los cebadores directos e inversos de la PCR y que contiene dos colorantes fluorescentes. Un colorante indicador (por ejemplo FAM o JOE, obtenido a partir de cualquiera de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) se une al extremo 5' de la sonda y un colorante inactivador (por ejemplo TAMRA, obtenido a partir de cualquiera de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) se une al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y los colorantes están intactos, la emisión del colorante indicador se inactiva por la proximidad del colorante inactivador en el extremo 3'. Durante la amplificación, la hibridación de la sonda con la secuencia diana crea un sustrato que puede escindir la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa. Durante la fase de extensión del ciclo de amplificación de la PCR, la escisión de la sonda por la Taq polimerasa libera el colorante indicador del resto de la sonda (y por lo tanto del resto inactivador) y se genera una secuencia fluorescente específica de secuencia. Con cada ciclo, otras moléculas de colorante indicadoras se escinden de sus sondas respectivas y la intensidad de fluorescencia se controla a intervalos regulares por óptica láser construida en el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISMTM. En cada ensayo, una serie de reacciones paralelas que contienen diluciones en serie de ARNm procedente de muestras de control no tratadas genera una curva patrón que se usa para cuantificar el porcentaje de inhibición después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido de las muestras de ensayo.

Antes del análisis PCR cuantitativo, el conjunto cebador-sonda, específico para el gen diana a medir, se evaluó para

determinar su capacidad de "multiplexarse" con una reacción de amplificación de GAPDH. En el multiplexado, tanto el gen diana como el gen patrón interno de GAPDH se amplifican normalmente en una sola muestra. En este análisis, el ARNm aislado, procedente de células no tratadas, se diluye en serie. Cada dilución se amplifica en presencia de conjuntos cebador-sonda, específicos solo para GAPDH, sólo para el gen diana, ("unplexado") o para ambos (multiplexado). Después de la amplificación por PCR, como una función de la dilución, se generan curvas patrón de GAPDH y de señal de ARNm diana, a partir de las muestras unplexadas y multiplexadas. Si tanto la pendiente como el coeficiente de correlación de GAPDH y las señales diana, generados a partir de las muestras multiplexadas, se encuentran dentro del 10% de sus valores correspondientes generados a partir de las muestras unplexadas, se considera que el conjunto cebador-sonda específico para la diana puede multiplexarse. En la materia también se conocen otros procedimientos de PCR.

Los reactivos RT-PCR se obtienen de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La RT-PCR en tiempo real se realiza añadiendo 20 µl de cóctel PCR (tampón PCR 2,5x sin MgCl₂, MgCl₂ 6,6 mM, 375 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dGTP, 375 nM cada uno de cebador inverso y cebador directo, 125 nM de sonda, 4 Unidades de inhibidor ARNsa, 1,25 Unidades Taq PLATINUM®, 5 Unidades de transcriptasa inversa MuLV y colorante ROX 2,5x) a las placas de 96 pocillos que contienen solución de ARN total 30 µl (20-200 ng). La reacción a temperatura ambiente se realiza por incubación durante 30 minutos a 48 °C. Después de un tiempo de incubación de 10 minutos a 95 °C para activar la Taq PLATINUM®, se realizan 40 ciclos de un protocolo PCR en dos etapas: 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido de 60 °C durante 1,5 minutos (hibridación/extensión).

En algunas realizaciones, las cantidades del gen diana obtenidas por RT-PCR en tiempo real se normalizan usando bien el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante o bien cuantificando el ARN total usando RIBOGREEN™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH se cuantifica por RT-PCR en tiempo real, procesándose de manera simultánea con la diana, formando complejos múltiples o por separado. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGree™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). En Jones, L.J., y col, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374) se instruye sobre los procedimientos de cuantificación de ARN por RIBOGREEN™.

En este ensayo, se pipetea 170 µl de reactivo de trabajo RIBOGREEN™ (reactivo RIBOGREEN™ diluido 1:350 en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) en una placa de 96 pocillos que contiene 30 µl de ARN celular, purificado. La placa se lee en un CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con una excitación a 485 nm y una emisión a 530 nm.

Ejemplo 20

30 Cebadores y sondas específicos de diana

Usando información de secuencias publicada, los cebadores y las sondas pueden diseñarse para hibridarse con una secuencia diana. Por ejemplo, para el PTEN humano, se diseñó el siguiente conjunto cebador-sonda usando información de secuencias publicada (número de registro GENBANK™ U92436.1, SEC ID N° 1).

Cebador directo: AATGGCTAAGTGAAGATGACAATCAT (SEC ID N° 2)
 Cebador inverso: TGCACATATCATTACACCAGTTCGT (SEC ID N° 3)
 Y la sonda PCR: FAM-TTGCAGCAATTCAGTAAAGCTGGAAAGG-TAMRA (SEC ID N° 4), en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA el colorante inactivador.

Ejemplo 21

Análisis por transferencia de Western de niveles de proteína diana

Se realizaron análisis por transferencia de Western (análisis de inmunotransferencia) de manera rutinaria usando procedimientos convencionales. Después de 16-20 horas de tratamiento con oligonucleótidos las células se recogieron, se lavaron una vez con PBS, se suspendieron en tampón Laemmli (100 µl/pocillo), se sometieron a ebullición durante 5 minutos y se cargaron sobre un gel SDS-PAGE al 16%. Los geles se procesaron durante 1,5 horas a 150 V y se transfirieron a una membrana para realizar la transferencia de Western. Se usó anticuerpo primario apropiado dirigido contra una diana, dirigiéndose un anticuerpo secundario radiomarcado o marcado con fluorescencia contra la especie del anticuerpo primario. Las bandas se visualizaron usando PHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA).

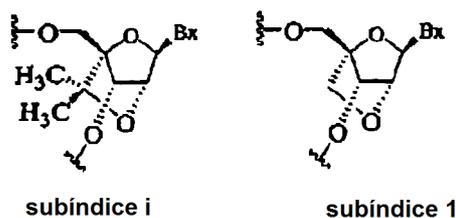
Ejemplo 22

Efectos de compuestos antisentido dirigidos a PTEN en estudios *in vivo*

5 Ratonos Balb/c macho de seis semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) recibieron una vez, mediante inyección, oligómeros modificados dirigidos a PTEN a dosis de 3,2, 10, 32 y 100 mg/kg. Los ratones se sacrificaron 64 horas después de la administración final. Los tejidos hepáticos se homogeneizaron y se cuantificaron los niveles de ARNm de PTEN usando PCR en tiempo real y reactivo de cuantificación RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con protocolos convencionales. Se determinaron los niveles de ARNm de PTEN con respecto al ARN total (usando Ribogreen), antes de la normalización frente a un control tratado con solución salina. A continuación se muestran las actividades relativas de los compuestos antisentido presentándose los resultados como la media del % de inhibición de la expresión de ARNm de cada compuesto antisentido, normalizada frente a un control tratado por inyección con solución salina.

SEC ID Nº/ ISIS Nº	Secuencia	% de inhibición de PTEN			
		(dosis mg/kg)			
		3,2	10	32	100
05/425453	C _i U _i TAGCACTGGCC _i U _i	7	20	64	93
06/392063	^{Me} C ₁ T ₁ TAGCACTGGC ^{Me} C ₁ T ₁	8	71	93	93

Cada grupo de enlace internucleósido es un fosforotioato, cada nucleósido no anotado de otra manera es un 2'-desoxirribonucleósido, cada ^{Me}C es 5-CH₃ C y los nucleósidos seguidos por un subíndice i o 1 se definen de la siguiente manera:



15

En los ratones tratados con los oligómeros antisentido 394425, 411001 y 425453, se midieron los niveles de ALT y AST. El Centro LabCorp Testing (San Diego, CA) analizó el suero y los niveles séricos de ALT y AST se midieron con respecto a los ratones a los que se inyectó solución salina. Los niveles de ALT y AST aproximados se indican en la siguiente tabla.

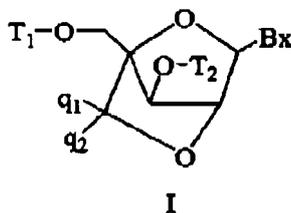
SEC ID Nº/ ISIS Nº	Dosis (mg/kg)	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	DE ₅₀	Tm °C
05/425453	no disponible			20,8	56,3
	3,2	26	49		
	10	28	52		
	32	23	51		
	100	22,5	55,5		
06/392063	no disponible			7,0	60,5
	3,2	9,5	56,75		
	10	12,5	86,25		
	32	9,75	81		
	100	18670,8	27398,5		
Solución salina		14	60,5		

Aunque la anterior memoria descriptiva de la presente invención se ha descrito con respecto a algunas de sus realizaciones preferidas y se han expuesto diversos detalles con fines ilustrativos, para los expertos en la materia será evidente que la presente invención sea susceptible a realizaciones adicionales y que algunos de los detalles descritos en el presente documento puedan variarse considerablemente sin alejarse de los principios básicos de la presente invención.

5

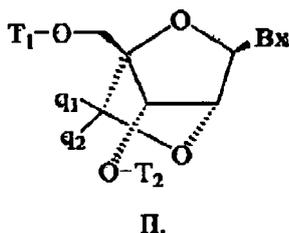
REIVINDICACIONES

1. Un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula I:



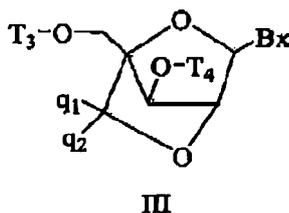
en la que:

- 5 Bx es un resto de base heterocíclica;
 uno de T₁ y T₂ es H o un grupo protector hidroxilo y el otro de T₁ y T₂ es H, un grupo protector hidroxilo o un grupo reactivo de fósforo;
 cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₁-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂;
 o q₁ y q₂ juntos son =C(q₃)(q₄);
 cada uno de q₃ y q₄ es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido; cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂; y
 cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector,
 en el que el grupo reactivo de fósforo es fosoramidita, H-fosfonato, triéster fosfato o un auxiliar quiral que contiene fósforo.
- 10
- 15
- 20
2. El nucleósido bicíclico de la reivindicación 1, en el que cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido.
3. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que cada uno de q₁ y q₂ es metilo.
4. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que al menos uno de q₁ y q₂ es un alquilo C₁-C₆ sustituido que comprende al menos un grupo sustituyente seleccionado entre OJ₁, NJ₁J₂ o CN, en el que cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆ o un grupo protector.
- 25
5. El nucleósido bicíclico de la reivindicación 1, en el que q₁ y q₂ juntos, son =C(q₃)(q₄).
6. El nucleósido bicíclico de la reivindicación 5, en el que cada uno de q₃ y q₄ es H.
7. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que T₁ es 4,4'-dimetoxitritilo y T₂ es diisopropilcianoetoxi fosoramidita.
- 30
8. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que Bx es uracilo, 5-propinil-uracilo, 5-tiazolo-uracilo, timina, citosina, 5-metilcitosina, 5-propinil-citosina, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina, 2,6-diaminopurina u otra pirimidina, pirimidina sustituida, purina o purina sustituida.
9. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que tiene la Fórmula II:



35

10. Un compuesto oligomérico que comprende al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III:



en el que independientemente para cada uno de dicho al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III;

Bx es un resto de base heterocíclica;

cada uno de T₃ y T₄ es, independientemente, un grupo de unión de internucleósidos que une el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III al compuesto oligomérico o uno de T₃ y T₄ es un grupo de unión de internucleósidos que une el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III al compuesto oligomérico y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo terminal 5' ó 3';

cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂;

o q₁ y q₂ juntos son =C(q₃)(q₄);

cada uno de q₃ y q₄ es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido; cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂; y

cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector; y

en el que dicho compuesto oligomérico comprende de 8 a aproximadamente 40 nucleósidos unidos,

y en el que la expresión "compuesto oligomérico" se refiere un polímero que tiene al menos una región que es capaz de hibridar para dar una molécula de ácido nucleico.

11. El compuesto oligomérico de la reivindicación 10 en el que, independientemente para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, cada uno de q₁ y q₂ es, independientemente, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido.

12. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11 en el que, independientemente para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, cada uno de q₁ y q₂ es metilo para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III.

13. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11 en el que, independientemente, para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III, al menos uno de q₁ y q₂ es un alquilo C₁-C₆ sustituido que comprende al menos un grupo sustituyente seleccionado entre OJ₁, NJ₁J₂ o CN, en el que cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆ o un grupo protector.

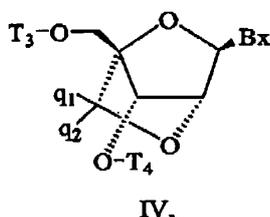
14. El compuesto oligomérico de la reivindicación 10, en el que, q₁ y q₂ juntos, son =C(q₃)(q₄) para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III.

15. El compuesto oligomérico de la reivindicación 14, en el que cada uno de q₃ y q₄ es H.

16. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 que comprende al menos un grupo 3' ó 5' terminal.

17. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16 en el que cada grupo de enlace internucleósido es, independientemente, un fosforodiéster o fosforotioato.

18. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17 en el que cada nucleósido bicíclico tiene la Fórmula IV:



19. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18 que comprende al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tiene dicha fórmula localizada en el extremo 3' o en el extremo 5' del compuesto oligomérico.
- 5 20. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18 que comprende un compuesto oligomérico abierto que tiene al menos dos regiones, comprendiendo cada región que tiene dicha fórmula, de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos, en el que una de dichas regiones de nucleósidos bicíclicos que tiene dicha fórmula se localiza externamente en el extremo 5' y la otra de dichas regiones se localiza externamente en el extremo 3' y en el que las dos regiones externas están separadas por una región interna que comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas.
- 10 21. El compuesto oligomérico de la reivindicación 20 en el que esencialmente cada subunidad monomérica en la región interna es un β -D-2'-desoxirribonucleósido.
22. Un procedimiento de inhibición *in vitro* de la expresión de genes que comprende poner en contacto una o más células o un tejido con un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21.
- 15 23. Un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21 para su uso en un procedimiento de inhibición *in vitro* de la expresión de genes, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21.
24. Un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21 para su uso en terapia médica.