

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 492**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00

(2006.01)

C07H 19/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08780773 .1**

96 Fecha de presentación: **06.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2173760**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **Análogos de ácidos nucleicos bicíclicos carbocíclicos**

30 Prioridad:
08.06.2007 US 942824 P
05.07.2007 US 948024 P
09.10.2007 US 978671 P

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.08.2012

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

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.08.2012

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 386 492 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 ácidos nucleicos bicíclicos carbocíclicos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las siguientes Solicitudes de Patente Provisional de los Estados Unidos de América: N° 60/942.824, presentada el 8 de Junio de 2007, con el título, "Análogos de Ácidos Nucleicos Bicíclicos Carbocíclicos"; N° 60/978.671, presentada el 9 de Octubre de 2007, con el título, "Análogos de Ácidos Nucleicos Bicíclicos Carbocíclicos"; y 60/948.024, presentada el 5 de Julio de 2007, con el título, "Análogos de Ácidos Nucleicos Bicíclicos Carbocíclicos Insaturados".

Lista de secuencias

- 10 La presente solicitud se ha presentando junto con un Listado de Secuencias en formato electrónico. La Lista de Secuencias se proporciona como un archivo titulado CHEM0038WOSEQ.txt, que se creó el 6 de Junio de 2008 y que tiene un tamaño de 5,11 Kb. La información en formato electrónico de la lista de secuencias se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

Campo de la invención

- 15 En el presente documento se proporcionan nucleósidos bicíclicos carbocíclicos, compuestos oligoméricos preparados a partir de los mismos y procedimientos de uso de estos compuestos oligoméricos. Los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos saturados e insaturados son útiles para mejorar las propiedades de los compuestos oligoméricos que incluyen la resistencia a la nucleasa. En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos y las composiciones hibridan con una porción de ARN diana dando como resultado una pérdida de la función normal del ARN diana.
- 20

Antecedentes la invención

- La tecnología antisentido es un medio eficaz para reducir la expresión de uno o más productos genéticos específicos y por lo tanto únicamente puede resultar útil en un número de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. Los nucleósidos modificados químicamente se usan de manera rutinaria para su incorporación en las
- 25 secuencias antisentido para mejorar una o más propiedades tal como, por ejemplo, la resistencia a las nucleasas. Uno de tales grupos de modificaciones químicas incluye los nucleósidos bicíclicos en los que la porción de furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos del anillo de furanosa formando de este modo un sistema de anillo bicíclico. Tales nucleósidos bicíclicos tienen diversos nombres que incluyen BNA y LNA para los ácidos nucleicos bicíclicos o para los ácidos nucleicos bloqueados respectivamente.
- 30 Se han preparado y presentado diversos BNA en la bibliografía de patentes así como en la bibliografía científica, véase por ejemplo: Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y col., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahl-estedt 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 de patente Internacional PCT WO 98-DK393 19980914; Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; se incorpora el texto de cada una por referencia, en su totalidad, en el presente documento. Ejemplos de patentes de los Estados Unidos de América expedidas y de solicitudes publicadas
- 35 incluyen por ejemplo: Patentes de los Estados Unidos de América N°s 7.053.207, 6.770.748, 6.268.490 y 6.794.499 y solicitudes de los Estados Unidos de América publicadas 20040219565, 20040014959, 20030207841, 20040192918, 20030224377, 20040143114 y 20030082807; se incorpora el texto de cada una por referencia, en su totalidad, en el presente documento.
- 40 Muchos LNA son tóxicos. Véase, por ejemplo, Swayze, E. E.; Siwkowski, A. M.; Wancewicz, E. V.; Migawa, M. T.; Wyrzykie-wicz, T. K.; Hung, G.; Monia, B. P.; Bennett, C. F. Los oligonucleótidos antisentido que contienen ácidos nucleicos bloqueados mejoran la potencia pero producen una hepatotoxicidad significativa en los animales. Nucl. Acids Res., doi: 10.1093/nar/gk11071 (Diciembre de 2006, publicación online avanzada).
- Se ha presentado previamente un BNA carbocíclico (Frier y col., Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4429-4443) que tiene un puente 4'-(CH₂)₃-2'. Esta modificación se presentó para disminuir la temperatura aproximadamente 2,5
- 45 °C por modificación en un oligómero poli T que tiene un nucleósido BNA T en lugar de uno o más nucleósidos T cuando hibridan con ARN complementario. Este mismo BNA que tiene un puente 4'-(CH₂)₃-2', como se ha presentado por Frier y col., o también se ha presentado el puente análogo alqueno 4'-CH=CH-CH₂-2' para tener una estabilidad una mayor una temperatura, aumentada de aproximadamente 2,5 a 5,0 °C por modificación (véase
- 50 Albaek y col., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740).

Los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos y los oligonucleótidos preparados a partir de los mismos, se han presentado recientemente por Srivastava y col., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379, publicado on line el 7 Junio de 2007.

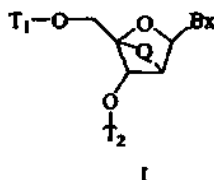
Sigue existiendo la necesidad, desde hace mucho tiempo, de agentes que regulen específicamente la expresión genética mediante los mecanismos antisentido. En el presente documento se desvelan los BNA carbocíclicos y los compuestos antisentido, preparados a partir de los mismos, útiles para la modulación de las secuencias de la expresión genética, que incluyen aquellos que dependen de los mecanismos de acción tales como las enzimas ARNasaH, ARNi y ARNds, así como otros mecanismos antisentido basados en la degradación de la diana o en la ocupación de la diana. Alguien con experiencia en la materia, una vez preparado con la presente divulgación, sin experimentación excesiva, será capaz de identificar, preparar y aprovechar los compuestos antisentido para estos usos.

Breve resumen de la invención

- 10 Se proporcionan en el presente documento nucleósidos bicíclicos, compuestos oligoméricos que comprenden los nucleósidos bicíclicos y los procedimientos de uso de los compuestos oligoméricos. En determinadas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos transmiten unas propiedades mejoradas a los compuestos oligoméricos a los que se incorporan.

- 15 Las variables se definen individualmente con más detalle en el presente documento. Se debe entender que los nucleósidos bicíclicos, los compuestos oligoméricos y los procedimientos de uso de los mismos proporcionados en el presente documento incluyen todas las combinaciones de las realizaciones desveladas y de las variables definidas en el presente documento.

En determinadas realizaciones, aquí se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I:



- 20 en la que:

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

uno de T₁ y T₂ es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro de T₁ y T₂ es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo;

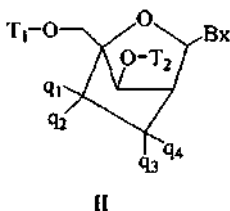
Q es C(q₁)=C(q₃), C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)];

- 25 q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₁-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;

- 30 en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con los grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, 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 C₁-C₆, alquinilo C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector; y el grupo fósforo reactivo es fosforamidita, H-fosfonato, triéster de fosfato o un grupo auxiliar quiral que contiene fósforo.

- 35 En determinadas realizaciones también desveladas en el presente documento, los nucleósidos bicíclicos tienen la Fórmula II:



en la que:

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

uno de T₁ y T₂ es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro de T₁ y T₂ es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo;

40 cada grupo q₁, q₂, q₃ y q₄ es, independientemente, H, 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;

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con los grupos 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;

- 5 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 la que cuando uno de q₃ o q₄ es CH₃ entonces al menos un grupo del otro de q₃ o q₄ o uno de q₁ y q₂ es distinto de H.

- 10 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que los grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H. En determinadas realizaciones, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H y el otro q₁, q₂, q₃ y q₄ es distinto de H. En determinadas realizaciones, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H y el otro q₁, q₂, q₃ y q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H y el otro q₁, q₂, q₃ y q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆. En determinadas realizaciones, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H y el otro q₁, q₂, q₃ y q₄ es CH₃ o F.

- 15 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H y los otros dos grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno distinto de H. En determinadas realizaciones, dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H y los otros dos grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos con la Fórmula II en la que dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆. En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H y los otros dos grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, CH₃ o F.

- 25 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que un grupo q₁ y q₂ es H y un grupo q₃ y q₄ es H o tanto q₁ como q₂ son H o tanto q₃ como q₄ son H y los otros dos grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H. En determinadas realizaciones, un grupo q₁ y q₂ es H y un grupo q₃ y q₄ es H o tanto q₁ como q₂ son H o tanto q₃ como q₄ son H y los otros dos grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H y son distintos entre ellos.
- 30 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que un grupo q₁ y q₂ es H, un grupo q₃ y q₄ es H y los otros dos grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, alquilo C₁-C₆ o F. En determinadas realizaciones, uno de q₁ y q₂ es H, uno de q₃ y q₄ es H y los otros dos grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, un grupo protector de hidroxilo.

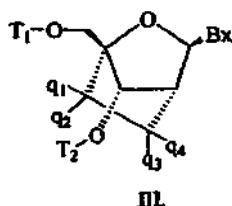
- 35 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que cada uno de protectores de hidroxilo, se selecciona independientemente entre acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropirano, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 2-trimetilsililetilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, benzoilo, p-fenil-benzoilo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, triisopropilsililo, formiato de benzoilo, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloilo, carbonato de 9-fluorenil-metilo, mesilato, tosilato, triflato, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo y pixilo sustituido.

- 40 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que T₁ es acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo o dimetoxitritilo. En determinadas realizaciones, T₁ es 4,4'-dimetoxitritilo. En determinadas realizaciones, T₂ es un grupo fósforo reactivo. En determinadas realizaciones, el grupo fósforo reactivo es diisopropilcianoetoxi fosforamidita o H-fosfonato. En determinadas realizaciones, T₁ es 4,4'-dimetoxitritilo y T₂ es diisopropilcianoetoxi fosforamidita.

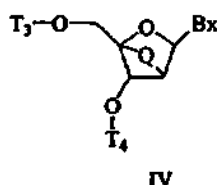
- 45 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que el grupo Bx es una pirimidina, pirimidina sustituida, purina o purina sustituida. En determinadas realizaciones, el grupo Bx es uracilo, 5-metiluracilo, 5-propinil-uracilo, 5-tiazolo-uracilo, timina, citosina, 5-metilcitosina, 5-propinil-citosina, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina o 2,6-diaminopurina.

- 50 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II en la que cada grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₃.

En determinadas realizaciones también desveladas en el presente documento, los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II se proporcionan adicionalmente con la configuración de Fórmula III:



En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV:



5 en la que independientemente, al menos para cada uno de dicho nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV:

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleósido que enlaza el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV con el compuesto oligomérico o uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleósido que enlaza el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV con el compuesto oligomérico y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo 5' o 3' terminal;

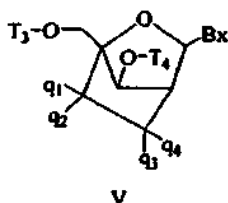
Q es C(q₁)=C(q₃), C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)];

q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H, 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;

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con los grupos 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

20 cada grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₁-C₆, alquino C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector; y el término "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero que tiene al menos una región que es susceptible de hibridar con una molécula de ácido nucleico.

En determinadas realizaciones desveladas también en el presente documento, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V:



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

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleósido que enlaza el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V con el compuesto oligomérico o uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleósido que enlaza el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V con el compuesto oligomérico y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo 5' o 3' terminal;

30 cada grupo q₁, q₂, q₃ y q₄ es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₁-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;

35 en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos 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;

cada grupo 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; y
 en la que cuando uno de q_3 o q_4 es CH_3 entonces al menos un grupo del otro q_3 o q_4 o un grupo del grupo q_1 y q_2 es distinto de H.

- 5 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V en la que cada uno de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es H. En determinadas realizaciones, tres de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno H y el otro de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es H. En determinadas realizaciones, tres de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno H y el otro de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 o CN. En determinadas realizaciones, tres de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno H y el otro de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es halógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxi C_1-C_6 . En determinadas realizaciones, tres de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno H y el otro de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es CH_3 o F.

- 15 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V en la que dos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno H y los otros dos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 o CN. En determinadas realizaciones, dos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno H y los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido o OJ_1 . En determinadas realizaciones, dos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno H y los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxi C_1-C_6 . En determinadas realizaciones, dos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno H y los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, CH_3 o F.

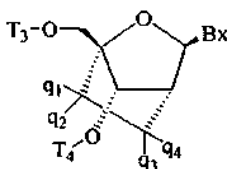
- 25 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V en la que uno de q_1 y q_2 es H y uno de q_3 y q_4 es H o tanto q_1 como q_2 son H o tanto q_3 como q_4 son H y los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son distintos de H. En determinadas realizaciones, uno de q_1 y q_2 es H y uno de q_3 y q_4 es H o tanto q_1 como q_2 son H o tanto q_3 como q_4 son H y los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son distintos de H y son diferentes los unos de los otros.

- En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V en la que uno de q_1 y q_2 y uno de q_3 y q_4 es H y los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, alquilo C_1-C_6 o F.

- 30 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V en la que un grupo T_3 es H o un grupo protector de hidroxilo. En determinadas realizaciones, al menos un grupo T_3 es un grupo de enlace internucleósido. En determinadas realizaciones, un grupo T_4 es H o un grupo protector de hidroxilo. En determinadas realizaciones, al menos un grupo T_4 es un grupo de enlace internucleósido. En determinadas realizaciones, al menos uno de T_3 y T_4 es un grupo 3' o 5' terminal.

- 35 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V en la que cada grupo de enlace internucleósido es, independientemente, un fosfodiéster o fosforotioato. En determinadas realizaciones, cada grupo de enlace internucleósido es un fosforotioato.

- 40 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V en la que cada nucleósido bicíclico de Fórmula V tiene adicionalmente la configuración de Fórmula VI:



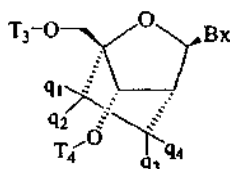
VI.

- 45 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V que comprenden al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula V. En determinadas realizaciones, al menos una de las regiones de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula V se localiza en la parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico. En determinadas realizaciones, al menos una de las regiones de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula V se sitúa en la parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico y al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V se sitúa en la otra parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico.

- 50 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden un motivo hueco que

tiene una región interna de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades de monómero que separan dos regiones externas que comprenden independientemente de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula V. En determinadas realizaciones, cada subunidad de monómero en la región interna es esencialmente un β -D-2'-desoxiribonucleósido. En determinadas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 14 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente de 2 a aproximadamente 3 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula V. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula V y la región interna comprende 10 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente de 2 a aproximadamente 3 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula V y la región interna comprende 14 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula V y la región interna comprende 14 β -D-2'-desoxiribonucleósidos.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden un motivo hueco que tiene una región interna de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades de monómero que separan dos regiones externas que comprenden independientemente de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula V en la que cada nucleósido bicíclico de Fórmula V tiene la configuración de Fórmula VI:

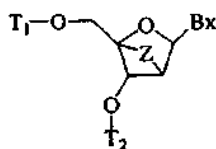


VI.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V que comprende una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 subunidades de monómero. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V que comprende una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 subunidades de monómero. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V que comprende una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 subunidades de monómero. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V que comprende una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 subunidades de monómero.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los procedimientos para reducir el ARN mensajero diana que comprenden el contacto de una o mas células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico que comprende al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII:



VII

en la que:

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

uno de de T_1 y T_2 es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro de T_1 y T_2 es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo;

Z es $C(q_1)=C(q_3)$, $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$;

q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, H, 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 $N(H)(=S)NJ_1J_2$;

en la que cada grupo sustituido, independientemente, está mono o poli sustituido con grupos 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 grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector.

- 5 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que Z es C(q₁)=C(q₃). En determinadas realizaciones, Z es C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄). En determinadas realizaciones, Z es C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃Xq₄)].

En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H.

- 10 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que Z es C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)] y tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son H y y el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es distinto de H. En determinadas realizaciones, el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆. En determinadas realizaciones, el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es flúor o metilo.

- 15 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que Z es C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)] y dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son independientemente, flúor o metilo. En determinadas realizaciones, los grupos q₁ y q₂ son cada uno H. En determinadas realizaciones, los grupos q₃ y q₄ son cada uno H. En determinadas realizaciones, uno de q₁ y q₂ es H y uno de q₃ y q₄ es H.

- 25 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que solamente uno de q₁, q₂, q₃ y q₄ es H. En determinadas realizaciones, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, halógeno, OJ₁, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, halógeno, hidroxilo, alquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆. En determinadas realizaciones, los otros tres grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, flúor o metilo.

- 30 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que Z es C(q₁)=C(q₃) y uno de q₁ y q₃ es H y el otro de q₁ y q₃ es distinto de H. En determinadas realizaciones, el otro de q₁ y q₃ es halógeno, OJ₁, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₅ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, el otro de q₁ y q₃ es halógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆. En determinadas realizaciones, el otro de q₁ y q₃ es flúor o metilo.

- 35 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que Z es C(q₁)=C(q₃) y tanto q₁ como q₃ son distintos de H. En determinadas realizaciones, los grupos q₁ y q₃ son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, los grupos q₁ y q₃ son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₂ o alcoxi C₁-C₆. En determinadas realizaciones, los grupos q₁ y q₃ son cada uno, independientemente, flúor o metilo.

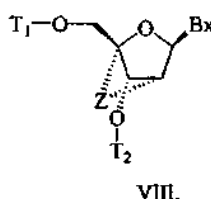
- 40 En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que T₁ y T₂ son cada uno, independientemente, un grupo protector de hidroxilo. En determinadas realizaciones, cada uno de protectores de hidroxilo se selecciona, independientemente, entre acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropirano, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 2-trimetilsilietilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, benzoílo, p-fenilbenzoílo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, triisopropilsililo, benzoilformiato, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloílo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, triflato, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo y pixilo sustituido.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que T_1 es acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo o 4,4'-dimetoxitritilo. En determinadas realizaciones, T_2 es un grupo fósforo reactivo. En determinadas realizaciones, T_2 es diisopropilcianoetoxi fosforamidita o H-fosfonato. En determinadas realizaciones, T_2 es diisopropilcianoetoxi fosforamidita. En determinadas realizaciones, T_2 es diisopropilcianoetoxi fosforamidita y T_1 es 4,4'-dimetoxitritilo.

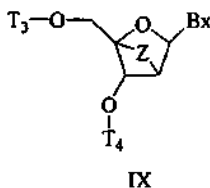
En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que el grupo Bx es una pirimidina, pirimidina sustituida, purina o purina sustituida. En determinadas realizaciones, el grupo Bx es uracilo, 5-metiluracilo, 5-propinil-uracilo, 5-tiazolo-uracilo, timina, citosina, 5-metilcitosina, 5-propinil-citosina, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina o 2,6-diaminopurina.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que cada grupo J_1 y J_2 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_3 .

En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VII en la que cada nucleósido bicíclico de Fórmula VII tiene adicionalmente la configuración de Fórmula VIII:



En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX:



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

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

T_3 y T_4 son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleósido que enlaza al nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX con el compuesto oligomérico o uno de T_3 y T_4 es un grupo de enlace internucleósido que enlaza al nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX con el compuesto oligomérico y el otro de T_3 y T_4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo 5' o 3' terminal;

Z es $C(q_1)=C(q_3)$, $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$;

q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, H, 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 $N(H)C(=S)NJ_1J_2$;

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos 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 grupo 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.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX en la que Z es $C(q_1)=C(q_3)$. En determinadas realizaciones se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX en la que Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX en la que Z es $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX en la que cada uno de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es H.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX en la que Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$ y tres de

q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son H y el otro de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es distinto de H. En determinadas realizaciones, el otro de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 o CN. En determinadas realizaciones, el otro de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es halógeno alquilo C_1-C_{12} o alcoxi C_1-C_6 . En determinadas realizaciones, el otro de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es flúor o metilo.

- 5 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX en la que Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$, dos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son H y los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son distintos de H. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 o CN. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alcoxi C_1-C_6 . En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, flúor o metilo.

- 15 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX en la que Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$, q_1 y q_2 son cada uno H y q_3 y q_4 son distintos de H. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos en los que Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$, q_3 y q_4 son cada uno H y q_1 y q_2 son distintos de H. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos en los que Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$, uno de q_1 y q_2 es H, uno de q_3 y q_4 es H y los otros grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son distintos de H.

- 20 En determinadas realizaciones se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XI en la que uno de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es H y los otros tres grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son distintos de H. En determinadas realizaciones, los otros tres grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 o CN. En determinadas realizaciones, los otros tres grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, halógeno, hidroxilo, alquilo C_1-C_6 o alcoxi C_1-C_6 . En determinadas realizaciones, los otros tres grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, flúor o metilo.

- 25 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XI en la que Z es $C(q_1)=C(q_3)$ y uno de q_1 y q_3 es H y el otro de q_1 y q_3 es distinto de H. En determinadas realizaciones, el otro q_1 y q_3 es halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 o CN. En determinadas realizaciones, el otro de q_1 y q_3 es halógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxi C_1-C_6 . En determinadas realizaciones, el otro de q_1 y q_3 es flúor o metilo.

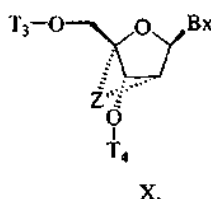
- 30 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XI en la que Z es $C(q_1)=C(q_3)$ y tanto q_1 como q_3 son distintos de H. En determinadas realizaciones, los grupos q_1 y q_3 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 o CN. En determinadas realizaciones, los grupos q_1 y q_3 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxi C_1-C_{12} .

- 35 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XI en la que un grupo T_3 es H o un grupo protector de hidroxilo. En determinadas realizaciones, al menos un grupo T_3 es un grupo de enlace internucleósido. En determinadas realizaciones, un grupo T_4 es H o un grupo protector de hidroxilo.

- 40 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XI en la que al menos un grupo T_4 es un grupo de enlace internucleósido. En determinadas realizaciones, al menos uno de T_3 y T_4 es un grupo 3' o 5' terminal.

- 45 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XI en la que cada grupo de enlace internucleósido es, independientemente, un fosfodiéster o fosforotioato. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XI en la que cada grupo de enlace internucleósido es un fosforotioato.

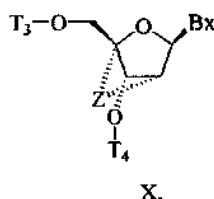
- 50 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX en la que cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX tiene adicionalmente la configuración de Fórmula X:



En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos una región con al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula IX. En determinadas realizaciones, la región con al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula IX se sitúa en la parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico.

- 5 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden un motivo hueco que tiene una región interna de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades de monómero que separan dos regiones externas que comprenden independientemente de 1 a aproximadamente nucleósido, nucleósidos bicíclicos contiguos del Compuesto 5 que tienen la Fórmula IX. En determinadas realizaciones, cada subunidad de monómero en la región interna es esencialmente un β -D-2'-desoxiribonucleósido. En determinadas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 14 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente de 2 a aproximadamente 3 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IX. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IX. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IX y la región interna comprende 10 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente de 2 a aproximadamente 3 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IX y la región interna comprende 14 β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, cada región externa comprende independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IX y la región interna comprende 14 β -D-2'-desoxiribonucleósidos.

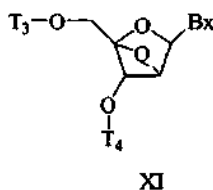
En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden un motivo hueco que tienen una región interna de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades de monómero que separan dos regiones externas que comprenden independientemente de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos en el que cada nucleósido bicíclico tiene la Fórmula X:



- En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula IX con una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 subunidades de monómero. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula IX con una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 subunidades de monómero. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula IX con una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 subunidades de monómero. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula IX con una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 subunidades de monómero.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los procedimientos de reducción del ARN mensajero diana que comprenden el contacto de una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico que comprende al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX.

- En determinadas realizaciones, se proporcionan los procedimientos que comprenden el contacto de una célula con un compuesto oligomérico y dicho compuesto oligomérico comprende al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula XI:



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

- Bx es un resto alcalino heterocíclico;
T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleósido que enlaza al nucleósido

bicíclico que tiene la Fórmula XI con el compuesto oligomérico o uno de T_3 y T_4 es un grupo de enlace internucleósido que enlaza al nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XI con el compuesto oligomérico y el otro T_3 y T_4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo 5' o 3' terminal;

Q es $C(q_1)=C(q_3)$, $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C[=C(q_3)(q_4)]$;

q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, H, 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 $N(H)C(=S)NJ_1J_2$;

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con los grupos 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 grupo 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.

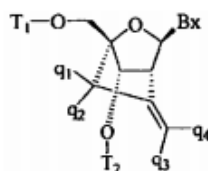
En determinadas realizaciones, se proporcionan los procedimientos que comprenden el contacto de una célula con un compuesto oligomérico que tiene al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula XI en la que la célula está en un animal. En determinadas realizaciones, la célula está en un humano.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los procedimientos que comprenden el contacto de una célula con un compuesto oligomérico que tiene al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula XI en la que el ARN diana se selecciona entre ARNm, ARNm previo y micro ARN. En determinadas realizaciones, el ARN diana es ARNm. En determinadas realizaciones, el ARN diana es ARNm humano.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los procedimientos que comprenden el contacto de una célula con un compuesto oligomérico que tiene al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula XI en la que el ARN diana se escinde de ese modo inhibiendo su función.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los procedimientos que comprenden el contacto de una célula con un compuesto oligomérico que tiene al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula XI que comprende la evaluación de la actividad antisentido del compuesto oligomérico en dicha célula. En determinadas realizaciones, la evaluación comprende la detección de los niveles de ARN diana. En determinadas realizaciones, la evaluación comprende la detección de los niveles de una proteína. En determinadas realizaciones, la evaluación comprende la detección de uno o más efectos fenotípicos.

En determinadas realizaciones, se proporciona el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula XII:



XII

en la que:

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

uno de T_1 y T_2 es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro de T_1 y T_2 es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo;

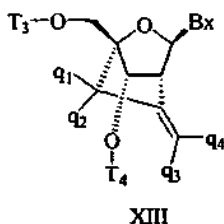
q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_1-C_{12} sustituido, alquino C_2-C_{12} , alquino C_2-C_{12} sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , SOJ_1 , SO_2J_1 , NJ_1J_2 , N_3 , CN, $C(=O)OJ_1$, $C(=O)NJ_1J_2$, $C(=O)J_1$, $O-C(=O)NJ_1J_2$, $C(=O)J_1$, $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=NH)NJ_1J_2$, $N(H)C(=O)-NJ_1J_2$ o $N(H)C(=S)NJ_1J_2$;

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con los grupos 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, $C(=O)OJ_1$, $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=O)-NJ_1J_2$ o $N(H)C(=S)NJ_1J_2$; y

cada grupo 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.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula XII en la que cada uno de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es H.

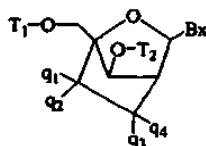
En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos nucleósido bicíclico en el que al menos cada uno de dicho nucleósido bicíclico tiene la Fórmula XIII:



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

- 5 Bx es un resto alcalino heterocíclico;
 T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleósido que enlaza al nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX con el compuesto oligomérico o uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleósido que enlaza al nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IX con el compuesto oligomérico y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido a un grupo 5' o 3' terminal;
- 10 q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, C₂-C₁₂ alquino, 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;
- 15 en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con los grupos 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 grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector.
- 20 En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula XIII en la que cada grupo q₁, q₂, q₃ y q₄ de cada uno de dichos al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula XIII es H.

En determinadas realizaciones también desveladas en el presente documento, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos que tienen la fórmula:



- 25 en la que:
- Bx es un resto alcalino heterocíclico;
 uno de T₁ y T₂ es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro T₁ y T₂ es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo reactivo fósforo;
- 30 cada grupo q₁, q₂, q₃ y q₄ es, independientemente, H, 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;
- 35 en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con los grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆, alquino C₁-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;
- 40 cada grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆, alquino C₂-C₆ sustituido, aminoalquilo C₁-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ sustituido o un grupo protector; y
 en la que cuando uno de q₃ o q₄ es CH₃ entonces al menos un grupo del otro q₃ o q₄ o uno de q₁ y q₂ es distinto de H.

- En una realización, cada uno de q₁, q₂, q₃ y q₄ es, independientemente, H. En determinadas realizaciones, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, H y el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es distinto de H. En una realización adicional, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, H y el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆

sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En una realización adicional, el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es F.

- 5 En una realización, dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En una realización adicional, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, OJ₁, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido. En una realización adicional, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, F.

10 En una realización, uno de q₁ y q₂ es H y uno de q₃ y q₄ es H o tanto q₁ como q₂ son H o tanto q₃ como q₄ son H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H y son diferentes entre ellos. En una realización adicional, uno de q₁ y q₂ y uno de q₃ y q₄ es H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, alquilo C₁-C₆.

- 15 En una realización, T₁ y T₂ son cada uno, independientemente, un grupo protector de hidroxilo en el que los grupos protectores hidroxilo preferentes incluyen, 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, trifenilmetil (trilito), 4,4'-dimetoxitritilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, triisopropilsililo, benzoilformiato, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloilo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, triflato, trilito, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo, 9-fenilxantin-9-ilo (Pixil) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX).

En una realización, T₁ es acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butiidifenilsililo o dimetoxitritilo. En determinadas realizaciones, T₁ es 4,4'-dimetoxitritilo.

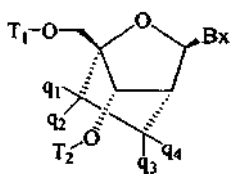
- 25 En una realización, T₂ es un grupo fósforo reactivo en el que los grupos fósforo reactivo preferentes incluyen diisopropilcianoetoxi fosforamidita y H-fosfonato.

En determinadas realizaciones, T₁ es 4,4'-dimetoxitritilo y T₂ es diisopropilcianoetoxi fosforamidita.

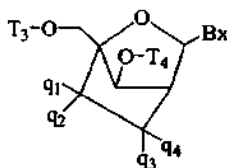
En una realización, el grupo Bx es pirimidina, pirimidina sustituida, purina o purina sustituida. En determinadas realizaciones, el grupo Bx es uracilo, 5-metiluracilo, 5-metilcitosina, 5-tiazolo-uracilo, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina o 2,6-diaminopurina.

- 30 En una realización, cada grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₃.

También se proporcionan en el presente documento los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos que tienen la fórmula que se ha mostrado anteriormente y que tienen adicionalmente la configuración que se muestra en la fórmula siguiente:



Los compuestos también proporcionados en el presente documento son compuestos oligoméricos que comprenden un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula:



en la que:

- 5 Bx es un resto alcalino heterocíclico;
 T₃ es hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido, un grupo conjugado unido o un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad de monómero o un compuesto oligomérico;
 T₄ es hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido, un grupo conjugado unido o un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad de monómero o un compuesto oligomérico;
 10 en la que al menos uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad de monómero o un compuesto oligomérico;
 15 cada grupo q₁, q₂, q₃ y q₄ es, independientemente, H, 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;
 en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con los grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆, alquino 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;
 cada grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆, alquino C₂-C₆ sustituido, aminoalquilo C₁-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ sustituido o un grupo protector; y
 25 en la que cuando uno de q₃ o q₄ es CH₃ entonces al menos un grupo del otro q₃ o q₄ o uno del grupo q₁ y q₂ es distinto de H.

- En una realización, cada grupo q₁, q₂, q₃ y q₄ es, independientemente, H. En determinadas realizaciones, tres de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, H y el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es distinto de H. En una realización adicional, el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, o CN. En determinadas realizaciones, el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, o CN. En una realización adicional, el otro de q₁, q₂, q₃ y q₄ es F.

- En una realización, dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, o CN. En una realización adicional, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, o CN. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, OJ₁, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂ o alcoxi C₁-C₁₂ sustituido. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, F.

- En una realización, uno de q₁ y q₂ es H y uno de q₃ y q₄ es H o tanto q₁ como q₂ son H o tanto q₃ como q₄ son H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H. En determinadas realizaciones, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H y son diferentes entre sí. En una realización adicional, uno de q₁ y q₂ y uno de q₃ y q₄ es H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, alquilo C₁-C₆.

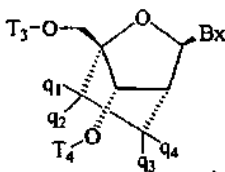
- En una realización, T₃ es hidroxilo o un hidroxilo protegido. En determinadas realizaciones, T₃ es un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido o una subunidad de monómero. En una realización adicional, T₃ es un grupo de enlace internucleósido unido a un oligonucleósido o a un oligonucleótido. En determinadas realizaciones, T₃ es un grupo de enlace internucleósido unido a un compuesto oligomérico.

- En una realización, T₄ es hidroxilo o un grupo hidroxilo protegido. En determinadas realizaciones, T₄ es un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido o una subunidad de monómero. En una realización adicional, T₄ es un grupo de enlace internucleósido unido a un oligonucleósido o a un oligonucleótido. En determinadas realizaciones, T₄ es un grupo de enlace internucleósido unido a un compuesto oligomérico.

En determinadas realizaciones, al menos uno de T₃ y T₄ comprende un grupo de enlace internucleósido seccionado

entre fosfodiéster o fosforotioato.

También se proporcionan en el presente documento los compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico carboxílico que tiene la fórmula que se ha mostrado anteriormente y que tienen adicionalmente la configuración de la siguiente fórmula:



En una realización, cada grupo de enlace internucleósido es, independientemente, un fosfodiéster o un fosforotioato.

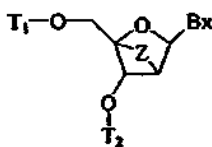
En una realización, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos una región con al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la fórmula. En determinadas realizaciones, la región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la fórmula se localiza en la parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico. En una realización adicional, la región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la fórmula se localiza en la parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico y el compuesto oligomérico comprende adicionalmente al menos un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula localizado en la otra parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico.

En una realización, se proporcionan los compuestos oligoméricos que tienen un motivo con huecos.

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

También se proporcionan los procedimientos o los compuestos para su uso en los procedimientos de reducción del ARN mensajero diana que comprenden el contacto de una o mas células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico de la invención.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los análogos de nucleósido bicíclico que tienen la fórmula:



en la que:

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

uno de T₁ y T₂ es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro T₁ y T₂ es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo;

Z es C(q₁)=C(q₂), C=C(q₁)(q₂)-C(q₃)(q₄) o C(q₃)(q₄)-C=C(q₁)(q₂);

q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H, 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;

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos 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; y

cada grupo 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.

En una realización, Z es C(q₁)=C(q₂). En determinadas realizaciones, Z es C=(q₁)(q₂)-C(q₃)(q₄). En una realización

adicional, Z es $C(q_3)(q_4)-C[=(q_1)(q_2)]$.

En una realización, Z es $C[-C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_3)(q_4)-C[=C(q_1)(q_2)]$ y q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente H.

5 En una realización, Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_3)(q_4)-C[=C(q_1)(q_2)]$, tres de de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son, independientemente, H y uno de de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es distinto de H. En determinadas realizaciones, el grupo de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 que no es H es halógeno, OJ_1 , alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , o CN. En una realización adicional, el grupo de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 que no es H es halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido.

10 En una realización, Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_3)(q_4)-C[=C(q_1)(q_2)]$, dos de de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son, independientemente, H y otros dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son distintos de H. En una realización adicional, los dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 que no son H son cada uno, independientemente, halógeno, OJ_1 , alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , o CN. En determinadas realizaciones, los dos grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 que no son H son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido. En una realización adicional, q_1 y q_2 son cada uno, independientemente, H. En determinadas realizaciones, q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, H. En determinadas realizaciones, uno de q_1 y q_2 es H y uno de q_3 y q_4 es H.

20 En una realización, Z es $C[=C(q_1)(q_2)]-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_3)(q_4)-C[=C(q_1)(q_2)]$ y solamente uno de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es H. En determinadas realizaciones, cada uno de los tres grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 que no son H son cada uno, independientemente, halógeno, OJ_1 , alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , o CN. En una realización adicional, cada uno de los tres grupos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 que no son H son cada uno, independientemente, halógeno, hidroxilo, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido.

25 En una realización, Z es $C(q_1)=C(q_2)$ y q_1 y q_2 son cada uno, independientemente, H. En determinadas realizaciones, Z es $C(q_1)=C(q_2)$ y uno de q_1 y q_2 es H y el otro de q_1 y q_2 es distinto de H. En una realización adicional, uno de q_1 y q_2 es H y el otro es halógeno, OJ_1 , alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , o CN. En determinadas realizaciones, uno de q_1 y q_2 es H y el otro es halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido.

30 En una realización, Z es $C(q_1)=C(q_2)$ y q_1 y q_2 son ambos distintos de H. En determinadas realizaciones, los grupos q_1 y q_2 son cada uno, independientemente, halógeno, OJ_1 , alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , o CN. En una realización adicional, los grupos q_1 y q_2 son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido.

35 En una realización, T_1 y T_2 son cada uno, independientemente, un grupo hidroxilo protector. En determinadas realizaciones, cada uno de hidroxilo protectores se selecciona, independientemente, entre acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropirano, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 2-trimetilsililetilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, benzoílo, p-fenilbenzoílo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, trifenilmetil (trilito), 4,4'-dimetoxitritilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, triisopropilsililo, benzoilformiato, cloro-acetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloílo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, triflato, trilito, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo, 9-fenilxantin-9-ilo (Pixil) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX).

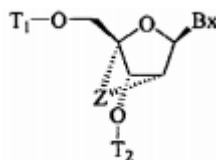
40 En una realización, T_1 es acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo o 4,4'-dimetoxitritilo. En determinadas realizaciones, T_1 es 4,4'-dimetoxitritilo. En una realización adicional, T_1 es 4,4'-dimetoxitritilo y T_2 es diisopropilcianoetoxi fosforamidita.

En una realización, T_2 es un grupo fósforo reactivo. En determinadas realizaciones, el grupo fósforo reactivo es diisopropilcianoetoxi fosforamidita o H-fosfonato.

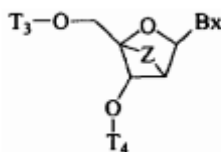
45 En una realización, el grupo Bx es una pirimidina, pirimidina sustituida, purina o purina sustituida. En determinadas realizaciones, el grupo Bx es uracilo, 5-metiluracilo, 5-metilcitosina, 5-tiazolo-uracilo, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina o 2,6-diaminopurina.

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

En una realización, se proporcionan los nucleósidos bicíclicos que tienen la configuración:



En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula:



en la que:

- 5 Bx es un resto alcalino heterocíclico;
T₃ es un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido, un grupo conjugado unido o un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad de monómero o un compuesto oligomérico;
10 T₄ es un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido, un grupo conjugado unido o un grupo de enlace internucleósido unido a nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad de monómero o un compuesto oligomérico;
en la que al menos uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad de monómero o un compuesto oligomérico;
15 Z es C(q₁)=C(q₂), C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₃)(q₄)-C[=C(q₁)(q₂)];
q₁, q₂, q₃ son q₄ cada uno, independientemente, H, 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;
20 en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆, alquino 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; y
cada grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆, alquino C₂-C₆ sustituido, aminoalquilo C₁-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ sustituido o un grupo protector.

En una realización, Z es C(q₁)=C(q₂). En determinadas realizaciones, Z es C[=(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄). En una realización adicional, Z es C(q₃)(q₄)-C[=(q₁)(q₂)].

- En una realización, Z es C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₃)(q₄)-C[=C(q₁)(q₂)] y los grupos q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente H.

- En una realización, Z es C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₃)(q₄)-C[=C(q₁)(q₂)], tres de de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, H y uno de de q₁, q₂, q₃ y q₄ es distinto de H. En determinadas realizaciones, el grupo de q₁, q₂, q₃ y q₄ que no es H es halógeno, OJ₁, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, o CN. En una realización adicional, el grupo de q₁, q₂, q₃ y q₄ que no es H es halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido.

- En una realización, Z es C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₃)(q₄)-C[=C(q₁)(q₂)], dos de de q₁, q₂, q₃ y q₄ son, independientemente, H y los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H. En una realización adicional, los otros dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ que no son H son cada uno, independientemente, halógeno, OJ₁, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, o CN. En determinadas realizaciones, los dos grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ que no son H son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido. En una realización adicional, los grupos q₁ y q₂ son cada uno, independientemente, H. En determinadas realizaciones, los grupos q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H. En determinadas realizaciones, uno de q₁ y q₂ es H y uno de q₃ y q₄ es H.

- En una realización, Z es C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₃)(q₄)-C[=C(q₁)(q₂)] y solamente uno de de q₁, q₂, q₃ y q₄ es H. En determinadas realizaciones, cada uno de los tres grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ que no son H son cada uno, independientemente, halógeno, OJ₁, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, o CN. En una realización adicional, cada uno de los tres grupos de q₁, q₂, q₃ y q₄ que no son H son cada uno, independientemente, halógeno, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido.

- En una realización, Z es C(q₁)=C(q₂) y los grupos q₁ y q₂ son cada uno, independientemente, H. En determinadas realizaciones, Z es C(q₁)=C(q₂) y uno de q₁ y q₂ es H y el otro de q₁ y q₂ es distinto que H. En una realización adicional, uno de q₁ y q₂ es H y el otro es halógeno, OJ₁, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂ o CN. En determinadas realizaciones, uno de q₁ y q₂ es H y el otro es halógeno,

alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido.

En una realización, Z es C(q₁)=C(q₂) y q₁ y q₂ son ambos distintos de H. En determinadas realizaciones, los grupos q₁ y q₂ son cada uno, independientemente, halógeno, OJ₁, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, o CN. En una realización adicional, q₁ y q₂ son cada uno, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido.

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

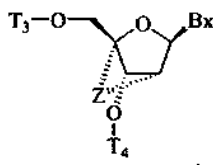
En una realización, cada grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₃.

10 En una realización, T₃ es hidroxilo o un grupo hidroxilo protegido. En determinadas realizaciones, T₃ es un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido o una subunidad de monómero. En una realización adicional, T₃ es un grupo de enlace internucleósido unido a un oligonucleósido o a un oligonucleótido. En determinadas realizaciones, T₃ es un grupo de enlace internucleósido unido a un compuesto oligomérico.

15 En una realización, T₄ es hidroxilo o un grupo hidroxilo protegido. En determinadas realizaciones, T₄ es un grupo de enlace internucleósido unido a un nucleósido, un nucleótido o a una subunidad de monómero. En una realización adicional, T₄ es un grupo de enlace internucleósido unido a un oligonucleósido o a un oligonucleótido. En determinadas realizaciones, T₄ es un grupo de enlace internucleósido unido a un un compuesto oligomérico.

En una realización, al menos uno de T₃ y T₄ comprenden un grupo de enlace internucleósido que se selecciona entre fosfodiéster o fosforotioato.

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



En una realización, cada grupo de enlace internucleósido es, independientemente, un fosfodiéster o un fosforotioato.

25 En una realización, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la fórmula. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la fórmula localizada en la parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico. En una realización adicional, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la fórmula localizada en la parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico y al menos un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula localizada en la otra parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico. En una realización, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que comprenden al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la fórmula localizada en la parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico y al menos un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula localizada en la otra parte 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico.

30 En una realización, se proporciona un compuesto oligomérico con huecos que comprende uno o dos nucleósidos bicíclicos que tienen dicha fórmula en la parte 5' terminal y dos o tres nucleósidos bicíclicos que tienen dicha fórmula en la parte 3' terminal. En determinadas realizaciones, el compuesto oligomérico con huecos comprende una región interna de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 β-D-desoxiribonucleósidos. En una realización adicional, el compuesto oligomérico con huecos comprende una región interna de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 β-D-desoxiribonucleósidos. En determinadas realizaciones, el compuesto oligomérico con huecos comprende una longitud de 10 a 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos.

35 En una realización, se proporcionan los compuestos oligoméricos que tienen una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que tienen una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. En una realización adicional, se proporcionan los compuestos oligoméricos que tienen una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. En determinadas realizaciones se proporcionan los compuestos oligoméricos que tienen una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos.

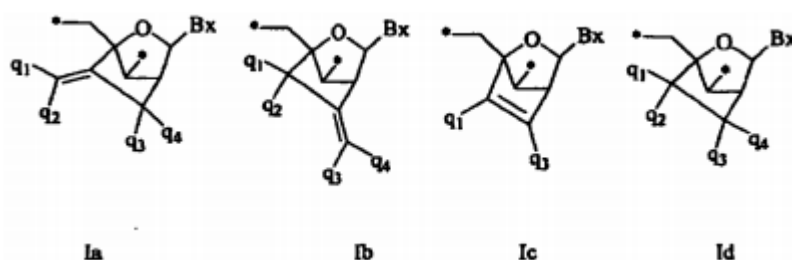
También se proporcionan los procedimientos o los compuestos para su uso en los procedimientos de inhibición de la expresión genética que comprenden el contacto de una o más células, un tejido o un animal con un compuesto

oligomérico de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se proporcionan los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos (también mencionados en el presente documento como nucleósidos bicíclicos), los compuestos oligoméricos que comprenden dos nucleósidos bicíclicos carbocíclicos y los procedimientos para el uso de los compuestos oligoméricos. Los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos transmiten propiedades mejoradas a los compuestos oligoméricos a los que se incorporan. En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos y las composiciones se conciben para hibridarse con una porción de ARN diana. Los oligómeros proporcionados en el presente documento también pueden ser útiles como cebadores y sondas en las aplicaciones de diagnóstico. En determinadas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos proporcionados en el presente documento se representan mediante las fórmulas Ia, Ib, Ic y Id:



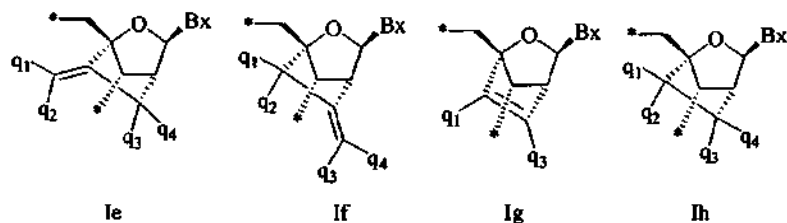
los asteriscos, cómo monómeros, son representativos de diversos grupos presentes durante la síntesis del monómero hasta la etapa amidita. Los grupos funcionales también se pueden unir en la etapa de monómero lo que mejorará o, de otra manera, serán útiles después de la incorporación del monómero en un oligómero. Los grupos representativos útiles en la etapa de monómero incluyen, pero no se limitan a, grupo hidroxilo protegido, un grupo conjugado unido opcionalmente, un grupo indicador o un grupo fósforo reactivo. Después de su incorporación en un compuesto oligomérico, los asteriscos serán representativos de de enlace internucleósido tales como unos grupos de enlace internucleósido fosfodiéster o fosforotioato que conectan a los monómeros dentro del compuesto oligomérico excepto para los monómeros localizados en la partes 5' y 3' terminales. Los monómeros terminales pueden tener un grupo hidroxilo terminal o grupos hidroxilo protegido o pueden tener una diversidad de otros grupos unidos que se añaden de manera rutinaria a las partes terminales de los compuestos oligoméricos para mejorar una propiedad deseada tal como, por ejemplo, grupos conjugados o indicadores. Terminales especialmente útiles incluyen aquellos que mejoran la actividad antisentido de los compuestos oligoméricos.

El Bx es un resto alcalino heterocíclico que se puede modificar pero es preferentemente una nucleobase purina o pirimidina.

Cada q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es, independientemente, H, 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 $N(H)C(=S)NJ_1J_2$; en el que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con un grupo de sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, 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 grupo 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.

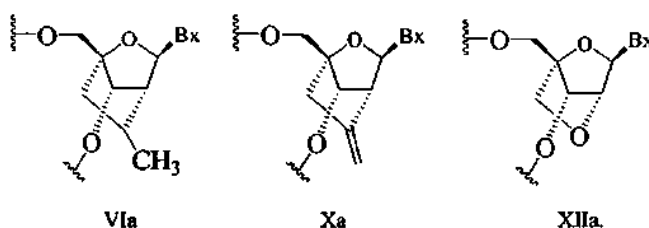
En determinadas realizaciones, cada q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es H. En determinadas realizaciones, uno de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es distinto de H. En determinadas realizaciones, dos de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son distintos de H. En determinadas realizaciones, tres de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son distintos de H. En determinadas realizaciones, cada uno de q_1 , q_2 , q_3 y q_4 es distinto de H. En determinadas realizaciones, los grupos q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 o CN . En determinadas realizaciones, los grupos q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son independientemente, halógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxi C_1-C_6 . En determinadas realizaciones, los grupos q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son independientemente, flúor o metilo.

En determinadas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos representados mediante las fórmulas Ia, Ib, Ic y Id se proporcionan con la configuración representada mediante las fórmulas Ie, If, Ig e Ih:



en las que las variables son como se han definido anteriormente.

Se ensayaron los compuestos oligoméricos que comprenden nucleósidos bicíclicos carbocíclicos para una actividad in vivo (Ejemplo 56). Se prepararon los compuestos oligoméricos que tienen un motivo hueco 2/14/2 en los que, para cada compuesto oligomérico, los 14 nucleósidos en el hueco fueron β -D-2'-desoxiribonucleósidos y los 4 nucleósidos en las alas de cada compuesto oligomérico se seleccionaron entre una de las fórmulas que se muestran a continuación:



Cada uno de los compuestos oligoméricos mostraron una buena actividad con la dosificación elevada con los compuestos oligoméricos que tienen las fórmulas Xa y XIIa mostrando una actividad comparable (una inhibición del 95 y del 96% con la dosificación de 60 μ mol/kg). Los compuestos oligoméricos que tienen las fórmulas Xa y XIIa también mostraron ED₅₀ comparables. Los compuestos oligoméricos que tienen las fórmulas VIa y Xa no presentaron una hepatotoxicidad significativa mientras que el compuesto oligomérico que tiene nucleósidos con la Fórmula XIIa presentó una hepatotoxicidad significativa con la dosificación más elevada.

Se proporcionan también los procedimientos de uso de los compuestos oligoméricos. En determinadas realizaciones, se proporcionan los procedimientos en los que una célula se pone en contacto con un compuesto oligomérico de la presente invención que es complementario con un ARN diana. La célula puede ser de un animal, preferentemente de un humano. El ARN diana se selecciona entre cualquier ARN que pudiera dar como resultado algún beneficio, pero preferentemente ARNm, ARNm previo y micro ARN. En determinadas realizaciones, el ARN diana se parte como resultado de la interacción con un compuesto oligomérico inhibiendo de ese modo su función. Se puede evaluar la eficacia de los procedimientos examinando una diversidad de criterios o de criterios de evaluación tales como la evaluación de la actividad antisentido mediante la detección de los niveles de un ARN diana, detectando el nivel de una proteína o mediante la detección de uno o más efectos fenotípicos.

Los nucleósidos bicíclicos que se proporcionan en el presente documento son útiles para modificar los compuestos oligoméricos, no modificados de otra manera, en una o más posiciones. Tales compuestos oligoméricos modificados se pueden describir como en posesión de un motivo particular. El término "motivo" se refiere al diseño de los nucleósidos modificados relativo a los nucleósidos no modificados o modificados de manera diferencial en un compuesto oligomérico. Determinados motivos que se pueden preparar usando los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos que se proporcionan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, un motivo hueco, un motivo hemímero, un motivo blocámero, un motivo totalmente modificado, un motivo modificado posicionalmente y un motivo alternante. Conjuntamente con estos motivos, también se pueden utilizar una gran diversidad de enlaces internucleósidos que incluyen, pero no se limitan a, enlaces fosfodiéster y fosforotioato usados uniformemente o en combinaciones. Se puede optimizar fácilmente la colocación de los nucleósidos bicíclicos carbocíclicos y el uso de las estrategias de enlace para la mejor actividad para un objetivo en particular.

Las patentes representativas de los Estados Unidos de América que enseñan la preparación de los motivos de representativos incluyen, pero no se limitan a, 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; 5.652.56; y 5.700.922, algunas de las cuales son propiedad del solicitante presente. También se desvelan los motivos en las Solicitudes Internacionales PCT/US2005/019219, presentada el 2 de Junio de 2005 y publicada como documento WO 2005/121371 el 22 de Diciembre de 2005 y PCT/US2005/019220, presentada el 2 de Junio de 2005 y publicada como documento WO 2005/121372 el 22 de Diciembre de 2005.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que tienen uno o más nucleósidos bicíclicos de una de las fórmulas Ia, Ib, Ic y/o Id localizadas en cada una de las posiciones 3' y 5'

terminales bordeando una región interna de los nucleósidos. Los nucleósidos internos, en determinadas realizaciones, son β -D-2'-desoxiribonucleósidos. En una realización adicional, son β -D-2'-desoxiribonucleósidos en combinación con uno u otros varios azúcares nucleósidos modificados o β -D-ribonucleósidos.

En una realización, el término "gamer" o "compuesto oligomérico con huecos" se refiere a un compuesto oligomérico quimérico que comprende una región central o interna (un "hueco") y una región externa a ambos lados de la región central o interna (las "alas"), en la que el hueco comprende al menos una modificación que es diferente a aquella de cada ala. Tales modificaciones incluyen una nucleobase, enlace de monómeros y modificaciones en el azúcar así como la ausencia de modificación (no modificado). De este modo, en determinadas realizaciones, los enlaces de nucleótido en ambas alas son diferentes a los enlaces de nucleótido en el hueco. En determinadas realizaciones, cada ala comprende los nucleótidos con modificaciones de alta afinidad y el hueco comprende los nucleótidos que no comprenden aquella modificación. En determinadas realizaciones, los nucleótidos en el hueco y los nucleótidos en las alas comprenden modificaciones de alta afinidad, pero las modificaciones de alta afinidad en el hueco son diferentes a las modificaciones de alta afinidad en las alas. En determinadas realizaciones, las modificaciones en las alas son las mismas entre ellas. En determinadas realizaciones, las modificaciones en las alas son diferentes entre ellas. En determinadas realizaciones, los nucleótidos en el hueco no están modificados y los nucleótidos en las alas están modificados. En las realizaciones preferidas, las modificaciones son los nucleósidos biccíclicos *N*-alcoxi-amino.

En una realización, el término "gapmer" o "compuesto oligomérico con huecos" pretende incluir una secuencia contigua de nucleósidos que se divide en 3 regiones, una región interna que tiene una región externa en cada parte 5' y 3' terminal. Las regiones se diferencian entre sí en que tienen por lo menos diferentes grupos de azúcares que comprenden los nucleósidos. Los tipos de nucleósidos que generalmente se usan para diferenciar las regiones de un compuesto oligomérico con huecos incluyen β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxiribonucleósidos, nucleósidos modificados en la posición 2', nucleósidos modificados con tio en la posición 4', nucleósidos modificados en la posición 2' y con tio en la posición 4' y nucleósidos modificados con azúcares bíclicos. Cada una de las regiones de un compuesto oligomérico con huecos están esencialmente modificadas de manera uniforme, por ejemplo, los grupos de azúcar son esencialmente idénticos a la región interna que tiene diferentes grupos de azúcar que cada una de las regiones externas. Generalmente, la región interna o el hueco comprende β -D-desoxiribonucleósidos, pero puede ser una secuencia de nucleósidos modificados con azúcar. En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos con huecos comprenden una región interna de β -D-desoxiribonucleósidos con ambas regiones externas comprendiendo nucleósidos modificados. Se ilustran los ejemplos de compuestos oligoméricos con huecos en la sección de ejemplos.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que comprenden uno o dos nucleósidos bicíclicos en la parte 5' terminal, dos o tres nucleósidos bicíclicos en la parte 3' terminal y una región interna de 10 a 16 nucleósidos. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que comprenden un nucleósido bicíclico en la parte 5' terminal, dos nucleósidos bicíclicos en la parte 3' terminal y una región interna de 10 a 16 nucleósidos. En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que comprenden un análogo de nucleósido bicíclico en la parte 5' terminal, dos nucleósidos bicíclicos en la parte 3' terminal y una región interna de 10 a 14 nucleósidos. En determinadas realizaciones, la región interna es esencialmente una secuencia contigua de β -D-desoxiribonucleósidos. En otra realización, se proporcionan los compuestos oligoméricos que incluyen adicionalmente uno o más grupos 5' o 3' terminales tales como un grupo conjugado que incluyen, pero no se limita a, nucleósidos modificados o no modificados adicionalmente, grupos conjugados de enlace y otros grupos conocidos por alguien experto en la materia. En un aspecto, se proporcionan los compuestos oligoméricos que comprenden los nucleósidos bicíclicos seleccionados entre las fórmulas Ia, Ib, Ic y Id.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que tienen una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 21 nucleósidos. En otra realización, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que tienen una longitud de aproximadamente 10 a 16. En otra realización, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que tienen una longitud de aproximadamente 12 a aproximadamente 16 nucleósidos. En una realización adicional, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que tienen una longitud de aproximadamente 12 a aproximadamente 14 nucleósidos. En una realización adicional, se proporcionan los compuestos oligoméricos con huecos que tienen una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 nucleósidos.

Los términos "sustituyente" y "grupo sustituyente", como se usan en el presente documento, se refieren a incluir grupos que generalmente se añaden a otros grupos o compuestos parentales para mejorar las propiedades deseadas o para producir los efectos deseados. Los grupos sustituyentes se pueden proteger o no proteger y se pueden añadir a un sitio disponible o a muchos sitios disponibles en un compuesto parental. Los grupos sustituyentes también se pueden sustituir adicionalmente con otros grupos sustituyentes y se pueden unir directamente o mediante grupos de enlace tales como un alquilo o un grupo hidrocarbilo a un compuesto parental. Tales grupos incluyen sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinenilo, acilo (-C(O)R_{aa}), carboxilo (-C(O)O-R_{aa}), grupos alifáticos, grupos alíciclicos, alcoxi, oxo sustituido (-O-R_{aa}), arilo, aralquilo, grupos 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}), ureído (-N(R_{bb})C(O)NR_{bb}R_{cc}), tioureído (-

$N(R_{bb})C(S)NR_{bb}-R_{cc}$), 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 ($-SR_{bb}$), sulfinilo ($-S(O)R_{bb}$), 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 grupo R_{aa} , R_{bb} y R_{cc} es, independientemente, H, un grupo funcional químico unido opcionalmente o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida que incluye, sin limitación, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, grupos alifáticos, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, grupos alicíclicos, grupos heterocíclicos y heteroarilalquilo. Los sustituyentes seleccionados dentro de los compuestos descritos en el presente documento están presentes en un grado recursivo.

En este contexto, "sustituyente recursivo" significa que un sustituyente puede enumerar otro ejemplo de sí mismo. Debido a naturaleza recursiva de tales sustituyentes, teóricamente, un gran número puede estar presente en cualquier reivindicación dada. Alguien con una experiencia normal en la técnica de la química médica y de la química orgánica entiende que el número total de tales sustituyentes está limitado razonablemente por las propiedades deseadas del compuesto pretendido. Tales propiedades incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, las propiedades físicas tales como el peso molecular, la solubilidad o el log P, las propiedades de aplicación tales como la actividad contra la diana pretendida y las propiedades prácticas tales como la facilidad de síntesis.

Los sustituyentes recursivos son un aspecto pretendido de la presente invención. Alguien con una experiencia normal en la técnica de la química médica y de la química orgánica entiende la versatilidad de tales sustituyentes. En la medida en la que los sustituyentes recursivos están presentes en una reivindicación de la presente invención, se determinará el número total como se ha establecido anteriormente.

El término "acilo," como se usa en el presente documento, se refiere a un radical formado mediante la eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general $-C(O)-X$ en la que el grupo X es típicamente alifático, alicíclico o aromático. Los ejemplos incluyen los carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilo alifáticos, sulfinilos aromáticos, sulfinilos 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 "alíciclico" se refiere a un sistema de anillo cíclico en el que el anillo es alifático. El sistema de anillo puede comprender uno o más anillos en los que al menos un anillo es alifático. Los grupos alicíclicos preferidos incluyen los 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.

El término "alifático," como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono en el que la saturación entre alguno de los dos átomos de carbono 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 más preferido el que contiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático se puede interrumpir con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Tales grupos alifáticos interrumpidos mediante 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.

El término "alquenilo," como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada de hidrocarburo que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, 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 el que contiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno más grupos sustituyentes adicionales.

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 parental. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, *tert*-butoxi, n-pentoxi, neopentoxi, n-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes opcionales adicionales.

El término "alquilo," como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, 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 C_1-C_{12}) siendo más preferido el que contiene 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 más grupos sustituyentes adicionales.

El término "alquinilo," 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 triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquino incluyen, pero no se limitan a, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, y similares. Los grupos alquino incluyen típicamente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono siendo más preferido el que contiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquino, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente uno más grupos sustituyentes adicionales.

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

Los términos "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 parental. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales unidos al grupo alquilo, al grupo arilo o a ambos grupos que forman el grupo radical.

Los términos "arilo" y "aromático" como se usan en el presente documento, se refieren a los radicales del sistema de anillo carbocíclico mono o policíclico que tienen uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares. Los sistemas de anillo 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.

Los términos "heteroarilo" y "heteroaromático", como se usan en el presente documento, se refieren a un radical que comprende un anillo aromático mono o policíclico, un sistema de anillo o un sistema de anillo fusionado en el que al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo también se refiere a incluir los sistemas de anillo fusionados en los que uno o más de los anillos fusionados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo incluyen típicamente un átomo de un anillo seccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo y similares. Los radicales heteroarilo se pueden unir a una molécula parental directamente o a través de un resto de enlace tal como un grupo alifático o un 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 parental. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, piridinilmetilo, pirimidiniletilo, naftiridinilpropilo y similares. Los grupos heteroarilalquilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales en una o en ambas de las porciones heteroarilo o alquilo.

El término "radical heterocíclico", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de un sistema de anillo mono o policíclico que incluye al menos un heteroátomo y que es insaturado, parcialmente saturado o totalmente saturado, que incluye, por lo tanto, los grupos heteroarilo. Heterocíclico también se refiere a incluir sistemas de anillo fusionado en los que uno o más de los anillos fusionados contienen al menos un heteroátomo y los otros anillos pueden contener uno o más heteroátomos o no contener heteroátomos opcionalmente. 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, piridazinilo, tetrahidrofurilo y similares. Los grupos heterocíclicos, como se usan en el presente documento, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

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

La expresión "estructura mono o policíclica", como se usa en el presente documento, incluye todos los sistemas de anillo que son sencillos o policíclicos que tienen anillos que se fusionan o enlazan y se refiere a la inclusión de los sistemas de anillo sencillos y mixtos seleccionados individualmente entre alifático, alicíclico, arilo, heteroarilo, aralquilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroaromático, heteroarilalquilo. Tales estructuras mono y policíclicas pueden contener los anillos que son uniformes o que tienen grados variables de saturación incluyendo los totalmente saturados, parcialmente saturados o totalmente insaturados. Cada anillo puede comprender átomos en el anillo seleccionados entre C, N, O y S para dar lugar a los anillos heterocíclicos así como anillos que comprenden solamente átomos de C en el anillo que se pueden presentar en un motivo mixto tal como, por ejemplo,

benzoimidazol, en el que un anillo tiene solamente átomos de carbono en el anillo y en el anillo fusionado tiene dos átomos de nitrógeno. Las estructuras mono o policíclicas se pueden sustituir 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 se pueden unir directamente a una molécula parental a través de un átomo del anillo, a través de un grupo sustituyente o de un resto de enlace bifuncional.

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

El término "ácido nucleico bicíclico" o "BNA" o "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 por lo tanto, un sistema de anillo bicíclico.

La expresión "compuesto oligomérico quimérico" o "oligonucleótido quimérico" se refiere a un compuesto oligomérico o a un oligonucleótido que tiene al menos un azúcar, nucleobase o enlace internucleósido que se modifica respecto a los nucleósidos unidos de manera natural. El resto de los azúcares, nucleobases y enlaces internucleósido se pueden modificar de manera independiente o no modificar, en los que cada nucleósido y cada enlace pueden ser el mismo o distinto.

La expresión "compuesto estable" y "estructura estable" se refieren a la indicación de un compuesto que es lo suficientemente robusto para superar el aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción y a la formulación en un agente terapéutico eficaz. En el presente documento sólo se contemplan los compuestos estables.

Los grupos de enlace o los restos de enlace bifuncional, tales como aquellos conocidos en la técnica, se pueden usar con los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento. Los grupos de enlace son útiles para la unión de funcionales químicos, grupos conjugados, grupos indicadores y otros grupos a los sitios selectivos en un compuesto parental, tal como, por ejemplo, un compuesto oligomérico. En general, un resto de enlace bifuncional comprende un resto hidrocarbilo que tiene dos grupos funcionales. Uno de funcionales se selecciona para su unión una molécula parental o un compuesto de interés y el otro se selecciona para que se una esencialmente a cualquier grupo seleccionado, tal como, un grupo funcional químico o un grupo conjugado. En determinadas realizaciones, el engarce comprende una estructura en cadena o un oligómero de unidades repetitivas, tales como, unidades de etilenglicol o aminoácido. Los ejemplos de funcionales que se usan de manera rutinaria en los restos de enlace bifuncional incluyen, pero no se limitan a, electrófilos para la reacción con grupos nucleofílicos y nucleófilos para la reacción con grupos electrófilos. En determinadas realizaciones, los restos de enlace bifuncional incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, dobles o triples enlaces) y similares. Algunos ejemplos no limitantes de restos de enlace bifuncional incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) y ácido 6-aminoheptanoico (AHEX o AHA). Otros grupos de enlace incluyen, pero no se limitan a, alquilo C₁-C₁₀ sustituido, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido o alquinilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, en los que una lista no limitante de sustituyentes preferidos incluye hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alquenilo y alquinilo.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos se modifican mediante la unión covalente de uno o más grupos 3' o 5' terminales. El término "grupo terminal", como se usa el presente documento, se refiere a la inclusión de útiles conocidos en la técnica experta que se pueden colocar en una o ambas partes 3' y 5' terminales de un compuesto oligomérico para diversos propósitos, tales como, permitir el seguimiento del compuesto oligomérico (una etiqueta fluorescente o un grupo indicador), mejorando la farmacocinética o la farmacodinámica del compuesto oligomérico (un grupo para mejorar la captación y la entrega) o mejorar una o más propiedades deseables del compuesto oligomérico (grupo para mejorar la estabilidad de la nucleasa o la afinidad de anclaje). En determinadas realizaciones, los grupos 3' y 5' terminales incluyen sin limitación, uno o más nucleósidos modificados modificados, grupos conjugados, grupos de sellado, restos fosfato y grupos protectores.

En determinadas realizaciones, se modifican los compuestos oligoméricos mediante la unión covalente de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico unido que incluyen, pero no se limitan a, la farmacodinámica, farmacocinética, anclaje, absorción, distribución celular, captación celular, carga y eliminación. Los grupos conjugados se usan de manera rutinaria en las técnicas químicas y se unen directamente o mediante un resto de enlace opcional o un grupo de enlace a un compuesto parental, tal como un compuesto oligomérico. Una lista preferida de grupos conjugados incluye, sin limitación, intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesterol, tiocolesterol, restos de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenacina, fenantridina, antraquinonea, adamantano, acridina, fluoresceinas, rodaminas, cumarinas y tintes.

El término "grupo protector", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto químico lábil, que se conoce en la técnica, que protege los grupos reactivos que incluyen sin limitación, grupos hidroxilo, amino y tiol, de las reacciones no deseadas durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores se usan típicamente de manera selectiva y/o de manera ortogonal para proteger los sitios durante las reacciones en otros sitios reactivos y entonces se pueden eliminar para dejar el grupo no protegido tal cual o disponible para las reacciones adicionales.

Los grupos protectores, como se conocen en la técnica, se describen generalmente en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons, New York (1999).

Los grupos se pueden incorporar selectivamente a los compuestos oligoméricos de la presente invención como precursores. Por ejemplo, un grupo amino se puede colocar en un compuesto de la presente invención como un grupo azido que se puede convertir químicamente en el grupo amino en un punto deseado de la síntesis. Generalmente, los grupos se protegen o se presentan como precursores que serán inertes a las reacciones que modifican otras áreas de la molécula parental para la conversión en sus grupos finales en el momento apropiado. Los grupos adicionales protectores representativos o precursores se analizan en Agrawal, y col., *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, Eds, Humana Press; New Jersey, 1994; Vol. 26 pp. 1-72,

Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo incluyen, pero no se limitan a, 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), benzoílfornio, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloilo, benzoilo, p-fenilbenzoilo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, trifenilmetil (trilito), monometoxitritilo, dimetoxitritilo (DMT), trimetoxitritilo, 1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo (FPMP), 9-fenilxantin-9-ilo (Pixil) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX). En los que los grupos protectores de hidroxilo más preferidos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2,6-diclorobencilo, t-butildimetilsililo, t-butil-difenilsililo, benzoilo, mesilato, tosilato, dimetoxitritilo (DMF), 9-fenilxantin-9-ilo (Pixil) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX).

Los ejemplos de grupos protectores de amino incluyen, pero no se limitan a, grupos protectores de carbamato, tales como 2-trimetilsililetoxicarbonilo (Teoc), 1-metil-1-(4-bifenilil)-etoxicarbonilo (Bpoc), t-butoxicarbonilo (BOC), aliloxi-carbonilo (Alloc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y benciloxicarbonilo (Cbz); grupos protectores de amida, tales como formilo, acetilo, trihaloacetilo, benzoilo y nitrofenilacetilo; grupos protectores de sulfonamida, tales como 2-nitrobenzenosulfonilo; y grupos protectores de imina e imida cíclica, tales como ftalimido y ditiassuccinilo. Los ejemplos de grupos protectores de tiol incluyen, pero no se limitan a, trifenilmetilo (trilito), bencilo (Bn) y similares.

En determinadas realizaciones, se preparan los compuestos oligoméricos mediante la conexión de nucleósidos con enlaces internucleósido que contiene el grupo fósforo protegido opcionalmente. Los grupos protectores representativos para los enlaces internucleósidos que contienen fósforo tales como los enlaces fosfodiéster y fosforotioato, que incluyen los grupos β -cianoetilo, difenilsililetilo, δ -cianobutenilo, ciano p-xililo (CPX), N-metil-N-trifluoroacetiletilo (META), acetoxifenoxietilo (APE) y buteno-4-ilo. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de América N°. 4.725.677 y el documento Re. 34.069 (β -cianoetilo); Beaucage, S.L. e Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 49 No. 10, pp. 1925-1963 (1993); Beaucage, S.L. e Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 49 No. 46, pp. 10441-10488 (1993); Beaucage, S.L. e Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 48 No. 12, pp. 2223-2311 (1992).

El término "protegido ortogonalmente" se refiere a los grupos funcionales que se protegen con diferentes clases de grupos protectores, en los que cada clase de grupo protector se puede eliminar en cualquier orden y en presencia de todas las otras clases (véase, Barany, G. y Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 7363; ídem, 1980, 102, 3084). La protección ortogonal se usa ampliamente, por ejemplo, en la síntesis de oligonucleótidos automatizada. Un grupo funcional se desbloquea en presencia de uno o más de otros grupos funcionales protegidos que no se ven afectados mediante el procedimiento de desbloqueo. Este grupo funcional desbloqueado reacciona de alguna manera y en algún punto se retira un grupo protector ortogonal adicional en un conjunto de diferentes condiciones de reacción. Esto permite que la química selectiva llegue a un compuesto deseado o a un compuesto oligomérico.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos que tienen grupos fósforo reactivos útiles para la formación de enlaces internucleósido que incluyen, por ejemplo, los enlaces internucleósido fosfodiéster y fosforotioato. Tales grupos fósforo reactivos se conocen en la técnica y contienen átomos de fósforo en el estado de valencia P^{III} o P^V , que incluyen, pero no se limitan a, fosforamidita, H-fosfonato, triésteres de fosfato y grupos auxiliares quirales que contienen fósforo. Una síntesis en fase sólida sintética preferida utiliza fosforamiditas (química del P^{III}) como los fosfitos reactivos. El intermedio de los compuestos fosfito se oxidan posteriormente al estado P^V usando los procedimientos conocidos para producir, en determinadas realizaciones, enlaces internucleótido fosfodéster o fosforotioato. Los fosfatos y fosfitos reactivos adicionales se desvelan en *Tetrahedron Report Number 309* (Beaucage e Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223-2311).

Como se usa en el presente documento, La expresión "enlace internucleósido o grupo de enlace internucleósido" se refiere a la inclusión de todo tipo de grupos de enlace internucleósido conocidos en la técnica que incluye, pero no se limita a, los grupos de enlace internucleósido que contienen fósforo tales como fosfodiéster y fosforotioato, grupos de enlace internucleósido que no contienen fósforo tales como formacetilo y metilenimino y grupos de enlace internucleósido no iónico neutro tales como amida-3 ($3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5'$), amida-4 ($3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5'$).

Los ejemplos específicos de los compuestos oligoméricos útiles en la presente invención incluyen los oligonucleótidos que contienen, por ejemplo, enlaces internucleósido que no ocurren de forma natural. Dos clases principales de enlaces internucleósido se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces internucleósido modificadas que tienen un átomo de fósforo incluyen, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfortriésteres, aminoalquilfosfortriésteres, metilo y otros fosfonatos de alquilo

que incluyen los fosfonatos de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen fosforamidato de 3'-amino y fosforamidatos de aminoalquilo, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos con enlaces 2'-5' de éstos y aquéllos que tienen la polaridad invertida en los que uno más de los enlaces internucleótido es un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos que tienen polaridad invertida pueden comprender un enlace 3' a 3' sencillo en el enlace internucleótido más 3', es decir, un residuo nucleósido invertido sencillo que puede ser abásico (la nucleobase se pierde o tiene un grupo hidroxilo en lugar del mismo). Se incluyen también diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de los Estados Unidos de América representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo mencionados anteriormente incluyen, pero no se limitan a, patente de los Estados Unidos de América N°: 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 del mismo propietario que la presente solicitud.

Los enlaces internucleósido modificados que no tienen un átomo de fósforo incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se forman mediante enlaces internucleósido alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomo mixto y enlaces internucleósido alquilo o cicloalquilo, uno o más enlaces internucleósido heteroatómico o heterocíclico de cadena corta. Éstos incluyen aquellos que tienen esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos de que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenoimino y metilenoimidazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes N, O, S y CH₂ mixtas. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleósido" se refiere a una secuencia de dos o más nucleósidos que se unen mediante enlaces internucleósido que no tienen átomos de fósforo.

Las patentes de los Estados Unidos de América representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos mencionados anteriormente incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos de América N°: 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 propietario que la presente solicitud.

Los grupos de enlace internucleósido también incluyen los grupos de enlace internucleósido neutro que pueden o no incluir un átomo fósforo. Como se ha usado en el presente documento, la frase "enlace internucleósido neutro" pretende incluir los enlaces internucleósido que no son iónicos. Los enlaces internucleósido neutros incluyen, pero no se limitan a, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), 3(3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5') amida, 4(3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5') amida, formacetal (3'-O-CH₂-O-5') y tioformacetal (3'-S-CH₂-O-5'). Los enlaces internucleósido neutros incluyen adicionalmente los enlaces no iónicos que comprenden siloxano (dialquilsiloxano), éster carboxilato, carboxamida, sulfuro, éster sulfonato y amidas (Véase por ejemplo: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi y P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 y 4, (pp. 40-65)). Los enlaces internucleósido neutros incluyen adicionalmente enlaces no iónicos que comprenden partes de componente N, O, S y CH₂ mixtas.

Los compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y de esta manera dan origen a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-, α o β o como (D)- o (L)- como para los aminoácidos. Todos esos isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras son aplicables al compuesto oligomérico proporcionado en el presente documento. Los isómeros ópticos se pueden preparar a partir de sus respectivos precursores ópticamente activos mediante los procedimientos descritos anteriormente o mediante resolución de las mezclas racémicas. La resolución se puede llevar a cabo en presencia de un agente de resolución, por cromatografía o por cristalización repetida o mediante alguna combinación de estas técnicas que son conocidas para los expertos en la materia. Los detalles adicionales respecto a las resoluciones se pueden encontrar en Jacques, y col., Enantiomers, Racemates, and Resolutions (John Wiley & Sons, 1981). Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen dobles enlaces olefínicos, otras insaturaciones u otros centros de asimetría geométrica y, a menos que se especifique lo contrario, se pretende que los compuestos incluyan tanto los isómeros geométricos E como Z o los isómeros cis- y trans-. De forma análoga, también se pretende incluir todas las formas tautoméricas. La configuración de cualquier doble enlace carbono-carbono que aparece en el presente documento se selecciona solamente por conveniencia y no se pretende indicar una configuración en particular a menos que el texto lo indique de esta manera; así, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-heteroátomo descrito arbitrariamente en el presente documento como trans puede ser cis, trans o una mezcla de los dos en cualquier proporción.

Como se usa en el presente documento, el término "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero que tiene al menos una región que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico. El término "compuesto oligomérico" incluye los oligonucleótidos, análogos oligonucleótidos y oligonucleósidos así como los miméticos de nucleótido y/o

polímeros mixtos que comprenden componentes de ácido nucleico y de ácido no nucleico. El término "compuesto oligomérico" también incluye los polímeros que comprenden subunidades de monómeros enlazadas en los que las unidades de monómero incluyen los nucleósidos, nucleósidos modificados, análogos de nucleósido, miméticos de nucleósido así como los componentes de ácido no nucleico tales como los grupos conjugados. En determinadas realizaciones, las mezclas de subunidades de monómero tales como, pero no limitadas a, aquellas enumeradas proporcionan los compuestos oligoméricos que tienen propiedades mejoradas para los usos tales como terapéuticos y diagnósticos. Los nucleósidos bicíclicos proporcionados en el presente documento se clasifican como nucleósidos modificados ya que la base y el azúcar ribosa están aún presentes. Las unidades de monómero se pueden unir mediante enlaces internucleósido fosfodiéster de origen natural o de manera alternativa mediante cualquier pluralidad de enlaces internucleósido desvelados en el presente documento tales como, pero no limitados a, los enlaces internucleósido fosforotioato o las mezclas de los mismos.

En general, un compuesto oligomérico comprende una cadena principal de subunidades de monómero unidas en las que cada subunidad de monómero unida está directa o indirectamente unida a un resto alcalino heterocíclico. Los compuestos oligoméricos también pueden incluir subunidades de monómero que no están unidas a un resto alcalino heterocíclico proporcionando, por lo tanto, sitios abásicos. Los enlaces que unen las subunidades de monómero, los restos de azúcar o sustitutos y los restos alcalinos heterocíclicos se pueden modificar independientemente. La unidad de enlace azúcar, que puede o no incluir una base heterocíclica, se puede sustituir con un mimético tal como los monómeros en los ácidos nucleicos peptídicos. La capacidad para modificar o sustituir las porciones o los monómeros completos en cada posición de un compuesto oligomérico da lugar a un gran número de motivos posibles.

Los compuestos oligoméricos se preparan linealmente de manera rutinaria pero se pueden unir o preparar al contrario, para que sean circulares y también pueden incluir ramificaciones. Los compuestos oligoméricos se pueden combinar para formar constructos bicatenarios tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar composiciones bicatenarias. Las composiciones bicatenarias se pueden unir o separar y pueden incluir salientes en los extremos.

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

En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero del ácido ribonucleico (ARN) o del ácido desoxirribonucleico (ADN). Este término incluye los oligonucleótidos compuestos por nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces internucleósido covalentes. El término "análogo de oligonucleótido" se refiere a los oligonucleótidos que no tienen uno o más porciones de origen natural. Tales oligonucleótidos que no son de origen natural se desean a menudo sobre las formas de origen natural porque las propiedades deseables tales como, por ejemplo, mejor captación celular, mayor afinidad para la diana del ácido nucleico y mayor estabilidad en presencia de las nucleasas.

194 En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleósido" se refiere a una secuencia de nucleósidos que se unen mediante enlaces internucleósido que no tienen átomos de fósforo. Los enlaces internucleósido de este tipo incluyen alquilo de cadena corta, cicloalquilo, alquil heteroátomo mixto, cicloalquil heteroátomo mixto, uno o más heteroátomos de cadena corta y uno más heterociclos de cadena corta. Estos enlaces internucleósido incluyen, pero no se limitan a, siloxano, sulfuro, sulfóxido, sulfona, acetilo, formacetilo, tioformacetilo, metilenformacetilo, tioformacetilo, alquenilo, sulfamato, metilenimino, metilenhidrazino, sulfonato, sulfonamida, amida y otros que tienen partes componentes N, O, S y CH₂ mixtas.

Las patentes de los Estados Unidos de América representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos mencionados anteriormente incluyen, pero no se limitan a, patentes de Estados Unidos de América N°: 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 propietario que la presente solicitud.

El término "nucleobase" o "resto alcalino heterocíclico", como se usa en el presente documento, pretende ser sinónimo de "base de ácido nucleico o mimético de la misma" En general, una nucleobase es cualquier subestructura que contiene uno o más átomos o grupos de átomos capaces de formar puentes de hidrógeno con una base de un ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, los nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil ($-C\equiv C-CH_3$) uracilo y citosina y otros derivados alquilo de las 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 sustituidas en la posición 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en la posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenine, 3-desazaguanina y 3-desazaadenina, bases universales, bases hidrofóbicas, bases promiscuas, bases de tamaño ampliado y bases fluoradas como se han definido en el presente documento. Las nucleobases modificadas adicionalmente incluyen las pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazin citidin (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazincitidin (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), pinzas G tales como una fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (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 se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-desazaadenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases adicionales incluyen aquellas desveladas en la Patente de los Estados Unidos de América Nº 3.687.808, aquellas desveladas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellas desveladas por Englisch y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y aquellas desveladas por Sanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993.

Las nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, bases universales, bases hidrofóbicas, bases promiscuas, bases de tamaño ampliado y bases fluoradas como se han definido 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 sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas y las purinas sustituidas en las posiciones N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del duplex 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, págs. 276-278) y en la actualidad se prefieren las sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de los Estados Unidos de América representativas que enseñan la preparación de determinadas nucleobases modificadas indicadas anteriormente así como de otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos de América indicadas anteriormente 3.687.808, así como las patentes de los Estados Unidos de América Nº: 4.845.205; 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 propietario que la presente solicitud, y cada una de las cuales se presenta por referencia en el presente documento y la patente de los Estados Unidos de América Nº 5.750.692, que es el mismo propietario que la presente solicitud.

Los compuestos oligoméricos que se han proporcionado en el presente documento también pueden contener uno o más nucleósidos que tienen restos de azúcar modificado. El anillo de azúcar furanosilo se puede modificar de numerosas maneras que incluyen la sustitución con un grupo sustituyente (2', 3', 4' o 5'), la formación de puentes para formar un BNA y la sustitución del grupo 4'-O con un heteroátomo tal como S o N(R). Algunas patentes de los Estados Unidos de América representativas que enseñan la preparación de tales azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos de América Nº: 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 de 2005 y publicada como documento WO 2005/121371 el 22 Diciembre de 2005, algunas de las cuales son del mismo propietario que la presente solicitud. Una lista representativa de los azúcares modificados preferidos incluye, pero no se limita a, los azúcares sustituidos que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ o un 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ (2'-MOE o simplemente MOE); azúcares modificados con 4' tio y azúcares modificados bicíclicos.

La expresión "mimético de nucleósido", como se usa en el presente documento, pretende incluir aquellas estructuras usadas para sustituir el azúcar o el azúcar y la base, no el enlace, en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como, por ejemplo, los miméticos de nucleósidos que tienen miméticos de los azúcares que tienen morfolino o biciclo[3,1,0]hexilo, por ejemplo, unidades de azúcar distintas de la furanosa con un enlace fosfodiéster. El término "sustituto de azúcar" se solapa con el término ligeramente más amplio "mimético de nucleósido" pero solamente pretende indicar la sustitución de la unidad de azúcar (anillo de furanosa). El término "mimético de nucleótido" pretende incluir aquellas estructuras usadas para sustituir el nucleósido y el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como, por ejemplo, péptidos, ácidos nucleicos o morfolinos (morfolinos unidos mediante un enlace -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster).

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento pueden comprender una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. Un experto normal en la materia apreciará que la presente invención contiene los compuestos oligoméricos con 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o 80 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos, o cualquiera de sus intervalos.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento tienen una longitud de 8 a 40 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. Un experto normal en la materia apreciará que la presente invención contiene los compuestos oligoméricos con 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 o 40 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos, o cualquiera de sus intervalos.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención tienen una longitud de 8 a 20 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. Un experto normal en la materia apreciará que la presente invención contiene los compuestos oligoméricos con una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos, o cualquiera de sus intervalos.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención tienen una longitud de 10 a 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. Un experto normal en la materia apreciará que la presente invención contiene los compuestos oligoméricos con una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos, o cualquiera de sus intervalos.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención tienen una longitud de 12 a 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. Un experto normal en la materia apreciará que la presente invención contiene los compuestos oligoméricos con una longitud de 12, 13, 14, 15 o 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos, o cualquiera de sus intervalos.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención tienen una longitud de 10 a 14 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos. Un experto normal en la materia apreciará que la presente invención contiene los compuestos oligoméricos con una longitud de 10, 11, 12, 13 o 14 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos, o cualquiera de sus intervalos.

En determinadas realizaciones, se proporcionan los compuestos oligoméricos que tienen cualquiera de una diversidad de intervalos de longitudes de las subunidades de monómero unidas. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona los compuestos oligoméricos que consisten en subunidades X-Y de monómero unidas, en las que X e Y se seleccionan independientemente entre 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 y cuando $X < Y$. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona los 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, 1-23, 11-24, 11-25, 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, 19-29, 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, 28-30 o 29-30 subunidades de monómero unidas.

En determinadas realizaciones, los intervalos para la 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 de monómero unidas.

En determinadas realizaciones, la oligomerización de los nucleósidos modificados y no modificados y miméticos de los mismos, se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos que están presentes en la bibliografía 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. Se pueden encontrar los procedimientos adicionales para la síntesis en fase sólida en las Patentes de los Estados Unidos de América de Caruthers N°. 4.415.732; 4.458.066; 4.500.707; 4.668.777; 4.973.679; y 5.132.418; y en las

Patentes de los Estados Unidos de América de N°. 4.725.677 y Re. 34.069.

El equipamiento disponible comercialmente usado de manera rutinaria para la síntesis de los compuestos oligoméricos y de los compuestos relacionados en base a los medios de apoyo se comercializa por varios proveedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Se puede emplear, adicionalmente o de manera alternativa, cualquier otro medio conocido en la técnica para tales síntesis. Las técnicas en fase sólida adecuadas, que incluyen las técnicas de síntesis automatizadas, se describen en F. Eckstein (ed.), *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York (1991).

La síntesis de ARN y de los análogos relacionados con respecto a la síntesis de ADN y de los análogos relacionados ha ido aumentando en cuanto a los esfuerzos para aumentar el ARNi. Las estrategias para la síntesis de ARN primario que se están usando comercialmente en la actualidad incluyen 5'-O-DMT-2'-O-t-butildimetilsililo (TBDMS), 5'-O-DMT-2'-O-[1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo] (FPMP), 2'-O-[(triisopropilsilil)oxi]metilo (2'-O-CH₂-O-Si(iPr)₃) (TOM) y el 5'-O-sililéter-2'-ACE (5'-O-bis(trimetilsiloxi)ciclododecilxisilil (DOD)-2'-O-bis(2-acetoxietoxi)metil éter. La lista actual de algunas de las principales compañías que ofrecen actualmente los productos de ARN incluye Pierce Nucleic Acid Technologies, Dharmacon Research Inc., Ameri Biotechnologies Inc. e Integrated DNA Technologies, Inc. Una compañía, Princeton Separations, está comercializando un activador de la síntesis de ARN que expone la reducción de los tiempos de acoplamiento especialmente con químicas de TOM y TBDMS.

Los grupos primarios que se están usando para la síntesis comercial de ARN son:

TBDMS	= 5'-O-DMT-2'-O-t-butildimetilsililo;
TOM	= 2'-O-[(triisopropilsilil)oxi]metilo;
DOD/ACE	= (5'-O-bis(trimetilsiloxi)ciclododecilxisilil 2'-O-bis(2-acetoxietoxi)metil éter
FPMP	= 5'-O-DMT-2'-O-[1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo].

En determinadas realizaciones, se incluyen las estrategias para la síntesis de ARN mencionadas anteriormente y las estrategias que serían un híbrido de las mencionadas anteriormente, por ejemplo, el uso de un grupo protector de 5' a partir de una estrategia con un protector de 2'-O a partir de otra estrategia como procedimientos para generar los oligómeros aplicables el presente documento.

En el contexto de la presente invención, "hibridación" significa emparejamiento de las cadenas complementarias de los compuestos oligoméricos. En determinadas realizaciones, un mecanismo de emparejamiento implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen reversos, entre bases nucleídicas o nucleotídicas complementarias (nucleobases) de las cadenas de los compuestos oligoméricos. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación se puede producir en circunstancias variables.

Un compuesto oligomérico es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana causando una pérdida de actividad y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a las secuencias de ácido nucleico no diana en las condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de los ensayos o del tratamiento terapéutico *in vivo* en las condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos en el caso de los ensayos *in vitro*.

"Complementario", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso de dos nucleobases independientemente del lugar en el que se localizan las dos. Por ejemplo, si una nucleobase en una posición determinada de un compuesto oligomérico es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, siendo el ácido nucleico diana una molécula de ADN, ARN o de oligonucleótido, entonces se considera que la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana está en una posición complementaria. El compuesto oligomérico y la molécula de ADN, ARN o de oligonucleótido son complementarias entre sí cuando un número suficiente de las posiciones complementarias de cada molécula está ocupado por las nucleobases que se pueden unir entre sí mediante enlaces de hidrógeno. De esta manera, "hibridable específicamente" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de emparejamiento preciso o de complementariedad a lo largo de un número suficiente de nucleobases de manera que se produce la unión estable y específica entre el oligonucleótido y un ácido nucleico diana.

En la técnica se entiende que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser complementaria al 100% a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridar a lo largo de uno o más segmentos de manera que los segmentos intermedios o adyacentes no se involucran en el suceso de la hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle o una estructura en horquilla). Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento pueden comprender al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 99% de la complementariedad de la secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácido nucleico a la que están dirigidos. Por ejemplo, un compuesto oligomérico en el que 18 de las 20 nucleobases del compuesto oligomérico son complementarias con una región diana y por lo tanto hibridarían

específicamente, representaría una complementariedad del 90 por ciento. En el presente ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes se pueden agrupar e intercalar con las nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o a las nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto oligomérico que tiene una longitud de 18 nucleobases, que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que está flanqueadas por dos regiones de completa complementariedad con el ácido nucleico diana tendría una complementariedad total del 77,8% con el ácido nucleico diana y por lo tanto entraría dentro del alcance que se desvela en el presente documento. El porcentaje de complementariedad de un compuesto oligomérico con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar de manera rutinaria usando los programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y los programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656).

En el presente documento también se proporcionan los compuestos oligoméricos que incluyen, sin limitación, los compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencias guía externas (EGS), empalmadores alternos, cebadores, sondas compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos oligoméricos se pueden presentar en la forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles. Una vez introducidos en un sistema, los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden conseguir la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para lograr la modificación del ácido nucleico diana.

Un ejemplo no limitante de tal enzima es la ARNasa H, una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. Se conoce en la técnica que los compuestos oligoméricos monocatenarios que son de "tipo ARN" producen ARNasa H. Por lo tanto, la activación de la ARNasa H, da como resultado la escisión del ARN diana, mejorando de ese modo enormemente la eficacia de la inhibición de la expresión mediada por oligonucleótidos de la expresión genética. Se han postulado papeles similares para otras ribonucleasas tales como las de la familia de las las enzimas de la ARNasa III y la ribonucleasa L.

Mientras que una forma de compuesto oligomérico es un oligonucleótido antisentido monocatenario, se ha demostrado que, en muchas especies la introducción de estructuras bicatenarias, tales como las moléculas de ARN bicatenarias (ARNds), inducen una reducción mediada por un antisentido potente específico de la función de un gen o de sus productos genéticos asociados. Este fenómeno sucede tanto en plantas como en animales y se cree que tiene una conexión evolutiva con la defensa viral y el silenciamiento de los transposones.

En determinadas realizaciones, se pueden emplear "segmentos diana adecuados" en la detección de compuestos oligoméricos adicionales que modulan la expresión de una proteína seccionada. Los "moduladores" son aquellos compuestos oligoméricos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína y que comprenden al menos una porción de 8 nucleobases que es complementaria a un segmento diana adecuado. El procedimiento de detección comprende las etapas de puesta en contacto de un segmento diana adecuado de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína con uno o más moduladores candidato y la selección de uno más moduladores candidato que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína. En determinadas realizaciones, una vez que se ha demostrado que el modulador o moduladores candidato son capaces de modular (por ejemplo, disminuir o aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido, entonces se puede emplear el modulador en estudios adicionales de investigación de la función del péptido o se puede usar como agente de búsqueda, diagnóstico o terapéutico.

En determinadas realizaciones, los segmentos diana adecuados se pueden combinar con sus respectivos compuestos oligoméricos antisentido complementarios para formar oligonucleótidos bicatenarios (dúplex) estabilizados. Se ha demostrado en la técnica que tales restos de oligonucleótidos bicatenarios modulan la expresión de la diana y regulan la traducción así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios se puede someter 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 demostrado que tales restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex a la diana, desencadenando de ese modo la degradación enzimática de la diana (Tijsterman y col., Science, 2002, 295, 694-697).

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento también se pueden aplicar en las áreas de descubrimiento de fármacos y de validación de dianas. Los compuestos oligoméricos también se pueden usar conjuntamente con las dianas identificadas en el presente documento en los esfuerzos para el descubrimiento de fármacos que esclarezcan las relaciones que existen entre las proteínas y un estado de enfermedad, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen la detección o la modulación de un péptido diana que comprende el contacto de una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos oligoméricos, la medida del nivel del ácido nucleico o de la proteína de la diana y/o un aspecto de valoración fenotípico o químico en algún momento después del tratamiento y comparar opcionalmente 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 se pueden llevar a cabo en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de los genes

desconocidos para el procedimiento de validación de la diana o para determinar la validez un producto genético en concreto como una diana para el tratamiento o la prevención de la enfermedad, afección o fenotipo concretos.

Como se usa en el presente documento, el término "dosificación" se refiere a una cantidad especificada de un agente farmacéutico suministrado en una administración sencilla. En determinadas realizaciones, se puede administrar una dosificación en dos o más embolados, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, en las que se desea la administración subcutánea, la dosificación deseada requiere un volumen que no es fácil de suministrar mediante una inyección sencilla. En tales realizaciones, se pueden usar dos o más inyecciones para conseguir la dosificación deseada. En determinadas realizaciones, se puede administrar la dosificación en dos o más inyecciones para minimizar la reacción en un individuo en el sitio de inyección.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos modificados químicamente de la presente invención tienen una mayor afinidad hacia los ARN diana que hacia el ADN no modificado. En algunas de tales realizaciones, tal afinidad superior proporciona a su vez una potencia aumentada que permite la administración de dosificaciones menores de tales compuestos, un potencial reducido de toxicidad y una mejora del índice terapéutico y una disminución del coste total de la terapia.

Se evalúa el efecto de las modificaciones de los nucleósidos sobre la actividad del ARNi 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 se pueden utilizar para el diagnóstico, la terapia, la profilaxis y como reactivos de investigación y kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión genética con una especificidad exquisita, se usan a menudo por los expertos en la materia para esclarecer la función de genes concretos o para distinguir entre las funciones de los diferentes miembros de una ruta biológica. Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento, se pueden utilizar, solos o combinados con otros compuestos oligoméricos o terapéuticos, como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para esclarecer los patrones de expresión de una porción o del complemento completo de los genes expresados en las células y en los tejidos. Los compuestos oligoméricos también se pueden usar de manera eficaz como cebadores y sondas en condiciones que favorezcan la amplificación o la detección genética, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en los procedimientos que requieren la detección específica de las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas y en la amplificación de las moléculas de ácido nucleico para la detección o para su uso en estudios adicionales. Se puede detectar la hibridación de los oligonucleótidos antisentido de la presente invención, particularmente los cebadores y las sondas, con un ácido nucleico con los medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir la conjugación de una enzima con un oligonucleótido, marcaje radioactivo del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. Se pueden preparar los kits que usan tales medios de detección para la detección del nivel de las proteínas seleccionadas en una muestra.

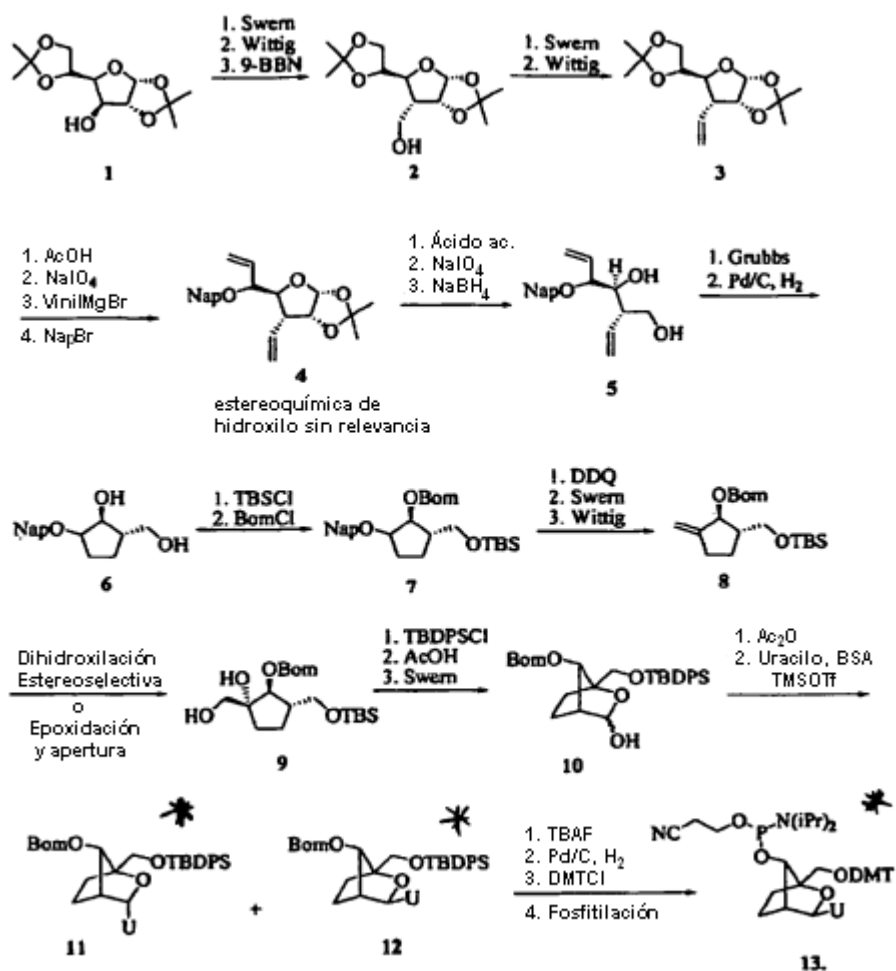
Como ejemplo no limitante, se comparan los patrones de expresión, dentro de las células o tejidos tratados con uno o más compuestos oligoméricos, con las células o los tejidos de control no tratados con los compuestos oligoméricos y se analizan los patrones producidos en busca de niveles diferenciales de expresión génica por su pertenencia, por ejemplo, a una asociación de enfermedades, ruta de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis se pueden llevar a cabo sobre células estimuladas o no estimuladas en presencia o ausencia de otros compuestos y compuestos oligoméricos que afectan a los patrones de expresión.

Los ejemplos de los procedimientos de los análisis de expresión genética conocidos en la técnica incluyen las 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 seriado de la expresión genética) (Madden, y col., *Drug Discov. Today*, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación con enzimas de restricción de los ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión genética total) (Sutcliffe, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómicas (Celis, y col., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Jungblut, y col., *Electrophoresis*, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de etiquetas de secuencia expresada (EST) (Celis, y col., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Larsson, y con., *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143-57), toma de huellas de ARN sustractiva (SuRF) (Fuchs, y col., *Anal. Biochem.*, 2000, 286, 91-98; Larson, y col., *Cytometry*, 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 fluorescente in situ) (Going and Gusterson, *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1895-904) y los procedimientos de espectrometría de masas (To, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2000, 3, 235-41).

Mientras que los monómeros, los oligómeros y los procedimientos proporcionados en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con algunas de sus realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar la presente invención y no se pretende que limiten a la misma. * = Compuesto no cubierto por las reivindicaciones anexas.

Ejemplo 1

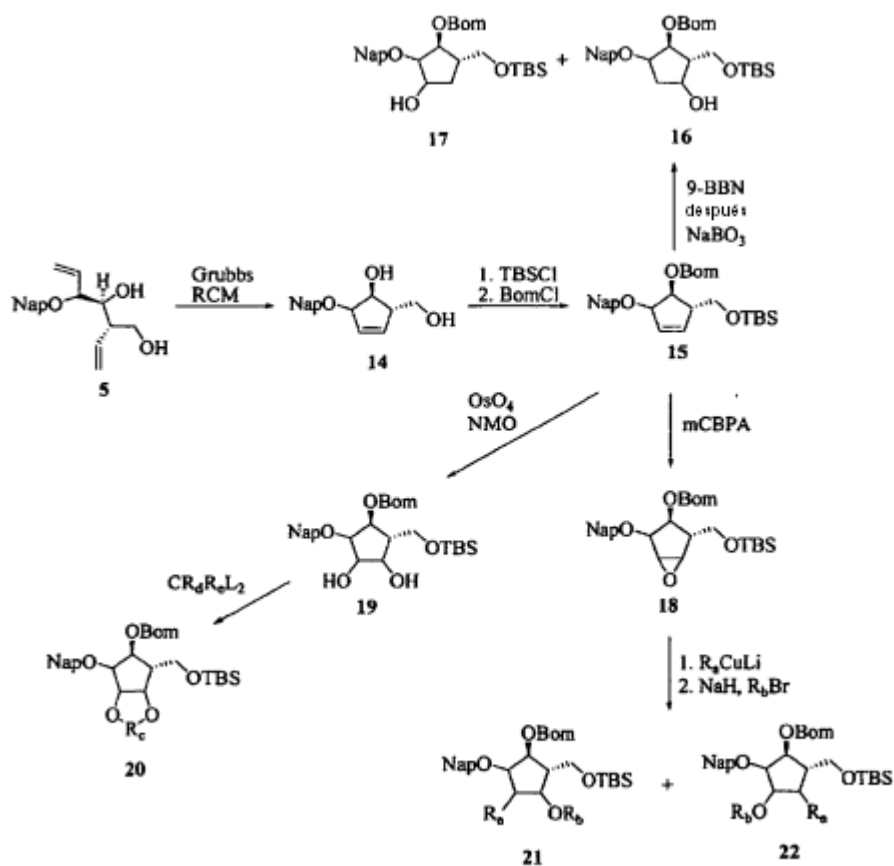
Preparación del Compuesto 13 (Esquema 1)



5

Ejemplo 2

Preparación de los Compuestos 14-22 (Esquema 2)

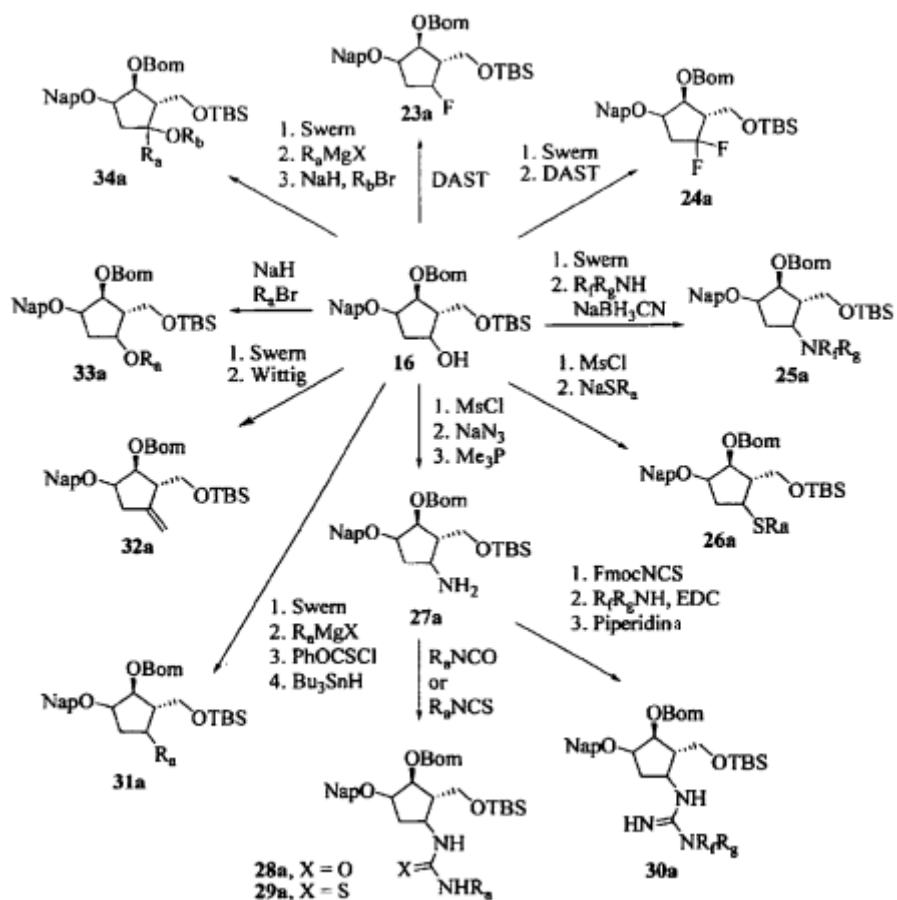


R_a y R_b son, independientemente, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂ o alquino C₂-C₁₂ sustituido; y

R_c es $-(CR_dR_e)_n$ en el que cada grupo R_d y R_e es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o un grupo sustituyente o R_d y R_e juntos son un doble enlace O o S, n es de 1 a aproximadamente 4 y cada grupo L es independientemente, Br, I o un grupo saliente.

Ejemplo 3

Preparación de los Compuestos 23a-34a (Esquema 3)

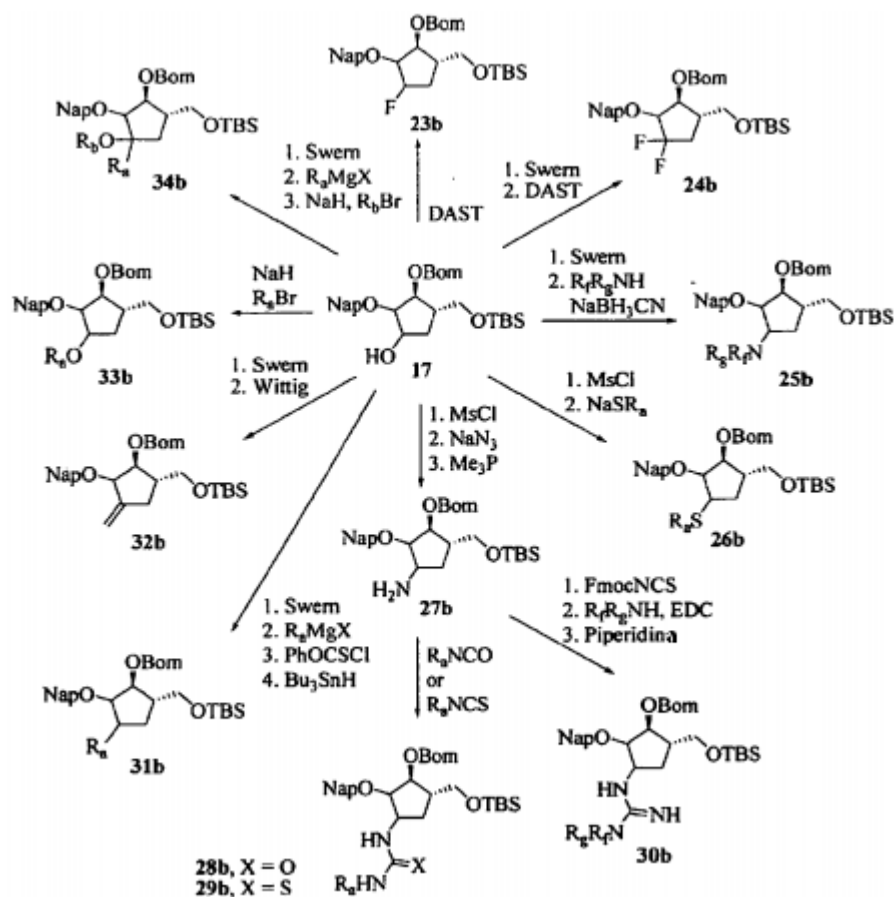


R_a y R_b son, independientemente, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenoilo C_2-C_{12} , alquenoilo C_2-C_{12} sustituido, alquinoilo C_2-C_{12} o alquinoilo C_2-C_{12} sustituido.

R_f y R_g son, independientemente, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenoilo C_2-C_{12} , alquenoilo C_2-C_{12} sustituido, alquinoilo C_2-C_{12} , alquinoilo C_2-C_{12} sustituido, alquilo O- C_1-C_{12} , alquilo O- C_1-C_{12} sustituido, alquilo S- C_1-C_{12} o alquilo S- C_1-C_{12} sustituido.

Ejemplo 4

Preparación de los Compuestos 23b-34b (Esquema 4)

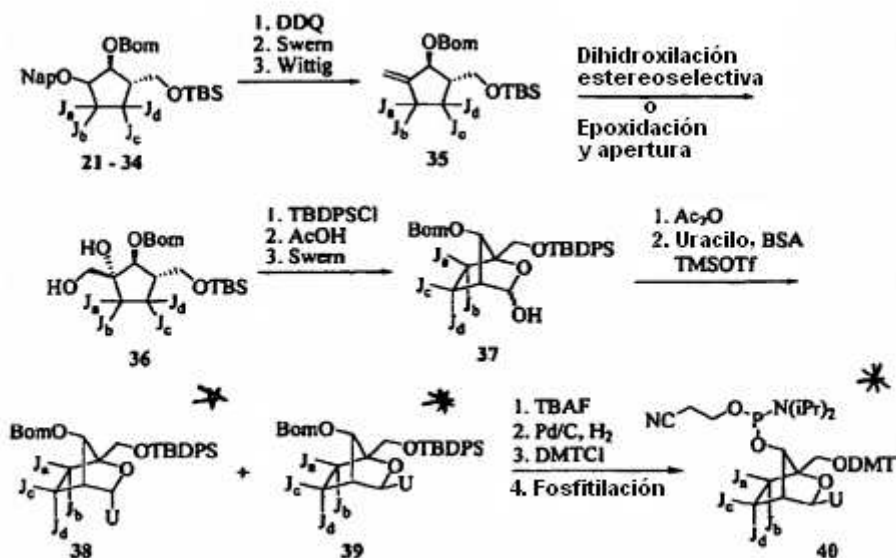


R_a y R_b son, independientemente, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, alquino C_2-C_{12} o alquino C_2-C_{12} sustituido.

R_f y R_g son, independientemente, 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} o alquino C_2-C_{12} sustituido, alquilo O- C_1-C_{12} , alquilo O- C_1-C_{12} sustituido, alquilo S- C_1-C_{12} o alquilo S- C_1-C_{12} sustituido.

Ejemplo 5

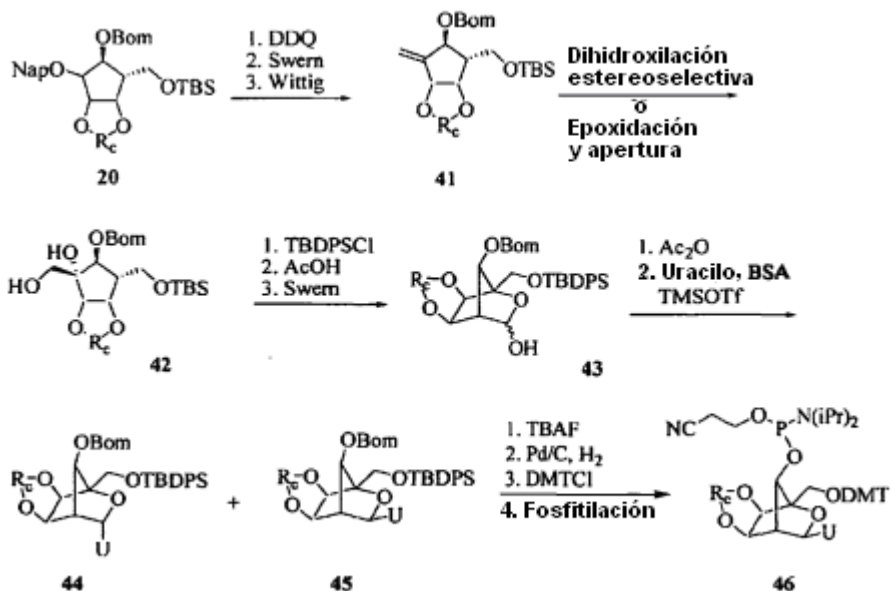
Preparación de los Compuestos 35-40 (Esquema 5)



Cada J_a, J_b, J_c y J_d es, independientemente, H, 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.

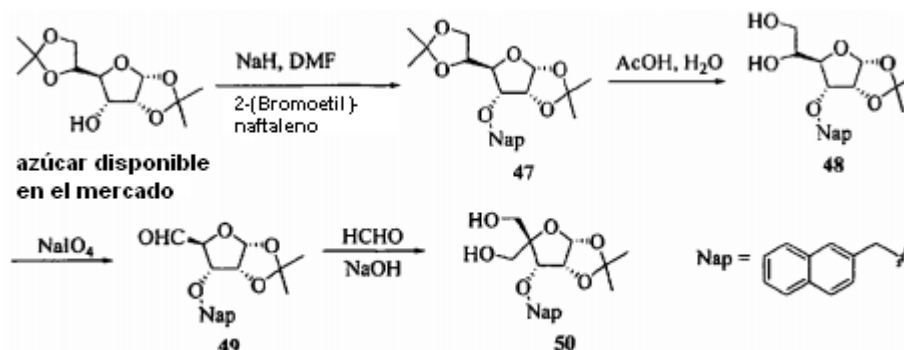
Ejemplo 6

Preparación de los Compuestos 41-46 (Esquema 6)



R_c es -(CR_dR_e)_n en el que cada grupo R_d y R_e es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o un grupo sustituyente o R_d y R_e juntos son un doble enlace O o S, n es de 1 a aproximadamente 4 cada grupo L es independientemente, Br, I o un grupo saliente.

Ejemplo 7

Preparación de 3-O-Naftilmetil-4-(hidroximetil)-1,2-O-isopropilideno- α -D-eritro-pentofuranosa (Compuesto 50, Esquema 7)**5 A) Compuesto 47**

Azúcar disponible en el mercado 1,2:5,6-Di-O-isopropiliden- α -D-alofuranosa (135 g, 519,0 mmol, disponible en el mercado de Pfanstiehl Laboratories, Inc.; oder # D-126). Se disolvieron el azúcar disponible en el mercado 2 (135 g, 519,0 mmol) y 2-(bromometil)-naftaleno (126 g, 570,0 mmol) en DMF (500 ml) en un matraz de tres cuellos (500 ml) y se enfrió la reacción en un baño de hielo. El hidruro sódico (60% p/p, 29 g, 727,0 mmol) se añadió con cuidado (porciones de 6 g cada 10 minutos) a la reacción y la agitación continuó durante otros 60 minutos después de que la adición fuera completa. En este momento, el análisis TLC no mostró más azúcar de partida 2. La reacción se vertió con cuidado en hielo picado (aproximadamente 500 g) y la suspensión resultante se agitó vigorosamente hasta que todo hielo se derritió. El sólido resultante blanquecino se recogió por filtración y se suspendió en agua. La suspensión se agitó vigorosamente usando un agitador mecánico durante 30 minutos tras los cuales se recogió el sólido por filtración y se suspendió en hexanos. La suspensión se agitó vigorosamente durante 30 minutos tras los cuales se recogió el sólido por filtración y se secó al aire durante 4-6 horas y después se secó a alto vacío sobre P₂O₅ durante 16 horas para proporcionar el Compuesto 47 (206,0 g, 99%) en forma de un sólido de color blanquecino.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 7,85 (m, 4H), 7,48 (m, 3H), 5,74 (s, 1 H), 4,92 (d, 1H, J = 11,7), 4,75 (d, 1H, J = 11,6), 4,58 (m, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,03-3,86 (m, 3H), 1,61 (s, 3H), 1,36 (s, 9H).

B) Compuesto 48

El compuesto 47 (200,0 g, 0,5 moles) se añadió en porciones pequeñas a una disolución de ácido acético (2,2 l) y agua (740 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h tras lo cual, el análisis TLC (EtOAc/hexanos al 30%) indicó el consumo completo del Compuesto 47. La reacción se concentró después a presión reducida hasta que se eliminó la mayor parte de ácido acético. La disolución restante se vertió en una mezcla agitada de EtOAc (1 l) y agua (1 l). Después se añadió KOH sólido a la mezcla anterior hasta que la fase acuosa fue fuertemente alcalina (pH>12). La fase orgánica se separó después, se lavó con una disolución saturada de bicarbonato sódico y salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar en Compuesto 48 en forma de una espuma de color amarillo, que se usó sin purificación adicional.

30 C) Compuesto 49

Se añadió una disolución de NaIO₄ (107,0 g) en agua (3 l) más de 40 minutos a una disolución agitada (agitador mecánico) del Compuesto 48 (compuesto en bruto de la Etapa B, mencionada anteriormente) en dioxano (1,5 l). Después de 60 minutos, la mezcla de reacción se vertió en EtOAc (1,5 l) y la fase orgánica se separó, se lavó con agua (1 l) y salmuera (1 l), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar en Compuesto 49 en forma de un aceite de color amarillo, que se usó sin purificación adicional.

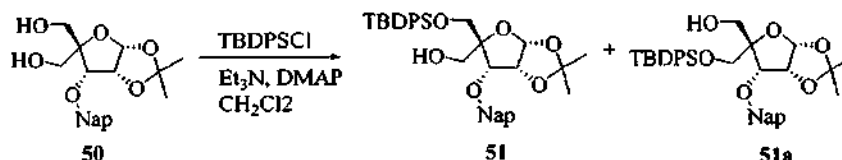
D) Compuesto 50

El Compuesto 49 (compuesto en bruto a partir del mencionado anteriormente) se disolvió en una mezcla de THF (500) y agua (500 ml) y la reacción se enfrió en un baño de hielo. Se añadieron a la reacción NaOH 2N (600 ml) y formaldehído (250 ml de una solución acuosa al 37%) y la agitación se continuó a temperatura ambiente durante 3 días. La reacción se vertió después en EtOAc(1 l) y se lavó con agua (1 l) y salmuera (1 l) y se evaporó a presión reducida hasta que quedaron aproximadamente 200 ml de EtOAc (se formó en el procedimiento un precipitado blanco). Se añadieron hexanos (300 ml) al precipitado y la mezcla se dejó en reposo durante 16 horas tras las cuales se recogió el sólido blanco por filtración, se lavó con hexanos y se secó a alto vacío sobre P₂O₅ para proporcionar Compuesto 50 en forma de un sólido de color blanco (124 g, 66% a partir del Compuesto 47).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,85 (m, 4H), 7,48 (m, 3H), 5,75 (d, 1H, $J = 3,9$), 4,96 (d, 1H, $J = 11,8$), 4,75 (d, 1H, $J = 11,8$), 4,66 (m, 1H), 4,26 (d, 1H, $J = 52$), 3,95 (m, 2H), 3,79 (m, 1H), 3,63 (m, 1H), 2,39 (m, 1H, OH), 1,66 (s, 3H), 1,34 (s, 3H).

Ejemplo 8

5 Preparación del Compuesto 51 (Esquema 8)



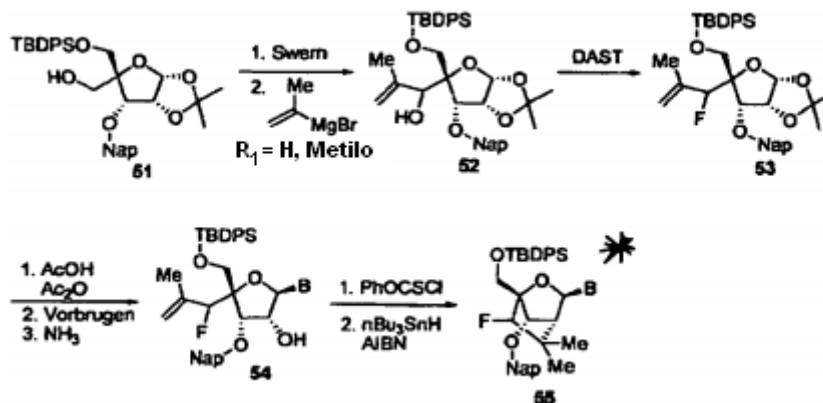
A) Preparación del Compuesto 51

Se añadió *tert*-Butildifenilclorosilano (305,0 mmol, 84,0 ml) a una disolución fría en agitación (0 °C) de diol, Compuesto 50 (278,0 mmol, 100,0 g) y trietilamina (305 mmol, 43,0 ml) en diclorometano (600 ml). Después de completar la adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente se continuó la agitación durante 16 horas. Se añadió MeOH (50 ml) a la reacción (para inactivar el exceso de TBDPSCI) y se continuó la agitación durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Después, la reacción se diluyó con cloroformo y la fase orgánica se lavó con HCl al 10%, NaHCO_3 saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró para proporcionar un aceite espeso. Se añadieron hexanos (150 ml) al aceite y la mezcla se sonicó hasta obtener una disolución. La disolución ahora se sembró con una pequeña cantidad de Compuesto 51 (previamente aislado por cromatografía en columna). Después de 16 horas de reposo se añadieron hexanos adicionales al lodo espeso y se recogió el sólido por filtración. El sólido después se volvió a suspender en hexanos y se agitó vigorosamente durante 30 minutos. El sólido se recogió por filtración para proporcionar el Compuesto 51 (80,5 g, 48%) tras secarlo a alto vacío durante 16 horas. Los filtrados se combinaron y se concentraron a presión reducida. El aceite resultante se disolvió de nuevo en una cantidad de hexanos mínima y se pasó a través de un lecho de gel de sílice (eluyendo con EtOAc en hexanos al 20%). Se combinaron las fracciones que contenían el Compuesto 51, se concentraron y se cristalizaron como se ha descrito anteriormente para proporcionar un segundo cultivo del Compuesto 51 (20 g, 12%) en forma de un sólido de color blanco. La elución adicional del lecho del gel de sílice con EtOAc en hexanos al 50% proporcionó el compuesto 51a puro (40,0 g, 24%) en forma de un aceite espeso. Además, una mezcla del Compuesto 51 y del Compuesto 51a (aproximadamente 15 g, 9%) también se aisló en forma de un aceite espeso.

Compuesto 51; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,83 (m, 4H), 7,56 (m, 7H), 7,30 (m, 6H), 5,80 (s, 1H), 4,97 (d, 1H, $J = 11,4$), 4,70 (m, 2H), 4,46 (m, 1H), 3,92-3,66 (m, 4H), 2,39 (m, 1H, OH), 1,67 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 0,92 (s, 9H). Diol 7; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,9-7,3 (m, 17H), 5,71 (d, 1H, $J = 3,9$), 4,86 (d, 1H, $J = 12,2$), 4,74 (d, 1H, $J = 12,2$), 4,56 (m, 1H), 4,22 (d, 1H, $J = 11,1$), 4,18 (m, 1H), 4,07 (d, 1H, $J = 11,1$), 4,02 (dd, 1H, $J = 4,2, 12,0$), 3,64 (dd, 1H, $J = 9,4, 11,9$), 1,89 (m, 1H), 1,25 (s, 6H), 1,05 (s, 9H).

Ejemplo 9

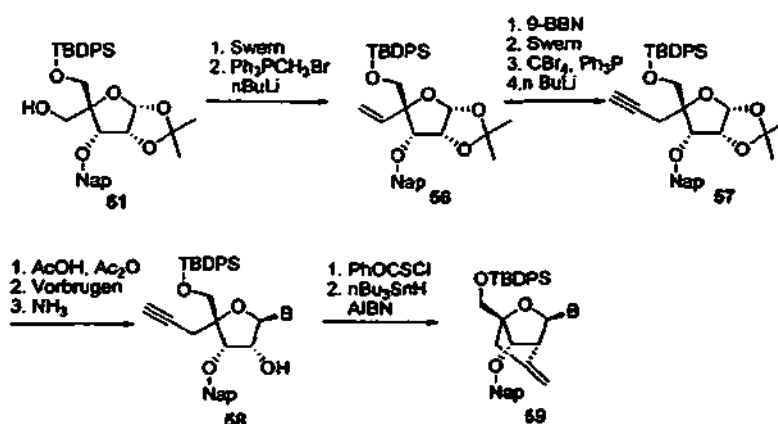
Preparación del Compuesto 55 (Esquema 9)



El Compuesto 51 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 8.

Ejemplo 10

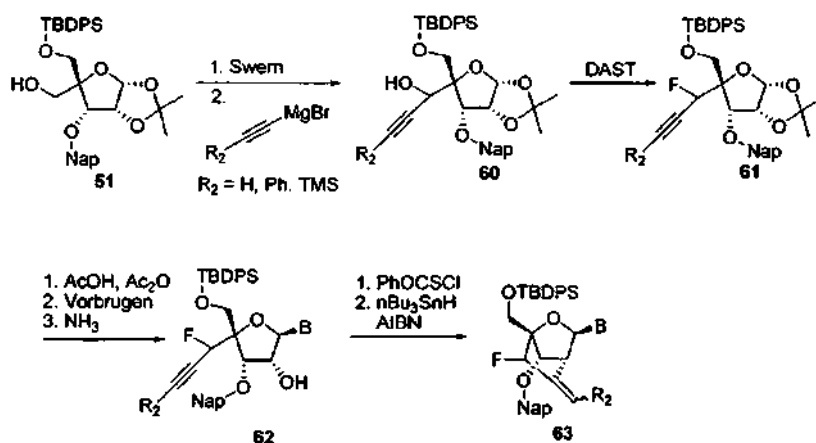
Preparación del Compuesto 59 (Esquema 10)



El Compuesto 51 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 8.

5 Ejemplo 11

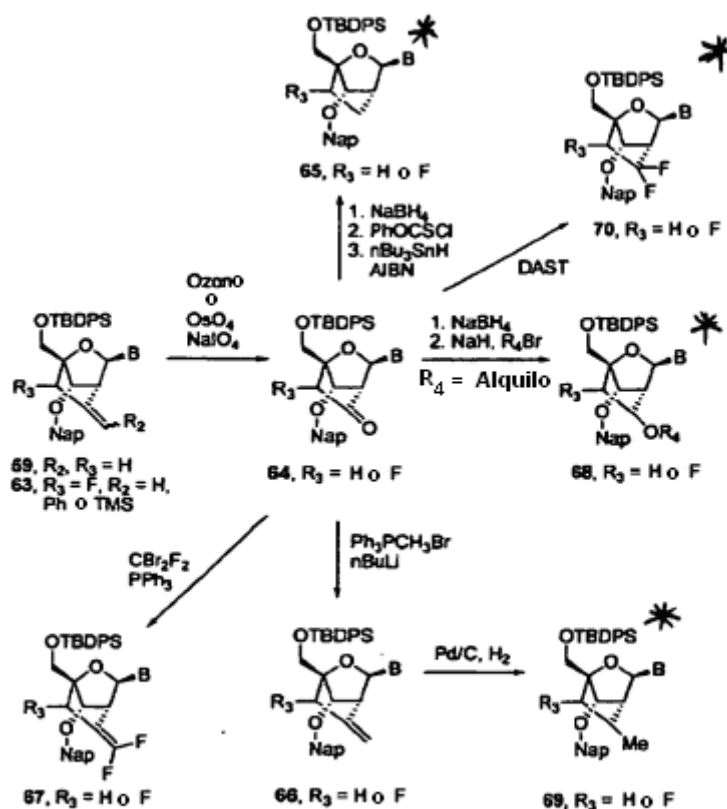
Preparación del Compuesto 63 (Esquema 11)



El Compuesto 51 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 8.

Ejemplo 12

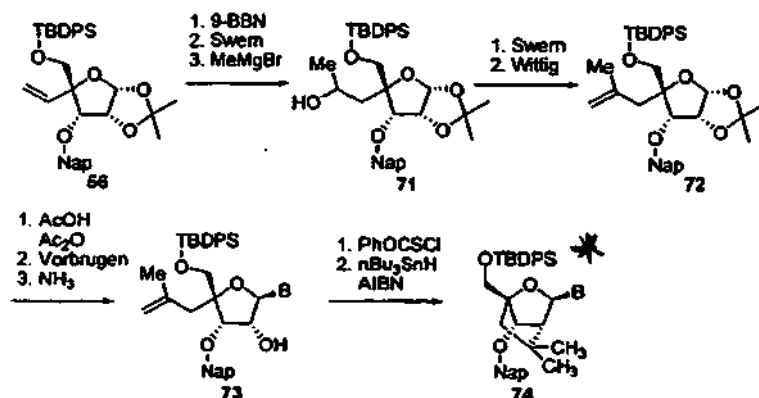
10 Preparación de los Compuestos 65-70 (Esquema 12)



Los Compuestos 59 y 63 se preparan siguiendo los procedimientos ilustrados en los ejemplos 10 y 11 respectivamente.

Ejemplo 13

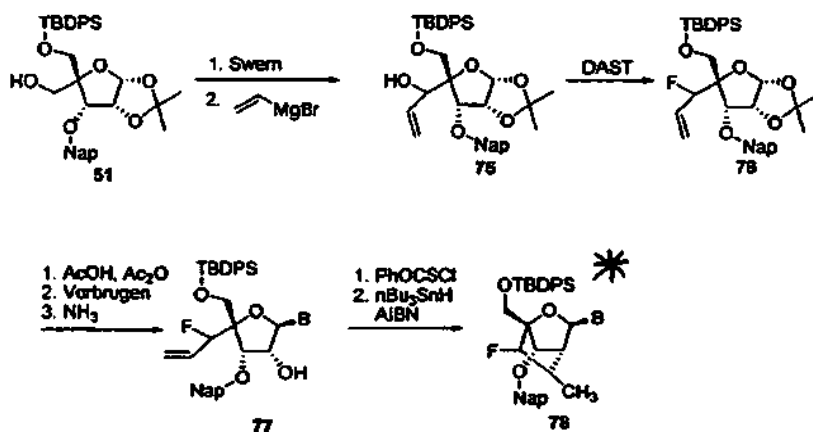
5 Preparación del Compuesto 74 (Esquema 13)



El Compuesto 56 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 10.

Ejemplo 14

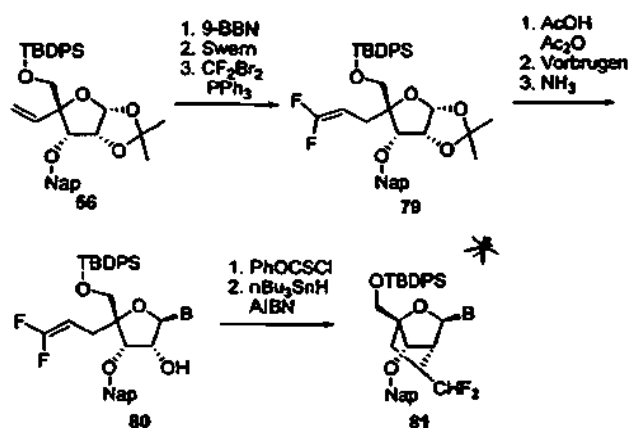
Preparación del Compuesto 78 (Esquema 14)



El Compuesto 51 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 8.

Ejemplo 15

Preparación del Compuesto 81 (Esquema 15)

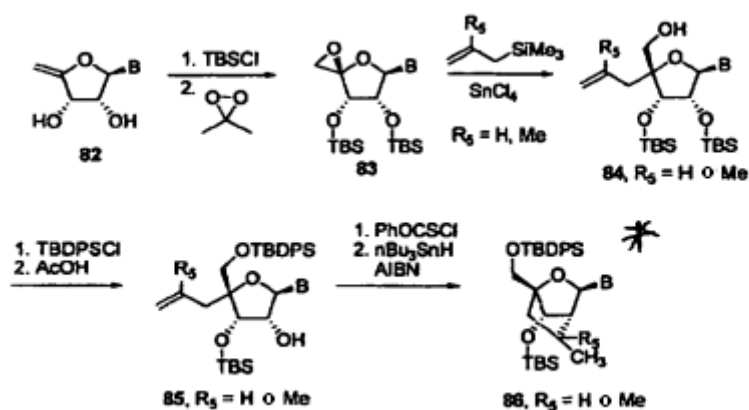


5

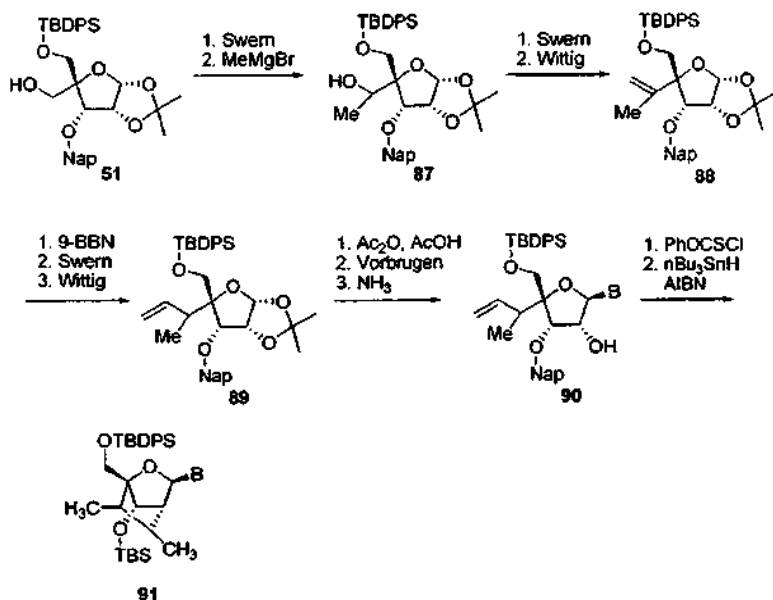
El Compuesto 56 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 10.

Ejemplos 16

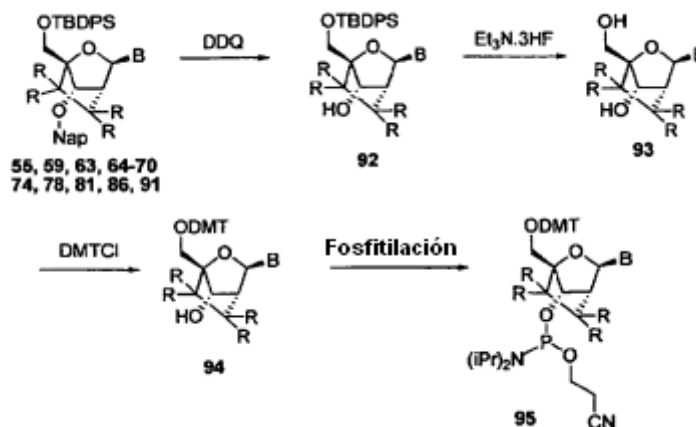
Preparación del Compuesto 86 (Esquema 16)



10 El Compuesto 82 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en Bio-Org. Med. Chem. Lett, 2007, 17, 2570.

Ejemplo 17**Preparación del Compuesto 91 (Esquema 17)**

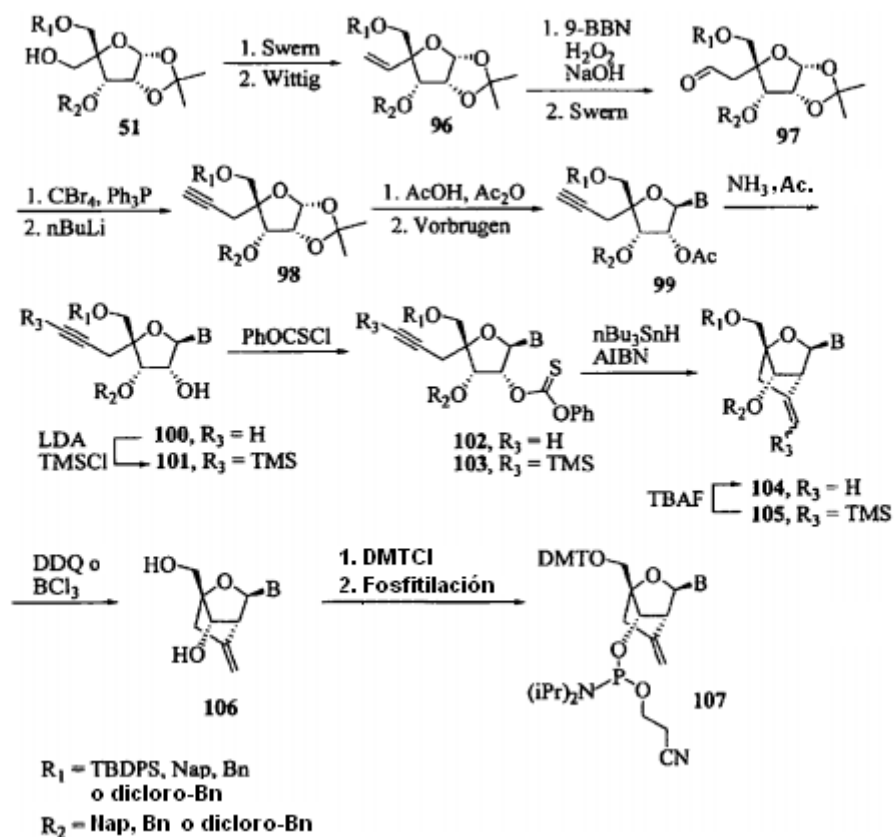
- 5 El Compuesto 51 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 8.

Ejemplo 18**Preparación de diversos Compuestos representados mediante el Compuesto 95 (Esquema 18)**

- 10 Los compuestos 55, 59, 63, 64-70, 74, 78, 81, 86, 91 y 56 se preparan de acuerdo con los procedimientos ilustrados en los ejemplos 9-17 respectivamente. La fosforamidita final puede incorporar independientemente diversos grupos R en las posiciones indicadas 4. Es posible una amplia diversidad de sustituciones en el puente carbocíclico siguiendo los procedimientos ilustrados en los ejemplos 9-17.

Ejemplo 19

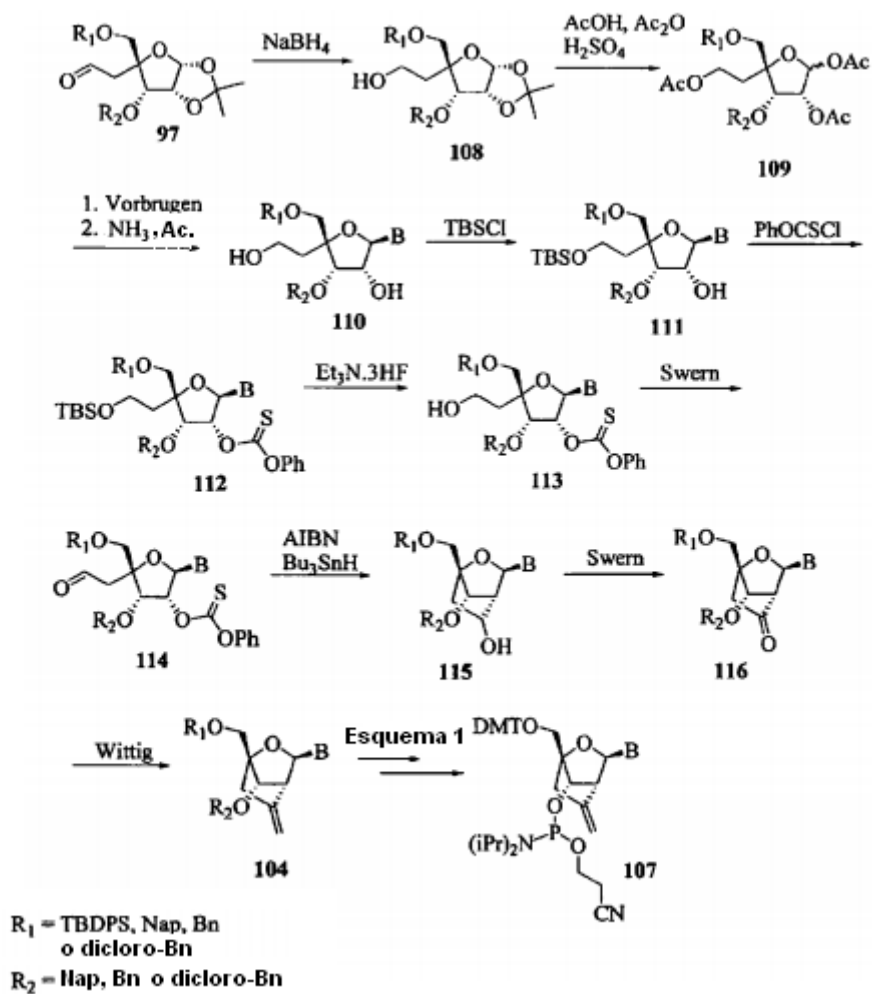
- 15 **Preparación de 5-metenil DMT fosforamidita BNA, (1R,3R,4R,7S)-7-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(nucleobase, pirimidin-1-ilo o purin-9-ilo)-5-metencil-2-oxa-biciclo[2,2,1]heptano (Compuesto 107, Esquema 19)**



El Compuesto 51 se puede preparar de acuerdo con los procedimientos ilustrados en los ejemplos 7 y 8 con R_1 TBDPS y R_2 como naftilo. Se pueden preparar fácilmente grupos alternativos para R_1 y R_2 usando grupos alternativos protectores.

5 Ejemplo 20

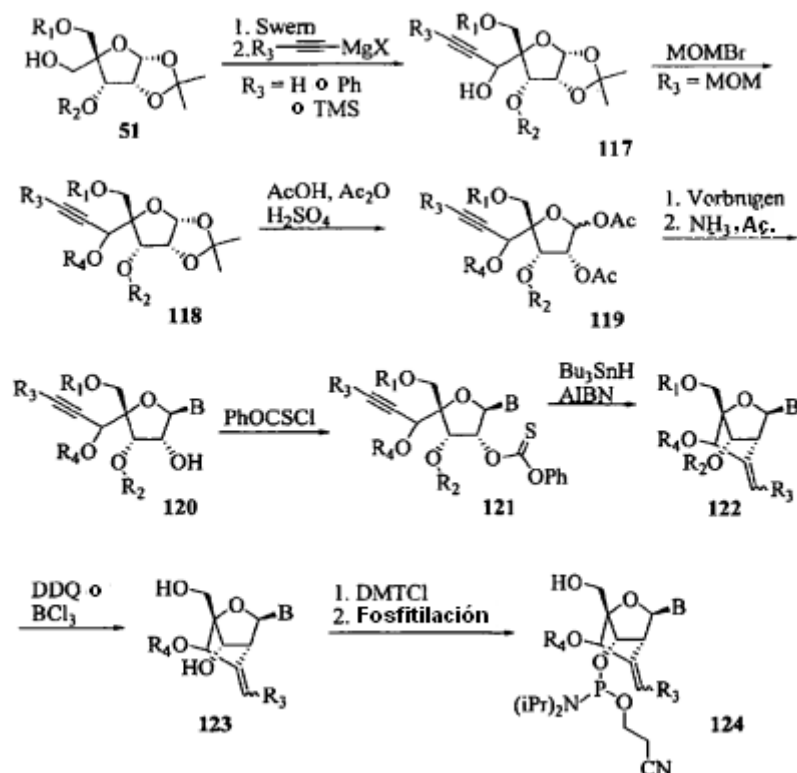
Ruta alternativa para la preparación del Compuesto 107 (Esquema 20)



El Compuesto 97 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 19.

Ejemplo 21

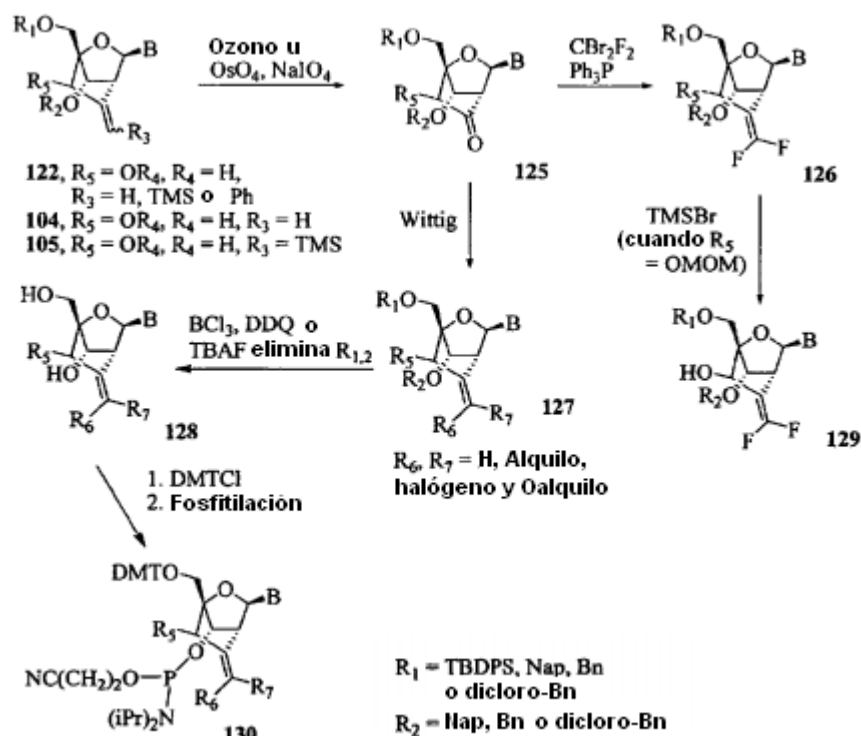
Preparación del Compuesto 124 (Esquema 21)



El Compuesto 51 se puede preparar de acuerdo con los procedimientos ilustrados en los ejemplos 7 y 8 con R₁ TBDPS y R₂ como naftilo. Se pueden preparar fácilmente grupos alternativos para R₁ y R₂ usando grupos protectores alternativos.

5 Ejemplo 22

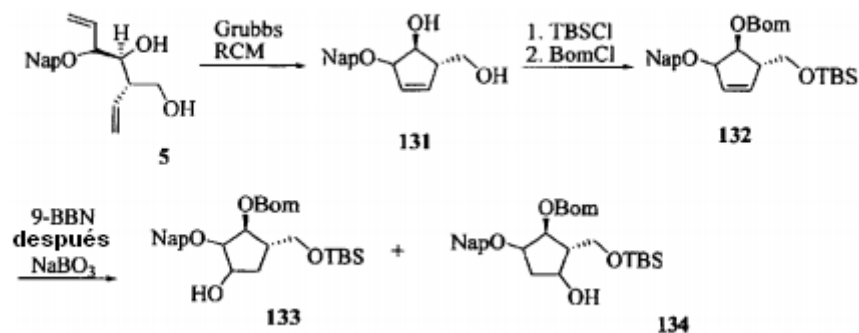
Preparación de los Compuestos 129 y 130 (Esquema 22)



Los compuestos 122, 104 y 105 se preparan de acuerdo con los procedimientos ilustrados en los ejemplos 19 y 20.

Ejemplo 23

Preparación del Compuesto 134 (Esquema 23)

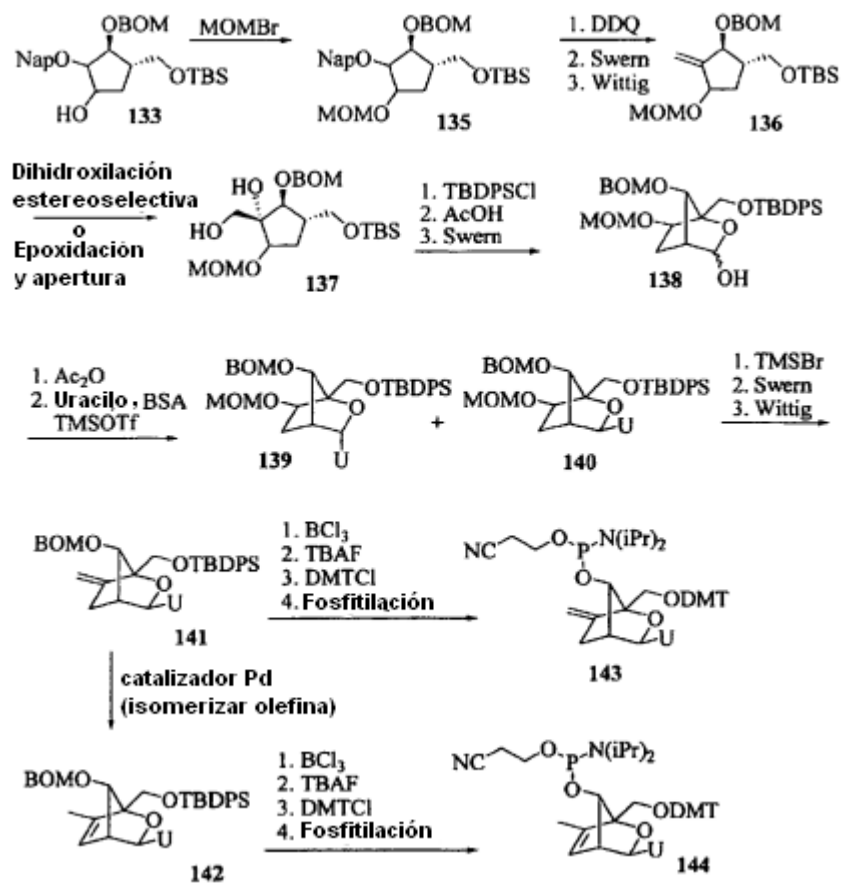


5

El Compuesto 5 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 1.

Ejemplo 24

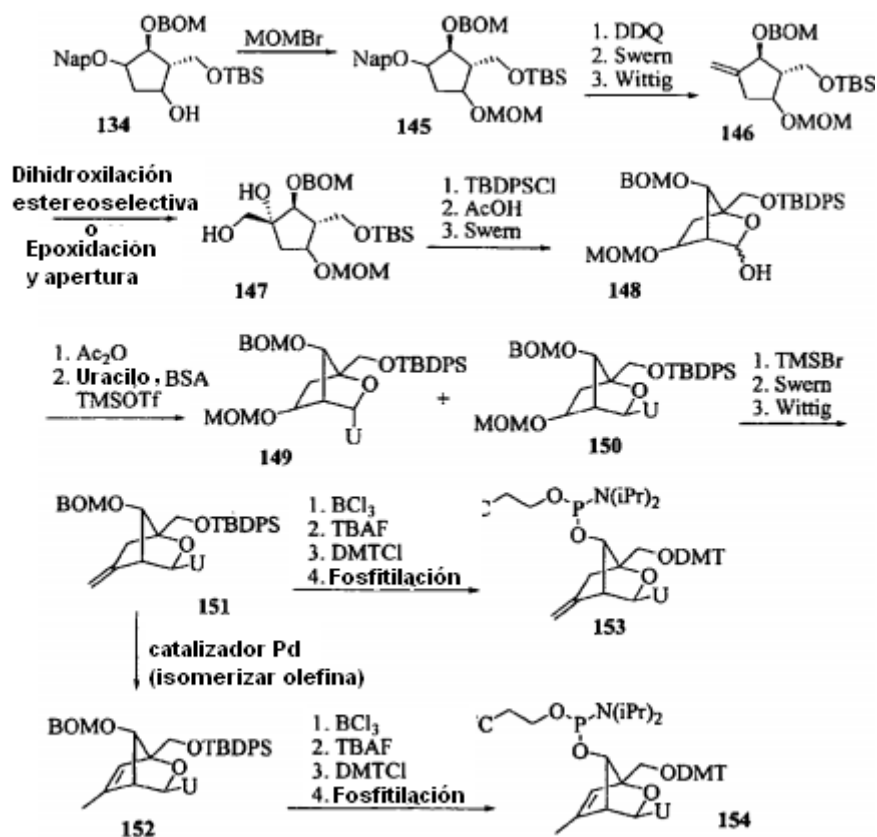
Preparación de los Compuestos 143 y 144 (Esquema 24)



El Compuesto 133 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el ejemplo 23.

Ejemplo 25

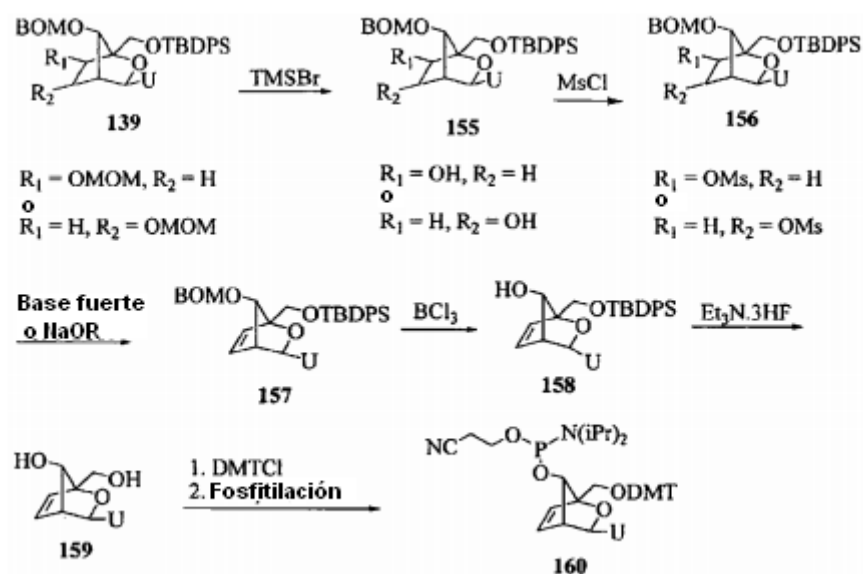
Preparación de los Compuestos 153 y 154 (Esquema 25)



El Compuesto 134 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el ejemplo 23.

Ejemplo 26

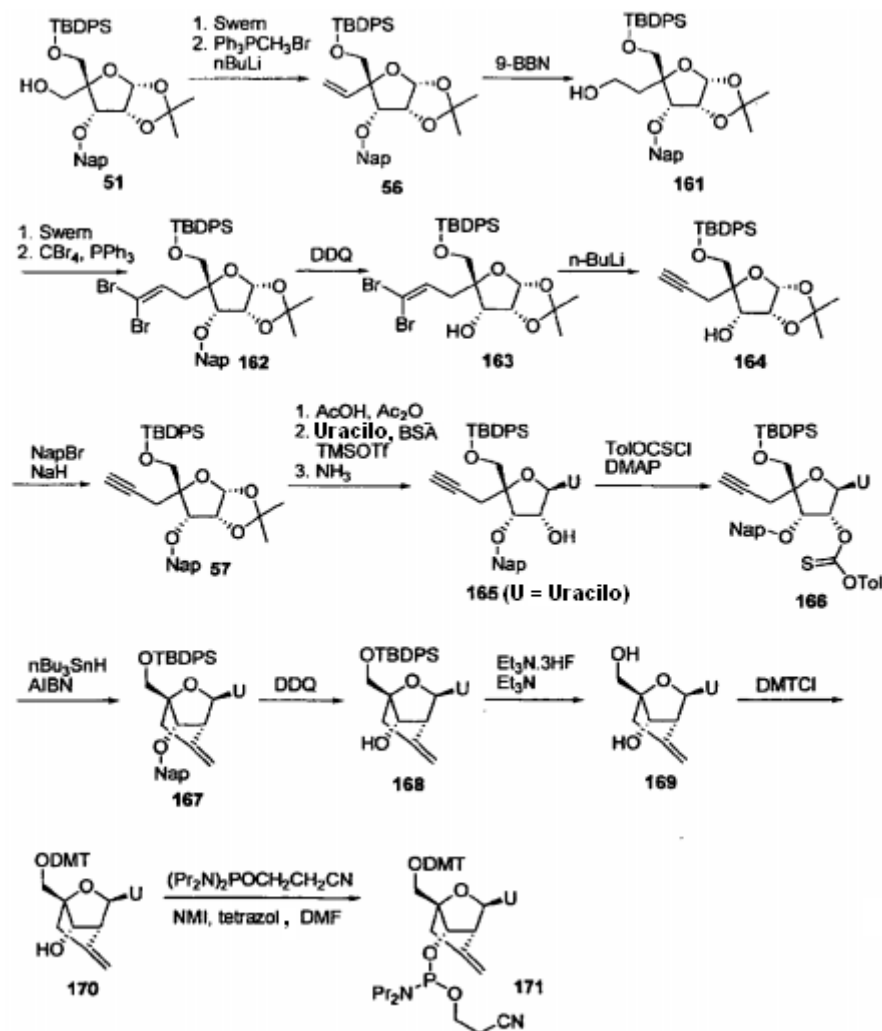
Preparación del Compuesto 160 (Esquema 26)



El Compuesto 139 se prepara de acuerdo con los procedimientos ilustrados en el ejemplo 24.

Ejemplo 27

Preparación de (1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-5-metilen-2-oxabicyclo[2,2,1]heptano (Compuesto 171, Esquema 27)



5 A) Compuesto 56

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (188 mmol, 13,3 ml) a una disolución fría (-78°C) de cloruro de oxalilo (94 mmol, 8,2 ml) en diclorometano (600 ml). Después de agitar durante 30 minutos, se añadió a la reacción una disolución del alcohol 51 (67 mmol, 40,0 g) en diclorometano (100 ml) mediante una cánula y se continuó la agitación durante otros 45 minutos a -78°C . Se añadió trietilamina (281 mmol, 39,0 ml) y se retiró la reacción del baño de refrigeración y se continuó la agitación durante otros 30 minutos. Después la reacción se diluyó con diclorometano y se lavó secuencialmente con HCl al 5%, NaHCO_3 saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró para proporcionar el aldehído correspondiente que se usó en la siguiente etapa ninguna purificación.

Se añadió $n\text{BuLi}$ (84 mmol, 33,5 ml de una disolución 2,5 M) a una disolución fría (0°C) de bromuro de metiltrifenilfosfonio (84 mmol, 29,9 g) en THF (600 ml). Después de agitar durante 2 horas en el baño de hielo, la disolución de color rojo oscuro se enfrió a -78°C y se añadió desde arriba una disolución del aldehído en bruto en THF (70 ml) se añadió a la reacción durante 20 minutos. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente gradualmente y se agitó durante 16 horas. Se añadió cloruro de amonio saturado a la reacción y se evaporó aproximadamente el 80% del THF a presión reducida. El aceite resultante se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El material en bruto se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con hexanos a acetato de etilo en hexanos al 20%) para proporcionar el compuesto 56 (36,4 g, 92% en dos etapas) en forma de un aceite.

B) Compuesto 161

Se añadió una disolución del compuesto 56 (57,5 mmol, 34,2 g) en THF (40 ml) a una disolución de 9-BBN (0,5 M en THF, 172 mmol, 345 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se inactivó cuidadosamente con EtOH. Se añadió a la reacción una suspensión de perborato sódico tetrahidrato (340 mmol, 53,0 g) en etanol (340 ml) y agua (340 ml) y la mezcla se calentó a 50 °C durante 4 horas. Se evaporó aproximadamente el 80% del disolvente a presión reducida y el residuo se suspendió en acetato de etilo y se lavó secuencialmente con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 10 al 30%) para proporcionar el Compuesto 161 (27,7 g, 76%) en forma de un aceite.

C) Compuesto 162

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (68,6 mmol, 4,9 ml) a una disolución fría (-78 °C) de cloruro de oxalilo (34,3 mmol, 3,0 ml) en diclorometano (170 ml). Después de agitar durante 30 minutos, se añadió a la reacción una disolución de alcohol, Compuesto 161 (22,9 mmol, 14,0 g) en diclorometano (50 ml) mediante una canula y se continuó la agitación durante otros 45 minutos a -78 °C se añadió trietilamina (102,9 mmol, 14,4 ml) y la reacción se retiró del baño de refrigeración y se continuó la agitación durante otros 30 minutos. Después la reacción se diluyó con diclorometano y se lavó secuencialmente con HCl al 5%, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el aldehído correspondiente que se usó en la siguiente etapa sin purificación alguna.

Se añadió una disolución de trifenilfosfina (91,3 mmol, 24,0 g) en diclorometano (50 ml) a una disolución fría (0 °C) de tetrabromuro de carbono (45,6 mmol, 15,0 g) en diclorometano (200 ml). Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se enfrió a -78 °C y se añadió la reacción una disolución del aldehído en bruto (57,5 mmol) en diclorometano (40 ml). Después de agitar a -78 °C durante 2 horas, la reacción se interrumpió con una disolución saturada de bicarbonato sódico y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con hexanos a acetato de etilo en hexanos al 15%) proporcionó una olefina, Compuesto 162 (14,1 g, 81% a partir de 56a).

D) Compuesto 163

Se añadió DDQ (31,3 mmol, 7,1 g) a una disolución del Compuesto 162 (15,7 mmol, 12,0 g) en diclorometano (150 ml) y agua (7,5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo se disolvió de nuevo en acetato de etilo. La fase orgánica lavó después con agua, bisulfito sódico al 10%, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, acetato de etilo en hexanos del 10 al 20%) proporcionó el Compuesto 163 (equitativo).

E) Compuesto 164

Se añadió nBuLi (75 mmol, 30 ml de una disolución 2,5 M en hexanos) a una disolución fría (-78 °C) del Compuesto 163 (15 mmol) en THF (150 ml). Después de agitar a -78 °C durante 30 minutos, la reacción se interrumpió usando cloruro de amonio saturado y se diluyó con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó después secuencialmente con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el Compuesto 164 (7,3 g, cuantitativo).

F) Compuesto 57

Se añadió hidruro sódico en porciones (18,5 mmol, 0,74 g, en aceite mineral al 60%) a una disolución fría (0 °C) del Compuesto 164 (14,8 mmol, 7,3 g) y 2-bromometil-naftaleno (18,5 mmol, 4,1 g) en DMF (100 ml). Después de agitar durante 1 hora, se añadió a la reacción una porción adicional de hidruro sódico (0,35 g) y la agitación se continuó durante otras 3 horas a temperatura ambiente. Después, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se inactivó cuidadosamente con cloruro de amonio saturado y después se diluyó con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó secuencialmente con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 10 al 15%) proporcionó el Compuesto 57 (7,6 g, 81%).

G) Compuesto 165

Se añadió ácido sulfúrico concentrado (2 gotas) a una disolución del Compuesto 57 (12,0 mmol, 7,5 g) en ácido acético (36 ml) y anhídrido acético (7 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos, la reacción se concentró a presión reducida y el residuo se diluyó con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua, bicarbonato sódico saturado (hasta que los lavados son de pH>10) y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el bis-acetato que se usó en la siguiente etapa sin purificación alguna.

Se añadió *N,O*-bis-trimetilsilil-acetamida (60,0 mmol, 14,8 ml) a una suspensión de uracilo (24 mmol, 2,7 g) y de Compuesto 58a (12,0 mmol, desde arriba) en acetonitrilo (60 ml). La suspensión se calentó hasta que sucedió la disolución tras lo cual, ésta se enfrió en un baño de hielo. Se añadió gota a gota TMSOTf (18,0 mmol, 3,3 ml) a la reacción y la reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. Después, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se

inactivó cuidadosamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico. La reacción después se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró para proporcionar el nucleósido en bruto que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 5 El nucleósido en bruto (12,0 mmol) obtenido a partir de lo expuesto anteriormente, se disolvió en una disolución de amoníaco en metanol (7 N, 36 ml). Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, la reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 35 al 50%) para proporcionar el Compuesto 165 (5,9 g, 72% a partir del compuesto 57).

H) Compuesto 166

- 10 Se añadió clorotionoformiato de toluilo (1,5 ml, 9,9 mmol) se añadió gota a gota a una disolución fría (0 °C) del Compuesto 165 (8,9 mmol, 5,9 g) y dimetilaminopiridina (19,7 mmol, 2,4 g) en acetonitrilo (90 ml). Después de agitar durante 1 hora, la reacción se interrumpió con metanol. Se evaporó aproximadamente el 50% del disolvente a presión reducida y la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con HCl al 5%, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 30 al 40%) proporcionó el Compuesto 166 (6,3 g, 86%).

I) Compuesto 167

- 15 Se calentó a reflujo una disolución del Compuesto 166 (7,7 mmol, 6,2 g) en tolueno (230 ml) durante 30 minutos. Se añadió gota a gota una disolución de nBu_3SnH (15,4 mmol, 4,1 ml) en tolueno (36 ml) a la reacción calentada a reflujo. Después de añadir aproximadamente la mitad (18 ml) de la disolución de nBu_3SnH a la reacción (30 minutos), se añadió gota a gota a la reacción una disolución de AIBN (15,4 mmol, 2,5 g) en tolueno (40 ml) más de 20 90 minutos. Después de calentar a reflujo durante otras 2 horas, la reacción se enfrió y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se diluyó con éter y se lavó con una disolución de KF saturada y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 25 al 40%) proporcionó el Compuesto 167 (3,3 g).

J) Compuesto 168

- 25 Se añadió DDQ (9,3 mmol, 2,1 g) a una disolución del Compuesto 167 (4,7 mmol, 3,0 g) en diclorometano (47 ml) y agua (2,5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se concentró a presión reducida y se volvió a disolver en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua, bisulfito sódico al 10%, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación del residuo por 30 cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 30 al 60%) proporcionó el Compuesto 168 (1,46 g, 62%).

K) Compuesto 169

- 35 Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (0,94 ml, 5,8 mmol) a una disolución del Compuesto 168 (2,9 mmol, 1,45 g) en THF (20 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, se añadió a la reacción una cantidad adicional de trihidrofluoruro de trietilamina (0,9 ml). Después de agitar durante 40 horas, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con metanol en cloroformo del 5 al 10%) proporcionando el nucleósido, Compuesto 169 (0,53 g, 69%).
 RMN^1H (300 MHz, MeOD) δ = 8,08 - 7,88 (m, 1 H), 5,67 - 5,47 (m, 1 H), 5,38 - 5,25 (m, 1 H), 5,25 - 5,15 (m, 1 H), 5,06 - 4,93 (m, 1 H), 4,13 - 3,94 (m, 1 H), 3,88 - 3,67 (m, 2 H), 3,30 - 3,15 (m, 2 H), 3,10 - 2,95 (m, 1 H), 2,52 - 2,30 (m, 1 H), 2,16 (ninguno, 1 H)

L) Compuesto 170

- 40 Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (3,0 mmol, 1,0 g) a una disolución del Compuesto 169 (2,5 mmol, 0,67 g) en piridina (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se interrumpió con metanol y la piridina se retiró a presión reducida. El aceite residual se disolvió en acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel 45 de sílice, eluyendo con de acetato de etilo en hexanos al 70% con trietilamina al 1%) proporcionó el Compuesto 170 (1,36 g).

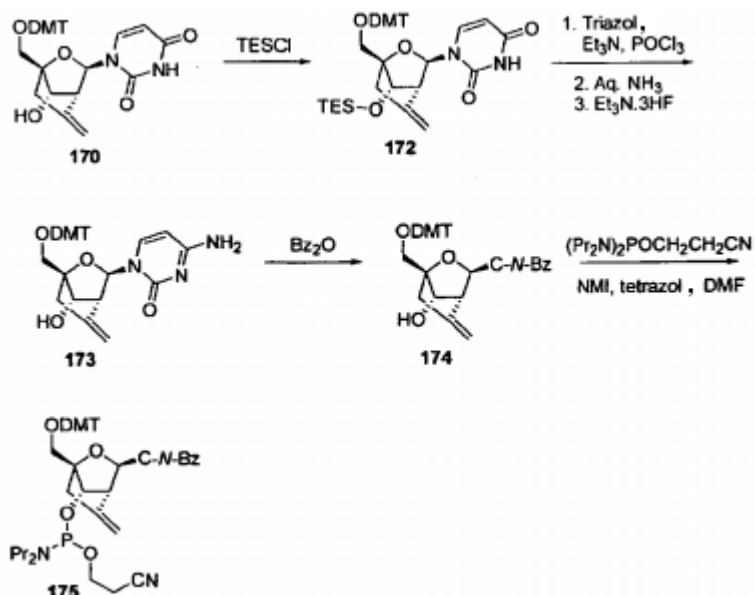
M) Compuesto 171

- 50 Se añadió (iPr_2N) $_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (1,7 mmol, 0,53 ml) a una disolución del Compuesto 170 (1,1 mmol, 0,63 g), NMI (0,28 mmol, 0,022 g) y tetrazol (0,88 mmol, 0,062 g) en DMF (3,0 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 50 al 60%) proporcionó el Compuesto 171 (0,79 g).

^{31}RMN (300 MHz, CDCl_3) δ = 149,2, 148,6,

Ejemplo 28

Preparación de (1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(citosin-1-il)-5-metilen-2-oxa-biciclo[2,2,]heptano (Compuesto 175, Esquema 28)

**5 A) Compuesto 172**

Se añadió cloruro de trietilsililo (2,7 mmol, 0,29 ml) a una disolución del Compuesto 170 (0,05 mmol, 0,3 g) e imidazol (3,4 mmol, 0,23 g) en DMF (1 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos al 40%) proporcionó el Compuesto 172 (0,23 g).

B) Compuesto 173

Se añadió oxiclорuro de fósforo (2,7 mmol, 0,25 ml) a una suspensión fría de 1,2,4-triazol (11,5 mmol, 0,8 g) en acetonitrilo (10 ml). Después de agitar durante 15 minutos, se añadió trietilamina (13,5 mmol, 1,9 ml) a la reacción y la suspensión blanca on se agitó durante otros 30 minutos. Se añadió una disolución del Compuesto 172 (0,34 mmol, 0,23 g) en acetonitrilo (5 ml) a la reacción se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 5 horas. Después, la reacción se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró y el material en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación alguna.

Se añadió amoníaco acuoso (0,2 ml) a una disolución del material en bruto obtenido anteriormente en dioxano (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas, la reacción se evaporó a sequedad y el residuo se secó para proporcionar el nucleósido citosina.

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (1,7 mmol, 0,27 ml) a una disolución del compuesto obtenido anteriormente y trietilamina (0,84 mmol, 0,12 ml) en THF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción después se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con metanol en diclorometano al 10%) proporcionó el Compuesto 173.

C) Compuesto 174

Se añadió anhídrido benzoico (1,7 mmol, 0,37 g) a una disolución del nucleósido citosina (0,82 mmol, 0,47 g) en DMF (1,6 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con metanol en diclorometano al 3%) proporcionó el Compuesto 174 (0,54 g).

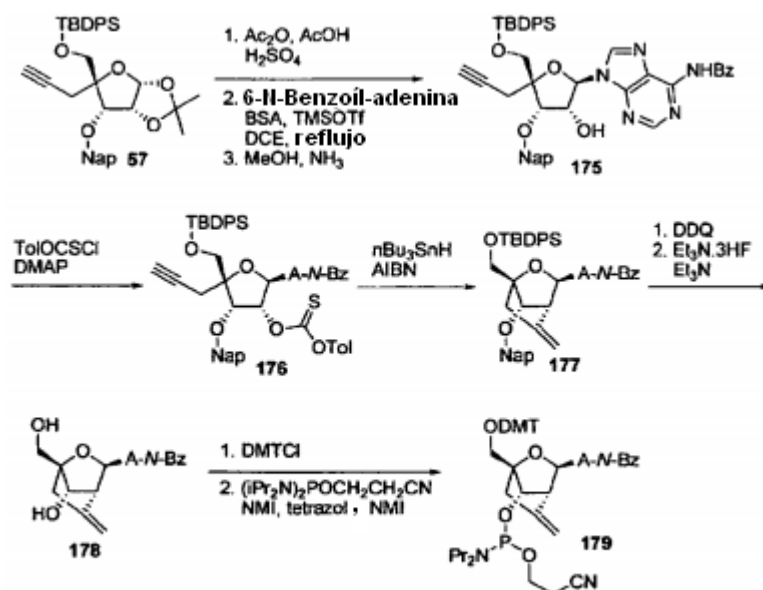
D) Compuesto 175

Se añadió ($i\text{Pr}_2\text{N}_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$) (1,2 mmol, 0,38 ml) a una disolución del Compuesto 174 (0,86 mmol, 0,54 g), NMI (0,21 mmol, 0,016 g) y tetrazol (0,64 mmol, 0,045 g) en DMF (2 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato sódico saturado y salmuera se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 70 al 80%) proporcionó el Compuesto 175 (0,25 g).

RMN^{31}P (300 MHz, CDCl_3) δ = 149,2, 148,8.

Ejemplo 29

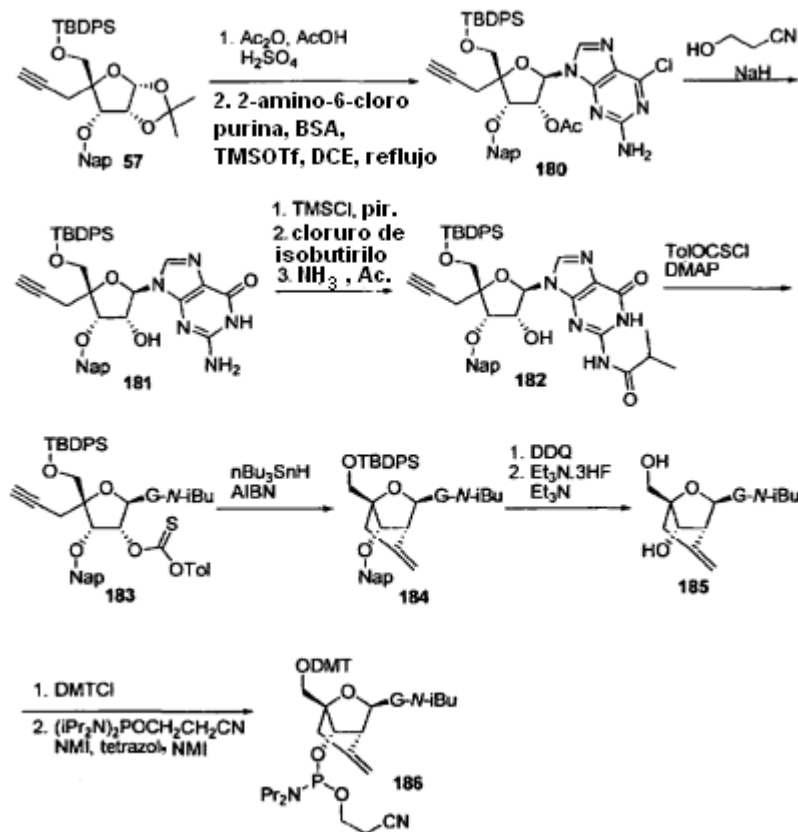
Preparación de (1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-adenin-7-il)-5-metilen-2-oxa-biciclo[2,2,1]heptano (Compuesto 179, Esquema 29)



El Compuesto 179 se prepara a partir del Compuesto 57 usando los procedimientos generales descritos en el Ejemplo 27. La acetólisis de la 1,2-acetonida seguida de una reacción de Vorbrugen con 6-*N*-benzoil-adenina en dicloroetano a reflujo y la eliminación del grupo protector de acetilo en la posición 2'O proporciona el nucleósido deseado, el Compuesto 175. La reacción del grupo hidroxilo en la posición 2' con un reactivo tionoformato seguido de una ciclación radical proporciona el nucleósido, el Compuesto 177. La eliminación de protectores de Naftilo y TBDPS usando DDQ y trihidrofluoruro de trietilamina proporciona el nucleósido, el Compuesto 178. La protección del grupo hidroxilo en la posición 5' y del éter DMT seguido de una reacción de fosfitilación proporciona la fosforamidita, el Compuesto 179.

Ejemplo 30

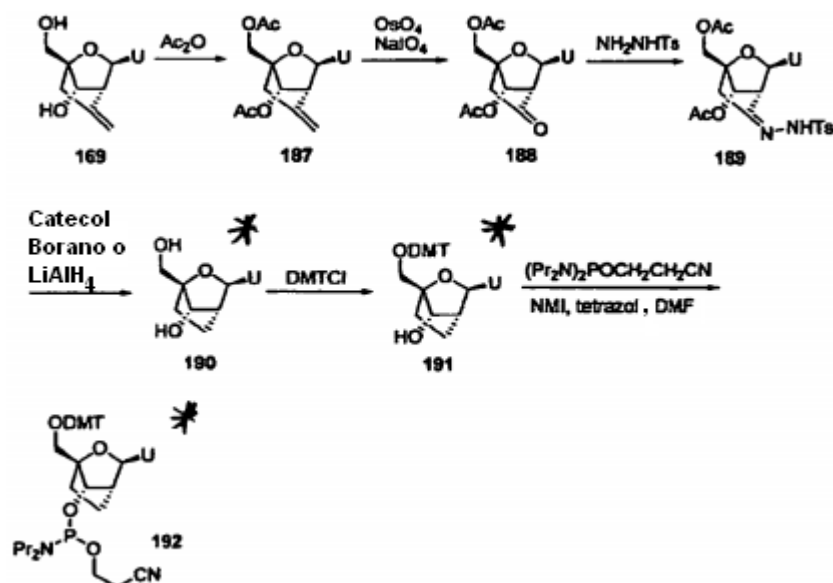
Preparación de (1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-guanin-7-il)-5-metilen-2-oxa-biciclo(2,2,1)heptano (Compuesto 186, Esquema 30)



El Compuesto 186 se prepara a partir del Compuesto 57 usando los procedimientos generales descritos en el Ejemplo 27. La acetólisis de la 1,2-acetonida seguida de una reacción de Vorbrugen con 2-amino-6-cloropurina proporciona un nucleósido, el Compuesto 180. La reacción del compuesto 180 con 3-hidroxipropionitrilo e hidruro sódico proporciona el nucleósido 181 desprotegido. La reacción del grupo hidroxilo en la posición 2' con un reactivo tionoformiato seguido de una ciclación radical proporciona el nucleósido 184. La eliminación de protectores de Naftilo y TBDPS usando DDQ y trihidrofluoruro de trietilamina proporciona el nucleósido 185. La protección del grupo hidroxilo en la posición 5' como el éter DMT seguido de una reacción de fosfitilación proporciona la fosforamidita, el Compuesto 186.

10 Ejemplo 31

Preparación de (1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il) 2-oxa-biciclo[2,2,1]heptano (Compuesto 192, Esquema 31)



A) Compuesto 187

Se añadió anhídrido acético (7,8 mmol, 0,73 ml) a una disolución del Compuesto 169 (1,9 mmol, 0,51 g, ejemplo 27) en piridina (4 ml). Después de agitación a temperatura ambiente durante 20 horas, el disolvente se retiró y se añadió acetato de etilo (unas pocas gotas) al aceite. El sólido de color blanco que se formó se recogió y se secó para proporcionar el Compuesto 187 (0,6 g, 90%).

B) Compuesto 188

Se añadió tetróxido de osmio (0,08 ml de disolución en iPrOH al 25% p/p) a una disolución del Compuesto 187 (0,04 g) y peryodato sódico (0,12 g) en dioxano (0,8 ml) y agua (2 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 días, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una disolución de tiosulfato sódico y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetona en cloroformo al 25%) proporcionó el Compuesto 188 (10 mg) y el compuesto sin reaccionar 187 (20 mg).

RMN ^1H (300 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,82 (s a, 1 H), 7,77 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 5,82 (s a, 2 H), 5,73 (s a, 1 H), 5,44 - 5,25 (m, 1 H), 4,64 - 4,34 (m, 2 H), 3,88 - 3,66 (m, 1 H), 3,65 - 3,39 (m, 3 H), 2,18 (s a, 3 H), 2,09 (s a, 3 H).

C) Compuesto 189

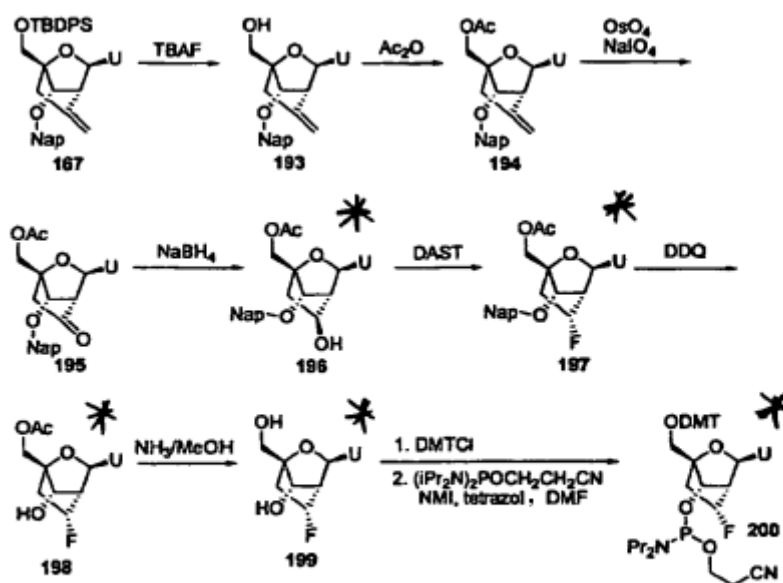
Se añadió tosilhidrazina (0,034 mmol, 6 mg) a una suspensión del Compuesto 188 (10 mg) y Na_2SO_4 anhidro en metanol (0,3 ml). Después del calentamiento a reflujo durante 4 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. El análisis LCMA de la mezcla de reacción en bruto indicó la conversión completa en el Compuesto 189. LCMS: tiempo de retención (2,7 minutos), $M+H$ esperado 521,1; observado 521,0.

D) Compuesto 192

Se consigue la reducción de la tosilhidrazona, del Compuesto 189 al Compuesto 190 mediante una diversidad de agentes de reducción tales como hidruro de litio y aluminio, catecolborano o cianoborohidruro sódico presentado en la técnica. Se consigue la conversión del compuesto 190 en la fosforamidita, Compuesto 192, de acuerdo con el procedimiento general descrito en el ejemplo 27, para la conversión del Compuesto 169 en el Compuesto 171.

Ejemplo 32

Preparación de (1*R*,3*R*,4*R*,5*R*7*S*)-7-12-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxil-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-5-fluoro-2-oxa-biciclo[2,2,1] heptano (Compuesto 200, Esquema 31)



A) Compuesto 193

Se añadió TBAF (93 mmol, 93 ml de una disolución en THF1M) a una disolución del Compuesto 167 (46,6 mmol, 30,0 g) en THF (50 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, el disolvente se evaporó a presión reducida y el aceite resultante se disolvió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyendo con acetona en cloroformo del 20 al 40%) proporcionó el Compuesto 193 (12,0 g, 63%).

B) Compuesto 194

Se añadió anhídrido acético de (88,7 mmol, 8,4 ml) a una disolución del Compuesto 193 (29,6 mmol, 12,0 g) en piridina (100 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se interrumpió con metanol y la piridina se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice eluyendo con acetona en cloroformo del 15 al 20%) proporcionó el Compuesto 194 (13,7 g, cuantitativo).

C) Compuesto 196

Se añadió tetróxido de osmio (3 ml de una disolución en isopropanol al 2,5% p/p) a una disolución del Compuesto 194 (14,5 mmol, 6,5 g) y peryodato sódico (58,8 mmol, 12,4 mmol) en dioxano (145 ml) y agua (145 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se concentró a presión reducida (~30% del volumen original) y el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con una disolución de tiosulfato sódico saturada y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar una mezcla del compuesto 195 en bruto y del compuesto 194 sin reaccionar que se usó sin purificación adicional.

Se añadió borohidruro sódico (2 g) a una disolución fría (-78 °C) del residuo en bruto anterior en metanol (50 ml). Después de agitar durante 1 hora, la reacción se interrumpió mediante la adición de HCl al 10%. Se añadió acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyendo con acetona en cloroformo del 20 al 40%) proporcionó el Compuesto 196 (1,45 g) y el compuesto 188 sin reaccionar (1,17 g).

D) Compuesto 199

Se añadió lentamente DAST (12,4 mmol, 1,61 ml) a una disolución fría (0 °C) del Compuesto 196 (3,1 mmol, 1,4 g) en diclorometano (30 ml). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente gradualmente y se agitó durante 16 horas tras lo que se inactivó con cuidado mediante la adición de bicarbonato sódico saturado. La fase orgánica se separó y se lavó adicionalmente con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyendo con acetona en cloroformo al 20%) proporcionó el Compuesto 197 (170 mg, impuro).

Se añadió DDQ (0,37 mmol, 81 mg) a una disolución del Compuesto 197 (0,17 g a partir del mencionado anteriormente) en diclorometano (3,7 ml) y agua (0,2 ml). Después de agitar durante 4 horas, se añadió a la reacción

una cantidad adicional de DDQ (81 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (acetona en cloroformo al 50%) para proporcionar el Compuesto 198 (50 mg).

- 5 Se añadió amoníaco metanólico (7N, 1 ml) al Compuesto 198 (50 mg) obtenido anteriormente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, el disolvente se evaporó para proporcionar el Compuesto 199.

RMN ^1H (300 MHz, MeOD) δ = 7,92 - 7,77 (m, 1 H), 5,64 (s, 1 H), 5,45 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 5,43 - 5,15 (m, 1 H), 3,99 (s a, 1 H), 3,69 - 3,57 (m, 1 H), 3,57 - 3,42 (m, 1 H), 3,08 (s, 2 H). 2,73 (d, J = 4,0 Hz, 1 H), 221-1,99 (m, 1 H), 1,78 (s, 1 H), 1,60 - 1,33 (m, 1 H). $^1\text{RMN}^9\text{F}$ δ = de -202,4 a -202,7 (m)

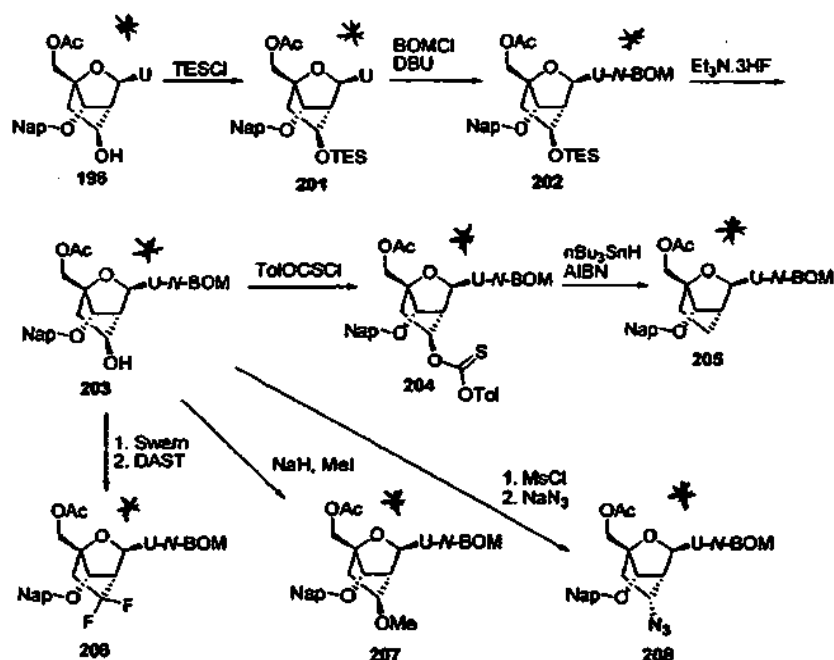
E) Compuesto 200

- 10 **Conversión del Compuesto 199 en la fosfotamidita.** El Compuesto 200 se consigue de acuerdo con el procedimiento general descrito en el ejemplo 27 para la conversión del Compuesto 169 en el Compuesto 171.

Ejemplo 33

Preparación de 5'-O-DMT-3'-O-fosforamiditas de los Compuestos 205-208

15



A) Compuesto 201

- 20 Se añadió clorotrietilsilano (1,1 mmol, 0,18 ml) a una disolución del Compuesto 196 (0,55 mmol, 0,2 g) e imidazol (22 mmol, 0,15 g) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 30 al 50%) y proporcionó el Compuesto 201 (0,14 g).

B) Compuesto 202

- 25 Se añadió cloruro de benciloximetilo (0,5 mmol, 0,08 ml) a una disolución fría (0 °C) del Compuesto 201 (0,25 mmol, 0,14 g) y DBU (0,5 mmol, 0,08 ml) en acetonitrilo (1 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la reacción se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 20 al 30%) y proporcionó el Compuesto 202 (75 mg).

C) Compuesto 203

- 30 Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (0,65 mmol, 0,1 ml) a una disolución del Compuesto 202 (0,109 mmol, 75 mg) en THF (1 ml). Después de agitar durante 3 horas, la reacción se concentró y se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo acetato de etilo en hexanos del 30 al 50%) para proporcionar el Compuesto 203 (61 mg, 99%).

D) Compuesto 205

Se añadió clorotionoformiato de tolilo (0,066 mmol, 0,012 g) a una disolución del Compuesto 203 (0,043 mmol, 0,025 g) y DMAP (8 mg) en diclorometano (0,2 ml). Después de 16 horas a temperatura ambiente se añadió a la reacción DIPEA (0,02 ml). LCMS: tiempo de retención (4,5 minutos), M+H esperado 723,2; observado 723,2.

- 5 El Compuesto 205 se prepara a partir del Compuesto 204 por calentamiento con $n\text{Bu}_3\text{SnH}$ en un disolvente adecuado tal como tolueno y un radical iniciador tal como AIBN.

E) Compuesto 206

- 10 El Compuesto 206 se prepara a partir del Compuesto 205 por oxidación del alcohol primario en condiciones de Swern o cualquier otra condición apropiada para proporcionar la cetona correspondiente. La reacción de la cetona con un agente de fluoración tal como DAST proporciona el Compuesto 206.

F) Compuesto 207

El Compuesto 207 se prepara a partir del Compuesto 205 por reacción con yoduro de metilo en presencia de una base tal como hidruro sódico usando DMF como disolvente.

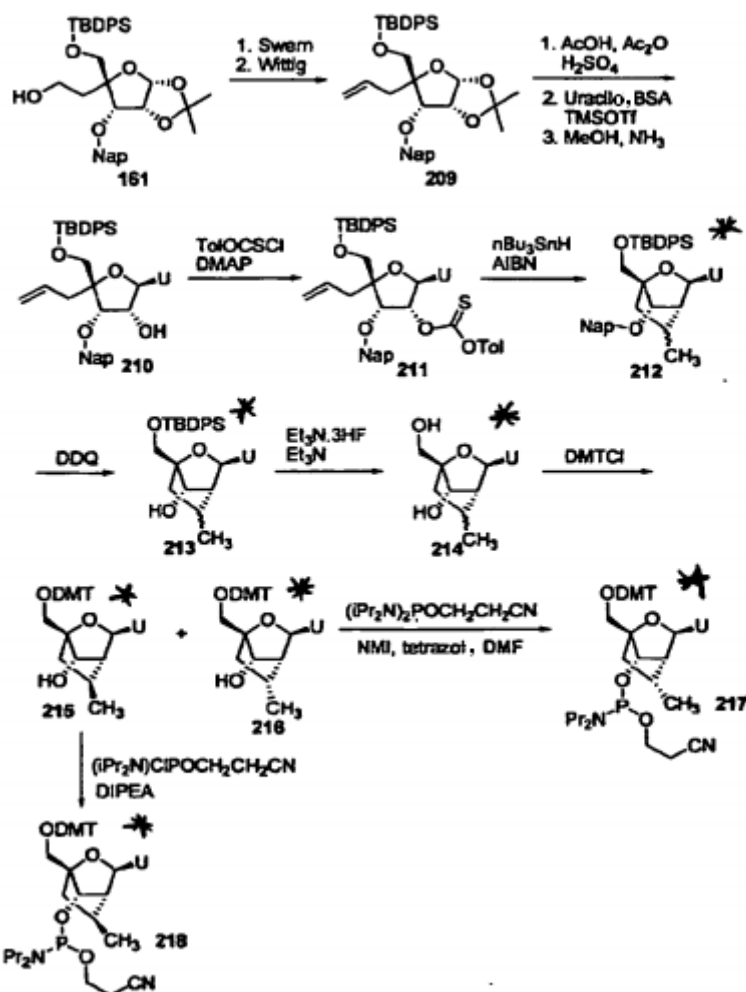
G) Compuesto 208

- 15 El Compuesto 208 se prepara a partir del Compuesto 205 por conversión del grupo hidroxilo en un mesilato o en un derivado triflato seguido de la reacción con azida sódica en un disolvente tal como DMF.

- 20 Los Compuestos 205-208 se convierten en sus 5'-O-DMT-3'-O-fosforamiditas por eliminación del grupo N-BOM en condiciones de hidrogenación, ácido fuerte o BCl_3 seguido de la eliminación del grupo 3'-O-Nap con DDQ y la eliminación del grupo 5'-O-acetilo como se ha descrito en el ejemplo 32. La reacción con DMTCl seguido de la reacción con un reactivo de fosfitilación apropiado proporciona las 5'-O-DMT-3'-O-fosforamiditas deseadas como se ha descrito en el ejemplo 27.

Ejemplo 34

- 25 **Preparación de (1*R*,3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxil-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il-5-metil-2-oxa-biciclo[2,2,1]heptano (Compuesto 217, Esquema 34) y (1*R*,3*R*,4*R*,5*S*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1il)-5-metil-2-oxa-biciclo[2,2,1]heptano (Compuesto 218, Esquema 34)**



A) Compuesto 209

Se añadió dimetilsulfóxido (63,7 mmol, 4,5 ml) a una disolución fría (-78 °C) de cloruro de oxalilo (31,9 mmol, 2,8 ml) en diclorometano (150 ml). Después de agitar durante 30 minutos, se añadió a la reacción una disolución de alcohol, el Compuesto 161 (21,2 mmol, 13,0 g) en diclorometano (50 ml) y se continuó la agitación durante otros 45 minutos. Se añadió trietilamina (95,6 mmol, 13,4 ml) a la reacción, a la que se permitió calentar gradualmente fuera de un baño de refrigeración durante 10 minutos. La reacción después se diluyó con cloroformo y se lavó secuencialmente con HCl al 5%, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar aldehído correspondiente que se usó sin purificación adicional.

Se añadió nBuLi (42,5 mmol, 17 ml de una disolución 2,5 M en hexanos) a una suspensión fría (0 °C) de trifenilfosfoniobromuro de metilo (42,5 mmol, 15,2 g) en THF (175 ml). Después de agitar durante 2 horas, la reacción se enfrió a -78 °C y se añadió a la reacción una disolución de aldehído (21,2 mmol) desde arriba en THF (25 ml) a la que se permitió calentar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante otras 16 horas. La reacción se interrumpió con cloruro de amonio saturado y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con hexanos a acetato de etilo en hexanos al 15%) proporcionó en Compuesto 209.

B) Compuesto 210

Se añadió ácido sulfúrico concentrado (8 gotas) una disolución del Compuesto 209 (13,2 mmol, 8,1 g) en ácido acético (40 ml) y anhídrido acético (8 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos, la reacción se concentró a presión reducida y el residuo se diluyó con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua, bicarbonato sódico saturado (hasta que los lavados tienen pH>10) y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el bis-acetato que se usó en la siguiente etapa sin purificación alguna.

Se añadió *N,O*-bis-trimetilsilil-acetamida (29,6 mmol, 7,3 ml) a una suspensión de uracilo (11,8 mmol, 1,3 g) y bis-acetato (13,3 mmol, obtenido anteriormente) en acetonitrilo (67 ml). La suspensión se calentó hasta que se produjo la disolución tras lo cual se enfrió en un baño de hielo. Se añadió TMSOTf gota a gota a la reacción (17,7 mmol, 3,2 ml) y la reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. Después, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se inactivó cuidadosamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico. La reacción después se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró para proporcionar el nucleósido en bruto que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

El nucleósido en bruto (13,2 mmol) obtenido anteriormente, se disolvió en una disolución de amoníaco en metanol (7 N, 40 ml). Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, la reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 35 al 50%) para proporcionar el Compuesto 210 (5,0 g).

C) Compuesto 211

Se añadió clorotionoformiato de toluilo (8,3 mmol, 13 ml) se añadió gota a gota a una disolución fría (0 °C) del Compuesto 210 (7,6 mmol, 5,0 g) y dimetilaminopiridina (16,6 mmol, 2,0 g) en acetonitrilo (75 ml). Después de agitar durante 1 hora, la reacción se interrumpió con metanol. Se evaporó aproximadamente en 50% del disolvente a presión reducida y la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con HCl al 5%, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 30 al 40%) proporcionó el Compuesto 211 (5,1 g).

I) Compuesto 212

Se calentó a reflujo una disolución del Compuesto 211 (63 mmol, 5,1 g) en tolueno (190 ml) durante 30 minutos. Se añadió gota a gota una disolución de nBu_3SnH (12,5 mmol, 3,3 ml) en tolueno (30 ml) a la reacción calentada a reflujo. Después de añadir aproximadamente la mitad (15 ml) de la disolución de nBu_3SnH a la reacción (30 minutos), se añadió gota a gota a la reacción una disolución de AIBN (12,5 mmol, 2,0 g) en tolueno (30 ml) durante más de 90 minutos. Después de calentar a reflujo durante otras 2 horas, la reacción se enfrió y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se diluyó con éter y se lavó con una disolución saturada de KF y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 20 al 40%) proporcionó el Compuesto 212 (3,2 g).

E) Compuesto 213

Se añadió DDQ (9,9 mmol, 2,3 g) a una disolución del Compuesto 212 (4,9 mmol, 3,2 g) en diclorometano (50 ml) y agua (2,5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se concentró a presión reducida y se volvió a disolver en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua, bisulfito sódico al 10%, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 30 al 60%) proporcionó el Compuesto 213 (2,36 g).

F) Compuesto 214

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (4,4 ml, 27,0 mmol) a una disolución del Compuesto 213 (4,5 mmol, 2,3 g) y trietilamina (11,4 mmol, 1,6 ml) en THF (45 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 5 al 10%) proporcionó el nucleósido, el Compuesto 214 (1,05 g, 87%).

G) Compuestos 215 y 216

Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (4,3 mmol, 1,3 g) a una disolución del Compuesto 214 (1,05 g, 3,9 mmol) en piridina (20 ml). Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se extrajo con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyendo con acetona en cloroformo del 15 al 25%) proporcionó el Compuesto 216 puro (1,24 g) y una mezcla de los Compuestos 215 y 216 (0,42 g) y del Compuesto 214 sin reaccionar (272 mg). La repurificación de la mezcla por cromatografía en columna como se ha mencionado anteriormente proporcionó el Compuesto 215 puro (228 mg) y el compuesto 210. (122 mg).

Compuesto 216: RMN ^1H (300 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,90 (s a, 1 H), 8,20 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 7,52 - 7,22 (m, 12 H), 6,96 - 6,73 (m, 5 H), 5,75 (s, 1 H), 5,52 (dd, J = 1,4, 8,2 Hz, 1 H), 4,20 (s a, 1 H), 3,79 (s, 7 H), 3,62 (d, J = 11,3 Hz, 1 H), 3,31 (d, J = 11,3 Hz, 1 H), 2,62 (d, J = 5,5 Hz, 1 H), 2,47 (d, J = 3,2 Hz, 1 H), 2,17 (s, 2 H), 1,89 (s, 1 H), 1,65 (d, J = 3,6 Hz, 1 H), 1,23 (d, J = 7,3 Hz, 3 H), 1,07 (ninguno, 1 H).

Compuesto 215: RMN ^1H (300 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,94 - 8,72 (m, 1 H), 8,35 - 8,10 (m, 1 H), 7,52 - 7,22 (m, 11 H), 6,97 - 6,74 (m, 4 H), 5,55 - 5,41 (m, 1 H), 5,41 - 5,27 (m, 1 H), 4,22 - 4,04 (m, 1 H), 3,80 (s, 6 H), 3,74 - 3,59 (m, 1 H), 3,50 - 3,30 (m, 1 H), 2,46 - 2,28 (m, 1 H), 2,28 - 2,01 (m, 1H), 2,01 - 1,75 (m, 1 H), 1,54 - 1,31 (m, 2 H), 1,21 (ninguno, 3 H).

H) Compuesto 217

Se añadió $(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$ (3,4 mmol, 1,1 ml) a una disolución del Compuesto 216 (2,3 mmol, 1,3 g), NMI (0,57 mmol, 0,046 g) y tetrazol (1,8 mmol, 0,13 g) en DMF (11 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 50 al 60%) proporcionó el Compuesto 217 (1,24 g).

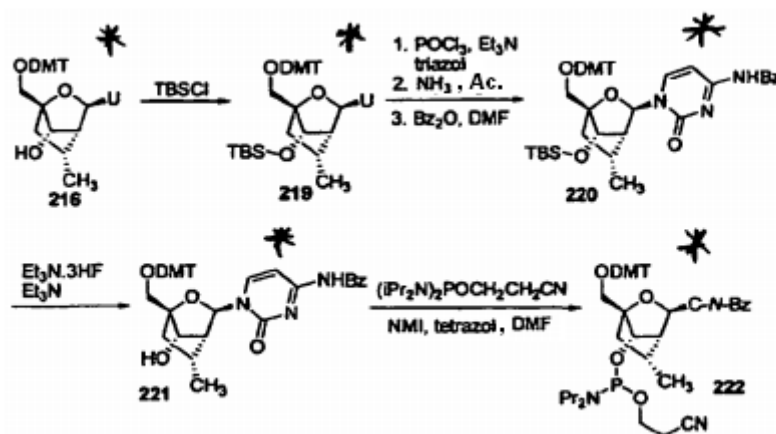
RMN ^{31}P (300 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 148,9, 148,6.

I) Compuesto 218

Se añade $(iPr_2N)CIPOCH_2CH_2CN$ a una disolución del Compuesto 215 y DIPEA en diclorometano. El producto final se aísla después y se purifica de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para el Compuesto 217.

Ejemplo 35

Preparación de (1*R*,3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxil-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(citosin-1-il)-metil-2-oxa-biciclo[2,2,1]heptano (Compuesto 222, Esquema 35)

**A) Compuesto 219**

Se añadió cloruro de terc-butildimetilsililo (1,2 g) a una disolución del Compuesto 216 (1,6 mmol, 0,9 g) e imidazol (1,0 g) en DMF. Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 días, la reacción se diluyó con acetato de etilo y la fase de la orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 30 al 40%) proporcionó el Compuesto 219 (0,8 g).

B) Compuesto 220

Se añadió oxiclورو de fósforo (13,0 mmol, 1,2 ml) a una suspensión fría de 1,2,4-triazol (55,1 mmol, 3,8 g) en acetonitrilo (16 ml). Después de agitar durante 15 minutos, se añadió a la reacción trietilamina (64,8 mmol, 9,1 ml) y la suspensión blanca se agitó durante otros 30 minutos. Se añadió a la reacción una disolución del Compuesto 219 (1,6 mmol, 1,1 g) en acetonitrilo (5 ml) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 5 horas. Después, la reacción se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró y el material en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se añadió amoniaco acuoso (3,2 ml) a una disolución del material en bruto obtenido anteriormente en dioxano (16 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas, la reacción se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetona en cloroformo del 20 al 35%) para proporcionar el nucleósido citosina (0,67 g).

Se añadió anhídrido benzoico (1,9 mmol, 0,43 g) a una disolución del nucleósido citosina obtenido anteriormente (1,6 mmol, 1,1 g) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 30 al 50%) proporcionó el Compuesto 220 (1,3 g).

C) Compuesto 221

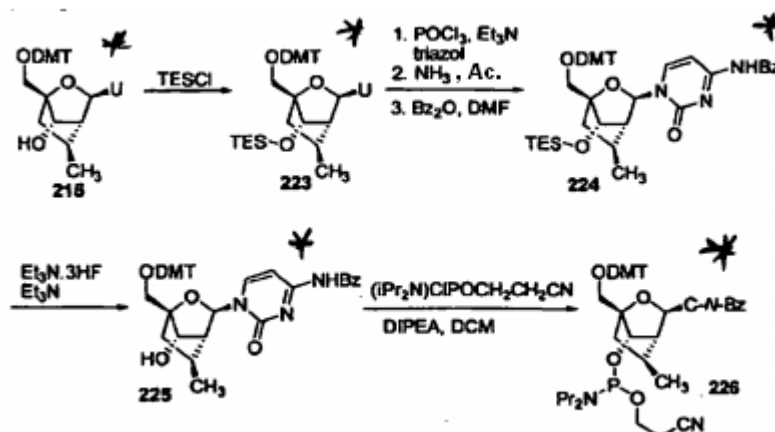
- Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (9,7 mmol, 1,6 ml) a una disolución del Compuesto 220 (1,6 mmol, 1,25 g) y trietilamina (4,0 mmol, 0,6 ml) en THF (16 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 40 horas, se añadieron cantidades adicionales de trihidrofluoruro de trietilamina (0,8 ml) y trietilamina (0,2 ml) a la reacción que se agitó durante otras 16 horas a temperatura ambiente. La reacción después se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetona en cloroformo del 20 al 30%) proporcionó el Compuesto 22 (0,94 g, 88%).

D) Compuesto 222

- Se añadió $(\text{iPr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (2,1 mmol, 0,66 ml) a una disolución del Compuesto 221 (1,4 mmol, 0,94 g), NMI (0,35 mmol, 0,03 g) y tetrazol (1,1 mmol, 0,08 g) en DMF (7 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 70 al 80%) proporcionó el Compuesto 222 (1,04 g).
- RMN ^{31}P (300 MHz, $\text{ClO}_2\text{FORMO}-d$) $\delta = 148,9, 148,8$.

Ejemplos 36

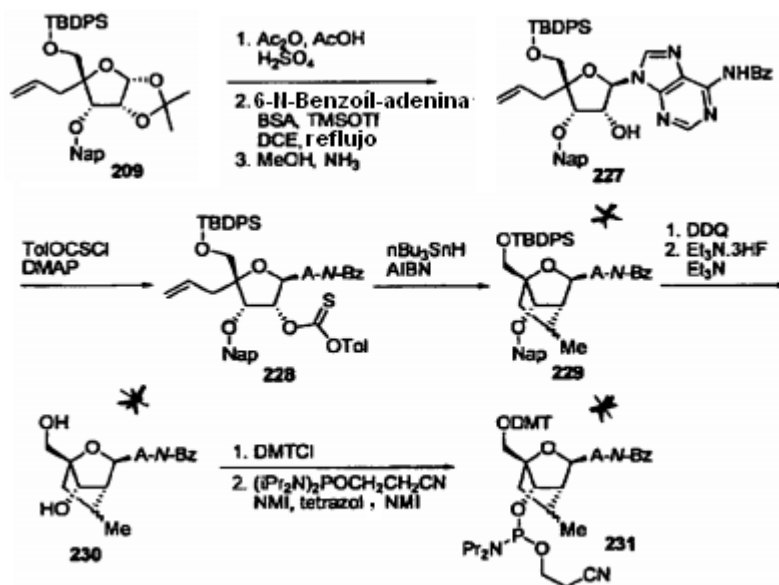
Preparación de (1R,3R,4R,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(citosin-1-il)-metil-2-oxa-biciclo(2,2,1)heptano (Compuesto 226, Esquema 36)



- El Compuesto 226 se prepara a partir del Compuesto 215 (ejemplo 34) usando los procedimientos generales que se han descrito en los ejemplos 34 y 35.

Ejemplo 37

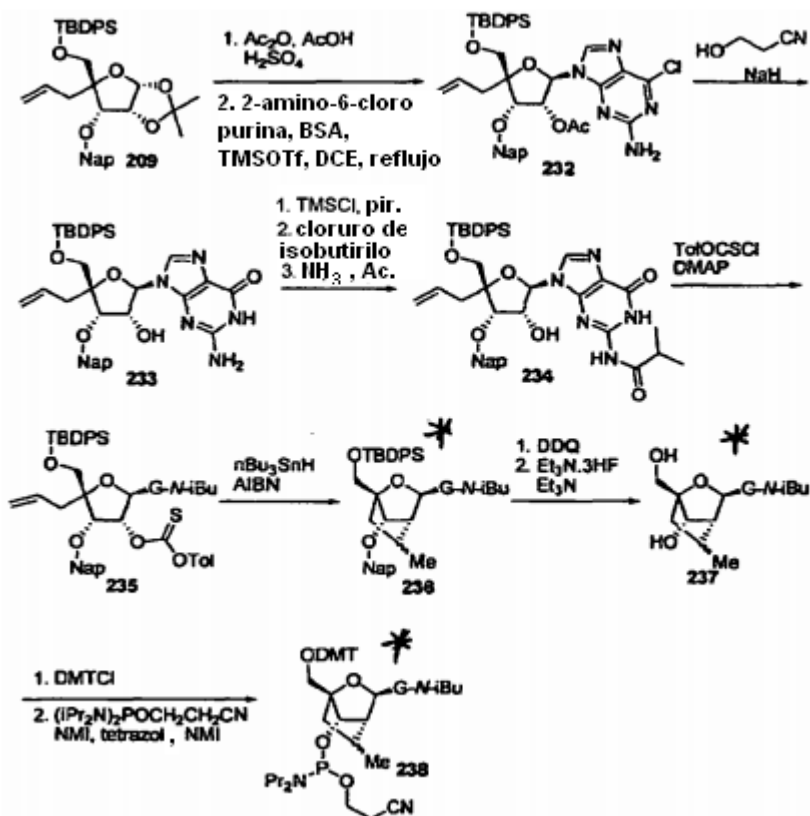
Preparación de (1R,3R,4R,5R,7S)- y (1R,3R,4R,5S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(adenin-1-il)-5-metil-2-oxa-biciclo[2,2,1]hepteno (Compuesto 231, esquema 37)



La fosforamida, Compuesto 231 se prepara a partir del Compuesto 209 (ejemplo 34) usando los procedimientos generales descritos en el ejemplo 29.

Ejemplo 38

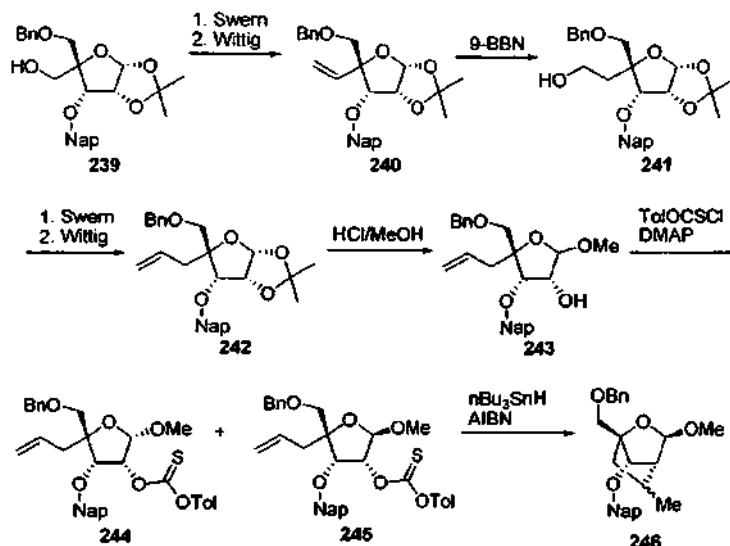
- 5 Preparación de (1R,3R,4R,5R, 7S)- y (1R,3R,4R,5S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(guanin-1-il)-5-metil-2-oxa-biciclo[2,2,1]heptano (Compuesto 238, Esquema 38)



La fosforamidita, Compuesto 238 se prepara a partir del Compuesto 209 (ejemplo 34) usando los procedimientos generales descritos en el ejemplo 30.

Ejemplo 39

Preparación del Compuesto 246



A) Compuesto 240

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (103,6 mmol, 7,3 ml) a una disolución fría (-78 °C) de cloruro de oxalilo (51,8 mmol, 4,5 ml) en diclorometano (320 ml). Después de agitar durante 30 minutos, se añadió una disolución de alcohol disponible en el mercado, Compuesto 239 (37,0 mmol, 16,7 g) en diclorometano (50 ml) a la reacción mediante una cánula y la agitación se continuó durante otros 45 minutos a -78 °C. Se añadió trietilamina (155 mmol, 21,8 ml) y la reacción se retiró del baño de refrigeración y la agitación se continuó durante otros 30 minutos. La reacción después se diluyó con diclorometano y se lavó secuencialmente con HCl al 5%, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el aldehído correspondiente que se usó en la siguiente etapa sin purificación alguna.

Se añadió nBuLi (51,8 mmol, 20,7 ml de una disolución 2,5 M) a una disolución fría (0 °C) de bromuro de metiltrifenilfosfonio (51,8 mmol, 18,5 g) en THF (300 ml). Después de agitar durante 2 horas en el baño de hielo, la disolución de color rojo oscuro se enfrió a -78 °C y se añadió a la reacción una disolución del aldehído en bruto obtenido anteriormente o en THF (50 ml) durante 20 minutos. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente gradualmente y se agitó durante 16 horas. Se añadió a la reacción cloruro de amonio saturado y se evaporó aproximadamente el 80% del THF a presión reducida. El aceite resultante se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El material en bruto se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con hexanos - acetato de etilo en hexanos al 20%) para proporcionar el Compuesto 240.

B) Compuesto 241

Se añadió una disolución del Compuesto 240 (42,6 mmol, 19,0 g) en THF (30 ml) a una disolución de 9-BBN (en THF 0,5 M, 127,8 mmol, 256 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se inactivó cuidadosamente con EtOH. Se añadió a la reacción una suspensión de perborato sódico tetrahidrato (255 mmol, 39,0 g) en etanol (255 ml) y agua (255 ml) y la mezcla se calentó a 50 °C durante 4 horas. Se evaporó aproximadamente el 80% del disolvente a presión reducida y el residuo se suspendió en acetato de etilo y se lavó secuencialmente con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 10 al 30%) para proporcionar the alcohol, Compuesto 241 (19,8 g, 88%) en forma de un aceite.

C) Compuesto 242

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (112,9 mmol, 8,0 ml) a una disolución fría (-78 °C) de cloruro de oxalilo (56,5 mmol, 4,9 ml) en diclorometano (320 ml). Después de agitar durante 30 minutos, se añadió a la reacción una disolución del Compuesto 241 (37,3 mmol, 17,5 g) en diclorometano (50 ml) mediante una cánula y la agitación se continuó durante otros 45 minutos a -78 °C. Se añadió trietilamina (169,4 mmol, 23,8 ml) y la reacción se retiró del

baño de refrigeración y la agitación se continuó durante otros 30 minutos. La reacción después se diluyó con diclorometano y se lavó secuencialmente con al HCl 5%, NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el aldehído correspondiente que se usó en la siguiente etapa sin purificación alguna.

- 5 Se añadió nBuLi (56,5 mmol, 22,6 ml de una disolución 2,5 M en hexanos) a una suspensión fría (0 °C) de trifenilfosfoniobromuro de metilo (56,5 mmol, 20,2 g) en THF (350 ml). Después de agitar durante 2 horas, la reacción se enfrió a -78 °C y se añadió a la reacción desde arriba una disolución del aldehído (37,7 mmol) en THF (50 ml) a la que se permitió calentar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante otras 16 horas. La reacción se interrumpió con cloruro de amonio saturado y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La
10 purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con hexanos a acetato de etilo en hexanos al 15%) proporcionó el Compuesto 242 (7,8 g).

D) Compuesto 243

- 15 Se añadió HCl (2,2 mmol, 0,54 ml de una disolución 4M en dioxano) a una disolución fría (0 °C) del Compuesto 242 (1,1 mmol, 0,5 g) en metanol seco (10 ml). Después de agitar a 0 °C durante 1 hora, la reacción se interrumpió con una disolución saturada de bicarbonato sódico y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar el Compuesto 243 (0,44 g).

E) Compuestos 244 y 245

- 20 Se añadió gota a gota clorotionoformiato de toloilo (1,2 mmol, 0,19 ml) a una disolución fría (0 °C) del Compuesto 243 (1,0 mmol, 0,44) y dimetilaminopiridina (2,0 mmol, 0,24 g) en acetonitrilo (10 ml). Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, la reacción se interrumpió con metanol. Se evaporó aproximadamente el 50% del disolvente a presión reducida y la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con HCl al 5%, bicarbonato sódico saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos de 10 al 20%) proporcionó el Compuesto 244 (0,21 g) y el Compuesto 245 (0,15 g).

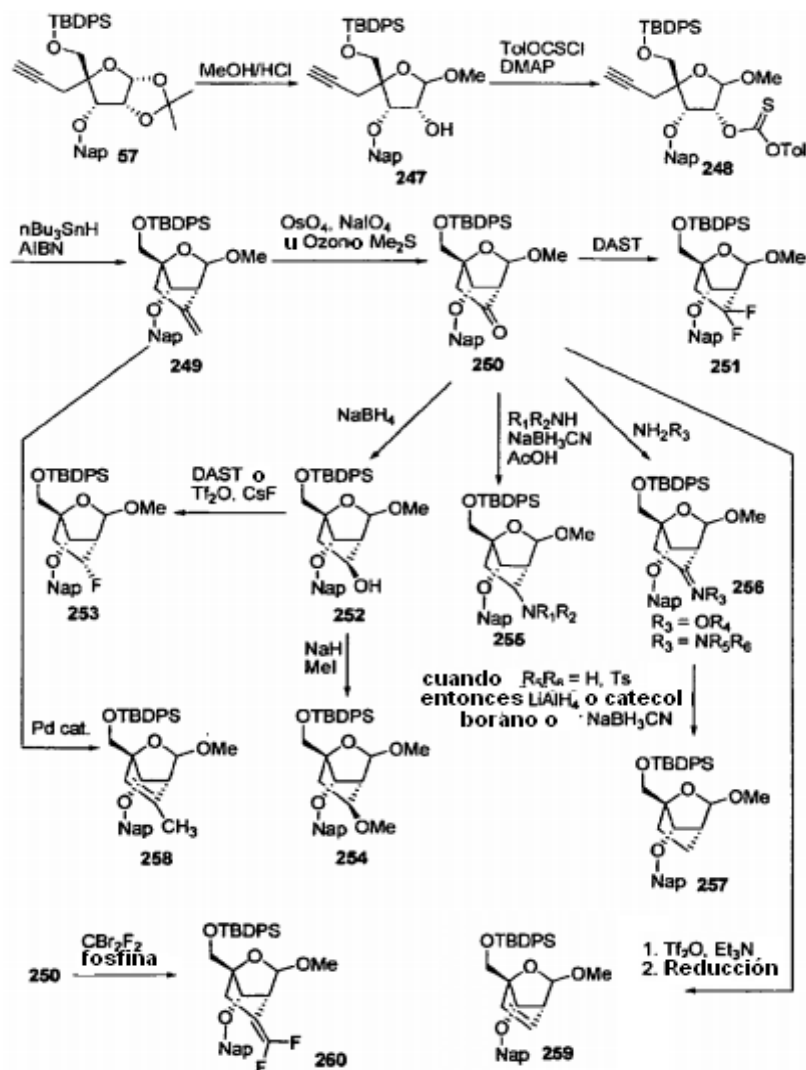
I) Compuesto 246

- 25 Se calentó a reflujo una disolución del Compuesto 245 (0,26 mmol, 0,15 g) en tolueno (8 ml) durante 30 minutos. Se añadió gota a gota una disolución de nBu₃SnH (0,26 mmol, 0,07 ml) en tolueno (1 ml) a la reacción calentando a reflujo. Después de añadir aproximadamente la mitad (0,5 ml) de la disolución de nBu₃SnH a la reacción (30 minutos), se añadió gota a gota una disolución de AIBN (0,26 mmol, 0,043 g) en tolueno (1 ml) a la reacción durante
30 más de 90 minutos. Después de calentar a reflujo otras 2 horas, la reacción se enfrió y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se diluyó con éter y se lavó con una disolución saturada de KF y salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía (gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo en hexanos del 20 al 40%) proporcionó el Compuesto 246 (0,05 g).

- 35 RMN ¹H (300 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,89 - 7,77 (m, 3H), 7,47 - 7,44 (m, 2H), 7,39 - 7,24 (m, 7H), 4,86 (s, 1H), 4,70 - 4,57 (m, 4H), 4,29 (s, 1H), 3,68 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 2,54 - 2,48 (m, 1H), 2,35 - 2,31 (m, 1H), 2,11 - 1,99 (m, 1H), 1,22 - 1,17 (m, 1H), 1,11 (d, 3H, J = 7,2).

Ejemplo 40

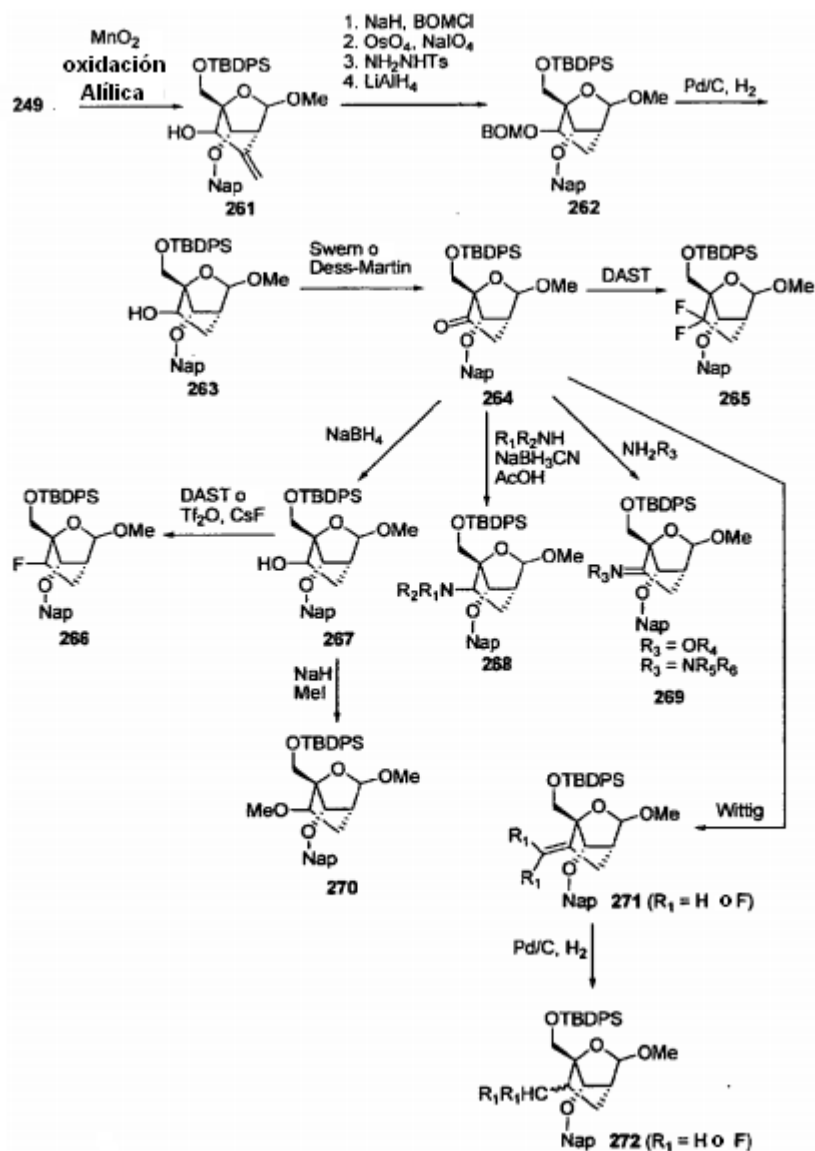
Preparación de los Compuestos 249-260



El Compuesto 249 se prepara a partir del Compuesto 57 (ejemplo 27) usando los procedimientos generales descritos en los ejemplos 39 y 27. El Compuesto 250 se prepara a partir del Compuesto 249 mediante una reacción de escisión oxidativa usando tetróxido de osmio y peryodato sódico u ozono. El Compuesto 251 se prepara por difluoración del Compuesto 250 usando DAST o cualquier otro reactivo de fluoración adecuado. El Compuesto 252 se prepara a partir del Compuesto 250 por reducción con borohidruro sódico. La fluoración del Compuesto 252 con DAST proporciona el Compuesto 253. La alquilación del Compuesto 252 usando una base fuerte como el hidruro sódico y un agente de alquilación como el yoduro de metilo proporciona el Compuesto 254. Una reacción de aminación reductora del Compuesto 250 proporciona el Compuesto 255 sustituido con un grupo amino. La reacción del Compuesto 250 con una hidroxilamina o con compuesto de hidrazina proporciona la oxima o hidrazona correspondiente, Compuesto 256. Cuando la hidrazina es la tosílhidrazina, el Compuesto 256 se reduce usando un agente reductor como el LiAlH_4 , catecolborano cianoborohidruro sódico para proporcionar el Compuesto 257. El Compuesto 249 se isomeriza en la olefina interna más estable usando paladio o rodio o cualquier otro catalizador para la isomerización de olefinas para proporcionar el Compuesto 258. El Compuesto 250 se convierte en el triflato enol correspondiente seguido de una reacción de reducción para proporcionar el Compuesto 259. El Compuesto 250 se convierte en la olefina difluoro, el Compuesto 260 usando CBr_2F_2 y un reactivo fosfina.

Ejemplo 41

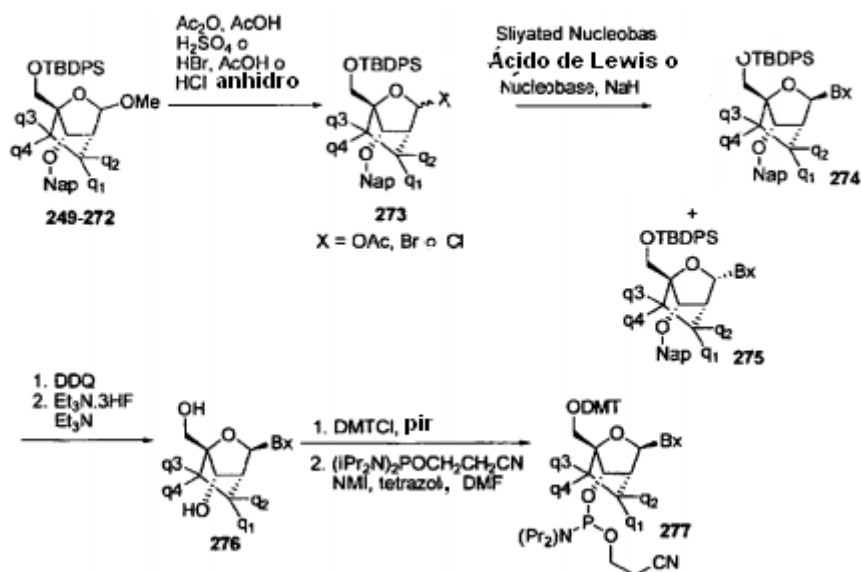
Preparación de los Compuestos 261-272



El Compuesto 261 se prepara a partir del Compuesto 249 (ejemplo 40) por medio de una reacción de oxidación alílica usando un oxidante adecuado tal como el dióxido de manganeso. Entonces se protege el grupo hidroxilo mientras que el éter benciloximetílico y el doble enlace se escinde usando tetróxido de osmio y peryodato sódico u ozono. La reacción de esta cetona con tosilhidrazina seguido de la reducción con hidruro de litio y aluminio o catecolborano o cianoborohidruro sódico proporciona el Compuesto 262. La eliminación del grupo BOM en el compuesto 262 proporciona el alcohol, Compuesto 263. La oxidación del alcohol en el Compuesto 263 proporciona la cetona, Compuesto 264 que se convierte en el (compuesto difluoro) Compuesto 265 usando DAST o cualquier otro agente de fluoración adecuado. El Compuesto 264 se reduce a Compuesto 267 usando borohidruro sódico. El Compuesto 267 se convierte en el análogo fluoro, Compuesto 266 usando DAST o cualquier otro reactivo de fluoración adecuado. Compuesto 264 se convierte en el Compuesto 268 mediante una reacción de aminación reductora. El Compuesto 264 se convierte en la oxima/hidrazona, Compuesto 269 por reacción con una hidroxilamina o hidrazina. El Compuesto 270 se prepara a partir del Compuesto 269 por medio de una reacción de alquilación usando una base fuerte y un agente de alquilación tal como yoduro de metilo. El Compuesto 271 se prepara a partir del Compuesto 264 por medio de una reacción de Wittig usando las condiciones apropiadas. El Compuesto 272 se prepara a partir del Compuesto 271 mediante una reacción de reducción usando el catalizador paladio sobre carbón e hidrógeno.

Ejemplo 42

Preparación del Compuesto 277



Los Compuestos 249-272 se preparan como se ha descrito en los ejemplos 40 y 41; se tratan con una mezcla de ácido acético, anhídrido acético y ácido sulfúrico catalítico o HBr/ácido acético o HCl que proporciona el Compuesto 273. El tratamiento del Compuesto 273 con una nucleobase siliada y un ácido de Lewis o la sal sódica de una nucleobase protegida apropiadamente proporciona una mezcla de los nucleósidos anoméricos Compuesto 274 y Compuesto 275. La eliminación de protectores de 3'-O y 5'-O en el Compuesto 274 proporciona los nucleósidos, Compuesto 276. La protección del grupo hidroxilo en la posición 5' como el éter DMT seguido de la fosfitilación del grupo hidroxilo en la posición 3' proporciona las fosforamiditas deseadas, Compuesto 277.

Ejemplo 43

Síntesis de los Nucleósidos Fosforamiditas

La preparación de los nucleósidos Fosforamiditas se lleva a cabo siguiendo los procedimientos que se ilustran en el presente documento y en la técnica, tales como, pero no se limitan a, la Patente de los Estados Unidos de América N° 6.426.220 y publicados como documento PCT WO 02/36743.

Ejemplo 44

Síntesis de Oligonucleótidos y Oligonucleósidos

Los compuestos oligoméricos usados de acuerdo con la presente invención se pueden preparar convenientemente y de manera rutinaria a través de la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para tales síntesis se comercializa a través de diversos proveedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Se puede emplear cualquier otro medio para tales síntesis conocidas en la técnica adicional o alternativamente. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar los oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados alquilados.

Se pueden sintetizar los oligonucleótidos con enlaces internucleósido fosfodiéster ($\text{P}=\text{O}$) no sustituidos y sustituidos en un sintetizador de ADN automatizado (Applied Biosystems modelo 394) usando la química estándar para la fosforamidita por oxidación con yodo.

Los oligonucleótidos con enlaces internucleósido fosforotioato ($\text{P}=\text{S}$) se sintetizan de manera similar a los oligonucleótidos fosfodiéster con las siguientes excepciones: tiación se lleva a cabo mediante la utilización de una disolución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en 3-picolina al 50% en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces fosfito. El tiempo de la etapa de la reacción de tiación se eleva a 180 segundos y va precedido por la etapa normal de protección. Después de la escisión de la columna CPG y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 °C (12-16 horas), se recuperan los oligonucleótidos por precipitación con una cantidad superior a 3 volúmenes de etanol a partir una disolución de NH_4OAc 1 M. Se pueden preparar los oligonucleótidos fosfinato como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos de América N° 5.508.270.

Los oligonucleótidos fosfonato de alquilo se pueden preparar como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos de América N° 4.469.863.

Los oligonucleótidos fosfonato de 3'-desoxi-3'-metileno se pueden preparar como se ha descrito en las Patentes de los Estados Unidos de América Nº 5.610.289 o 5.625.050.

Los oligonucleótidos fosforamidita se pueden preparar como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos de América Nº 5.256.775 o en la Patente de los Estados Unidos de América Nº 5.366.878.

- 5 Los oligonucleótidos fosfonotioato de alquilo se pueden preparar como se ha descrito en las solicitudes PCT publicadas PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como documento WO 94/17093 y documento WO 94/02499, respectivamente).

Los oligonucleótidos fosforamidato de 3'-desoxi-3'-amino se pueden preparar como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos de América Nº 5.476.925.

- 10 Los oligonucleótidos fosfotriéster se pueden preparar como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos de América Nº 5.023.243.

Los oligonucleótidos fosfato de borano se pueden preparar como se ha descrito en las Patentes de los Estados Unidos de América Nº 5.130.302 y 5.177.198.

- 15 Oligonucleósidos: se pueden preparar los oligonucleósidos enlazados por metilenmetilimino, también identificados como oligonucleósidos enlazados por MM1, oligonucleósidos enlazados por metilendimetilhidrazo, también identificados como oligonucleósidos enlazados por MDH y oligonucleósidos enlazados por metilencarbonilamino, también identificados como oligonucleósidos enlazados por amida-3 y oligonucleósidos enlazados por metilaminocarbonil, también identificados como oligonucleósidos enlazados por amida-4, así como los compuestos oligoméricos de cadena principal mixta que tienen, por ejemplo, enlaces MM1 y P=O o P=S alternos
20 como se ha descrito en las Patentes de los Estados Unidos de América Nº 5.378.825; 5.386.023; 5.489.677; 5.602.240 y 5.610.

Los oligonucleósidos enlazados formacetal y tioformacetal se pueden preparar como se ha descrito en las Patentes de los Estados Unidos de América Nº 5.264.562 y 5.264.564.

- 25 Los oligonucleósidos enlazados óxido de se pueden preparar como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos de América Nº 5.223.618.

Ejemplo 45

Aislamiento de los Oligonucleótidos

- Después de la escisión del soporte sólido de vidrio de poro controlado y del desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 °C durante 12-16 horas, los oligonucleótidos o los oligonucleósidos se recuperan mediante su precipitación en NH₄OAc 1 M con una cantidad >3 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados se analizan mediante espectroscopia de masas por electronebulización (determinación del peso molecular) y mediante electroforesis en gel capilar. Las cantidades relativas de enlaces fósforotioato y fosfodiéster obtenidos en la síntesis se determinan mediante la relación de peso molecular correcto con respecto al producto -16 amu (+/-32 +/-48). Para algunos estudios, los oligonucleótidos se codifican por HPLC, como se ha descrito por Chiang y col., J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con el material purificado por HPLC generalmente son similares a aquellos obtenidos con el material no purificado por HPLC.

Ejemplo 46

Síntesis de Oligonucleótidos - Formato de Placa de 96 Pocillos

- Se pueden sintetizar los oligonucleótidos por medio de la química de la fosforamidita en fase sólida P(III) en un sintetizador automático capaz de ensamblar simultáneamente 96 secuencias en un formato de 96 pocillos. Se producen los enlaces internucleótido fosfodiéster por la oxidación con yodo acuoso. Se generan enlaces internucleótido fosforotioato por su sulfuración utilizando 1,1 dióxido de 3,4-dihidro-2-benzoditio-3-ona (Reactivo de Beaucage) en acetonitrilo anhidro. Se adquieren beta-cianoetil-diisopropil fosforamiditas con la base protegida de manera estándar a proveedores comerciales (por ejemplo, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, o Pharmacia, Piscataway, NJ). Se sintetizan los nucleósidos no estándar mediante los procedimientos estándar o patentados. Se utilizan como beta-cianoetildisopropil fosforamiditas con la base protegida.

- Los oligonucleótidos se escinden del soporte y se desprotegen con NH₄OH concentrado a temperatura elevada (55 - 60 °C) durante 12-16 horas y el producto liberado después se secó al vacío. El producto seco se vuelve a suspender después en agua estéril para producir una placa maestra a partir de la cual se diluyen después todas las muestras de las placas analíticas y de ensayo utilizando pipeteadores robotizados.

Ejemplo 47

Análisis de Oligonucleótidos usando un Formato de Placa 96 Pocillos

Se evalúa la concentración de oligonucleótido en cada pocillo mediante la dilución de las muestras y por espectroscopia de absorción UV. Se evalúa la integridad de la longitud completa de los productos individuales mediante electroforesis capilar (CE) en un formato de 96 pocillos (Beckman P/ACE™ MDQ) o, para las muestras preparadas individuales, en un aparato de CE comercial (por ejemplo, Beckman P/ACE™ 5000, ABI 270). Se confirma la composición de las bases y de la cadena principal mediante el análisis de masas de los compuestos oligoméricos utilizando electronebulización-espectroscopía de masas. Todas las placas de ensayo del análisis se diluyen a partir de la placa maestra utilizando pipeteadores robóticos de uno y múltiples canales. Se considera que las placas son aceptables si al menos el 85% de los compuestos oligoméricos en la placa tienen una longitud completa de al menos el 85%.

Ejemplo 48

Cultivo celular y tratamiento de los oligonucleótidos

Se puede someter a ensayo el efecto de los compuestos oligoméricos sobre la expresión de los ácido nucleicos diana en cualquiera de una diversidad de tipos celulares siempre que el ácido nucleico diana esté presente a niveles mensurables. Esto se puede determinar de manera rutinaria utilizando, por ejemplo, una PCR o un análisis de transferencia Northern. Se puede obtener las líneas celulares derivadas de múltiples tejidos y especies de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA).

Se proporciona el siguiente tipo celular con fines ilustrativos, pero se pueden utilizar otros tipos celulares utilizados rutinariamente, con la condición de que la diana se exprese en el tipo celular escogido. Esto se puede determinar fácilmente mediante los procedimientos rutinarios en la técnica, por ejemplo el análisis de transferencia Northern, análisis de protección de ribonucleasas o RT-PCR.

Células b.END: se obtuvo la línea de células endoteliales del cerebro de ratón del Dr. Werner Risau en el Instituto Max Plank (Bad Nauheim, Germany). Las células b.END se cultivaron rutinariamente en DMEM, con alto contenido en glucosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se hicieron pasar rutinariamente por tripsina acción dilución cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente 90%. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA) con una densidad de aproximadamente 3000 células/pocillo para usos que incluyan, pero no se limitaban a, experimentos para la Transfección de compuestos oligoméricos.

Experimentos que implican el tratamiento de las células con los compuestos oligoméricos:

Quando las células alcanzan una confluencia apropiada, se tratan con los compuestos oligoméricos usando, en determinadas realizaciones, un procedimiento de transfección como se ha descrito.

LIPOFECTINA™

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

Otros reactivos de transfección adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, CITOFECTION™, LIPOFECTION™, OLIGOFECTAMINA™ y FUGENE™. Otros procedimientos de transfección adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, electroporación.

Ejemplo 49

Análisis de la inhibición del oligonucleótido de una expresión diana

Se puede realizar un ensayo de la modulación antisentido de una expresión diana en una diversidad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden cuantificar los niveles de un ARNm, por ejemplo, mediante análisis de transferencia, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR) o PCR en tiempo real. Actualmente se desea la PCR cuantitativa en tiempo real. Se puede llevar a cabo el análisis de ARN sobre el ARN celular total o ARNm poli(A)+. Un procedimiento para el análisis de ARN es el uso de ARN celular total como se ha descrito en otros ejemplos en el presente documento. Los procedimientos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia Northern es también una rutina en la técnica. La (PCR) cuantitativa en tiempo real se puede conseguir convenientemente usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM™ 7600, 7700 o 7900 disponible en el mercado, de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles proteína de una diana se pueden cuantificar en una diversidad de formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis, Western (inmunotransferencia), análisis de inmuoabsorción con enzima ligada (ELISA) o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se pueden identificar y obtener los anticuerpos dirigidos a una diana a partir de una diversidad de fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI) o se pueden preparar mediante los procedimientos de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales convencionales bien conocidos en la técnica. Los procedimientos para la preparación de antisuero policlonales se enseñan en, por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 11,12,1 - 11,12,9, John Wiley & Sons, Inc., 1997. Se enseña la preparación de anticuerpos monoclonales en, por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 11,4,1 - 11,11,5, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

Los procedimientos de inmunoprecipitación son estándar en la técnica y se pueden encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F.M. y con, *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 10,16,1-10,16,11, John Wiley & Sons, Inc., 1998. El análisis de transferencia Western (inmunotransferencia) en la técnica es estándar y se puede encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 10,8,1 - 10,8,21, John Wiley & Sons, Inc., 1997. Los análisis de inmuoabsorción con enzima ligada (ELISA) en la técnica son estándar y se puede encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 11,2,1 - 11,2,22, John Wiley & Sons, Inc., 1991.

Ejemplo 50

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

Ensayos fenotípicos

Una vez que se han identificado los inhibidores de la diana por los procedimientos descritos en el presente documento, los compuestos oligoméricos se investigan adicionalmente en uno o más análisis fenotípicos, teniendo cada uno criterios predictivos mensurables de la valoración de la eficacia en el tratamiento de un estado de enfermedad en particular o de una afección.

Los ensayos fenotípicos, los kits y los reactivos para su uso son bien conocidos por los expertos en la materia y se usan en el presente documento para investigar el papel y/o la asociación de una diana en la salud y enfermedad. Los ensayos fenotípicos representativos, que se pueden adquirir de uno cualquiera de los numerosos proveedores comerciales, incluyen aquellos para la determinación de la viabilidad celular, la citotoxicidad, la proliferación o la supervivencia (Molecular Probes, Eugene, OR; PerkinElmer, Boston, MA), los ensayos basados en proteínas que incluyen los ensayos enzimáticos (Panvera, LLC, Madison, WI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Oncogene Research Products, San Diego, CA), regulación celular, transducción de la señal, inflamación, procesos oxidativos y apoptosis (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI), acumulación de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), ensayos de angiogénesis, ensayos de formación de tubos, ensayos de citoquinas y hormonas y ensayos metabólicos (Chemicon International Inc., Temecula, CA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

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

Los criterios de valoración fenotípicos incluyen cambios en la morfología celular en el tiempo con la dosificación del tratamiento así como los cambios en los niveles de los componentes celulares tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas, sacáridos o metales. Las medidas del estado celular que incluyen el pH, la fase del ciclo celular, la absorción o la excreción por la célula de los indicadores biológicos, también es un criterio de valoración de interés.

La medida de la expresión de uno o más de los genes de la célula después del tratamiento también se utiliza como un indicador de la eficacia o de la potencia de los inhibidores de la diana. Los genes distintivos, o aquellos de los que se sospecha que están asociados con un estado de enfermedad, afección o fenotipo específicos, se miden tanto en las células tratadas como en las no tratadas.

Estudios *In vivo*

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

Ejemplo 51**Aislamiento de ARN****Aislamiento de ARNm Poli(A) +**

En determinadas realizaciones, se aísla ARNm poli(A)+ de acuerdo con Miura y col., (Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764). Otros procedimientos para el aislamiento ARNm poli(A)+ son rutinarios en la técnica. En resumen, para las células desarrolladas sobre placas de 96 pocillos, se retira el medio de crecimiento de las células y se lava cada pocillo con 200 µl de PBS frío. Se añaden 60 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, NP-40 al 0,5%, complejo de vanadil-ribonucleósido 20 mM) a cada pocillo, la placa se agita suavemente, y después incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se transfieren 55 µl de producto lisado a las placas de 96 pocillos recubiertas con Oligo d(T) (AGCT Inc., Irvine CA). Las placas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavan tres 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, la placa se transfiere a toallas de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado y después se seca al aire durante 5 minutos. Se añaden a cada pocillo 60 µl de tampón de elución (Tris-HCl 5 mM pH 7,6), precalentado a 70 °C, se incuba la placa sobre una placa caliente a 90 °C durante 5 minutos y el producto eluido después se transfiere a una placa nueva de 96 pocillos.

Las células desarrolladas sobre placas de 100 mm u otras placas convencionales se pueden tratar de manera similar, usando los volúmenes apropiados de todas las disoluciones.

Aislamiento del ARN Total

El ARN total se aísla usando un kit RNEASY 96™ y tampones adquiridos en Qiagen Inc. (Valencia, CA) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. En resumen, para las células desarrolladas sobre las placas de 96 pocillos, se separa en medio de crecimiento de las células y se lava cada pocillo con 200 µl de PBS frío. Se añaden 150 µl de tampón RLT a cada pocillo y la placa se agita vigorosamente durante 20 segundos. Entonces se añaden 150 µl de etanol al 70% a cada pocillo y los contenidos se mezclan pipeteando arriba y abajo tres veces. Las muestras de transfieren después a la placa de pocillos RNEASY 96™ unida a un colector QIAVAC™ equipado con una bandeja de recogida de desechos y unido una fuente de vacío. El vacío se aplica durante 1 minuto. Se añaden 500 µl de Tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se incuban durante 15 minutos y se aplica de nuevo el vacío durante 1 minuto. Se añaden 500 µl adicionales de Tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplica de nuevo el vacío durante 2 minutos. Después se añade 1 ml de Tampón RPE a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplica vacío durante un periodo de 90 segundos. Después se repite el lavado con Tampón RPE y se aplicará el vacío durante 3 minutos adicionales. Después se retira la placa del colector QIAVAC™ y se seca sobre toallas de papel. Después se vuelve a unir la placa al colector QIAVAC™ equipado con una colección de tubos de recogida que contiene tubos de recogida de 1,2 ml. Después se diluye el ARN pipeteando 140 µl de agua sin ARNasa en cada pocillo, incubando 1 minuto y aplicando después vacío durante 3 minutos.

El pipeteado repetitivo y las etapas de elución se pueden automatizar usando un QIAGEN Bio-Robot 9604 (Qiagen, Inc., Valencia CA). Esencialmente, después de revisar las células de la placa de cultivo, la placa se transfiere a la pletina del robot donde se llevan a cabo las etapas de pipeteado, tratamiento con ADNasa y elución.

Ejemplo 52**Análisis de PCR Cuantitativa en Tiempo Real de los Niveles de ARNm diana**

En determinadas realizaciones, la cuantificación de los niveles de ARNm diana se consigue por PCR cuantitativa usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM™ 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este es un sistema de detección de 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. En oposición a la PCR estándar en la que los productos de amplificación se cuantifican después de completar la PCR, los productos de la PCR cuantitativa en tiempo real se cuantifican a medida que se acumulan. Esto se consigue incluyendo en la reacción de PCR una sonda oligonucleotídica que hibrida específicamente entre los cebadores directo e inverso de la PCR y que contiene dos colorantes fluorescentes. Se une un colorante informador, (por ejemplo, FAM o JOE, obtenido de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o de Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) al extremo 5' de la sonda y se une un colorante interruptor (por ejemplo, TAMRA, obtenido de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o de Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y los colorantes están intactos, la emisión del colorante informador se inactiva por la proximidad del colorante 3' interruptor. Durante la amplificación, la hibridación de la sonda a la secuencia diana crea un sustrato que se puede extinguir por la actividad exonucleasa 5' de la polimerasa Taq. Durante la fase de extensión del ciclo de amplificación de la PCR, la escisión de la sonda por la polimerasa Taq libera colorante informador del resto de la sonda (y por consiguiente del resto) y se genera una señal de fluorescencia específica de la secuencia. Con cada ciclo, se escinden moléculas adicionales de colorante informador de sus respectivas ondas y se monitoriza la intensidad de fluorescencia a intervalos regulares mediante óptica láser montada en el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM™. En cada ensayo, una serie de

reacciones paralelas que contienen las diluciones seriadas de ARNm de muestras de control no tratadas genera una curva patrón que se usa para cuantificar el porcentaje de inhibición de las muestras de ensayo después del tratamiento con los oligonucleótidos antisentido.

- 5 Antes del análisis de PCR cuantitativo, se evalúan los grupos de cebadores-sondas específicos para el gen diana cuya capacidad para ser "multiplexado" con una reacción de amplificación de GAPDH se está midiendo. En la multiplexación, tanto el gen diana como el gen patrón interno GAPDH se amplifican concurrentemente en una muestra única. En este análisis, en ARNm aislado de las células no tratadas se diluye seriadamente. Cada función se amplifican en presencia de grupos de cebadores-sondas específicos solamente para GAPDH, solamente gen diana ("uniplexación") o ambos (multiplexación). Después de la amplificación por PCR, se generan las curva patrón de GAPDH y de señal ARNm diana como una función de la dilución a partir de las muestras tanto de la uniplexación como de la multiplexación. Si tanto la pendiente como el coeficiente de correlación de GAPDH y las señales diana generadas a partir de las muestras de multiplexación están dentro del 10% de sus valores correspondientes generados a partir de las muestras de uniplexación, se considera que el grupo de cebadores-sonda específico para esa diana es multiplexable. También se conocen en la técnica otros procedimientos de PCR.
- 10
- 15 Se obtuvieron los reactivos RT y PCR de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La RT, PCR en tiempo real se lleva a cabo añadiendo 20 µl de cóctel para PCR (2,5 x tampón de PCR menos MgCl₂, MgCl₂ 6,6 mM, cada uno de los dATP, dCTP, dGTP y dTTP 375 µM cada uno, cada uno de los cebadores directo e inverso 375 nM, sonda 125 nM, 4 Unidades de inhibidor ARNasa, 1,25 Unidades PLATINUM® Taq, 5 Unidades de transcriptasa inversa MuLV y 2,5x de colorante ROX) a las placas de 96 pocillos que contenían 30 µl de disolución de ARN total (20-200 ng). La reacción de se lleva a cabo mediante la incubación durante 30 minutos a 48 °C. Después de una incubación de 10 minutos a 95 °C para activar el PLATINUM® Taq, se realizaron 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido de 60 °C durante 1,5 minutos (hibridación/extensión).
- 20

- 25 En determinadas realizaciones, las cantidades de diana genética obtenidas mediante RT. Se normalizan por PCR en tiempo real usando cualquier nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante o mediante la cuantificación del ARN total usando RIBOGREEN™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH se cuantifica mediante RT-PCR en tiempo real, haciéndolos funcionar simultáneamente con la diana, mediante multiplexación o por separado. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación RiboGreen™ ARN (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Los procedimientos de cuantificación de ARN mediante REBOGREEN™ se enseñan en Jones, L.J., y col. (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374).
- 30 En este ensayo, se pipetea 170 µl de reactivo de trabajo RIBOGREEN™ (reactivo RIBOGREEN™ diluido 1:350 en Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) en una placa de análisis pocillos que contiene 30 µl de ARN celular, purificado. La placa se lee en un CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm.

Ejemplo 53

Cebadores y sondas específicos de la diana

- 35 Se pueden diseñar sondas y cebadores para que hibriden con una secuencia diana, usando la información de las secuencias publicadas.

Por ejemplo, para PTEN humano, se diseño el siguiente grupo de cebador-sonda usando la información de la secuencia publicada (número de acceso GENBANK™ U92436,1, SEQ ID NO: 01).

Cebador directo: AATGGCTAAGTGAAGATGACAATCAT (SEQ ID NO: 02)

- 40 Cebador inverso: TGCACATATCATTACACCAGTTCGT (SEQ ID NO: 03). Y la sonda PCR:

FAM-TTGCAGCAATTCAGTGTAAGCTGGAAAGG-TAMRA (SEQ ID NO: 04), en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador.

Ejemplo 54

Análisis de transferencia Western de los niveles de proteína diana

- 45 Se lleva a cabo el análisis de transferencia Western (análisis de inmunotransferencia) de manera rutinaria usando los procedimientos estándar. Las células se recogen 16-20 h después del tratamiento con oligonucleótido, se lavan una vez con PBS, se suspenden en tampón de Laemmli (100 µl/pocillo), se hierven durante 5 minutos y se cargan en un gel de SDS-PAGE al 16%. Los geles se hacen correr durante 1,5 horas a 150 V y se transfieren a la membrana para la transferencia western. Se usa el anticuerpo primario apropiado dirigido a una diana, con un anticuerpo secundario radiomarcado o marcado fluorescentemente dirigido contra la especie de anticuerpo primario. Se visualizan las bandas usando un PHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA).
- 50

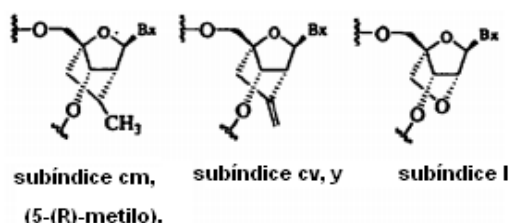
Ejemplo 55

Estudio in vitro de los efectos de los compuestos antisentido dirigidos a PTEN

Los compuestos oligoméricos se sintetizaron y se ensayaron por su capacidad para reducir la expresión de PTEN a lo largo de un intervalo de dosificaciones. Se trataron los hepatocitos primarios de ratón con los oligómeros modificados enumerados a continuación con las concentraciones de 0,625, 12,5, 25, 50, 100 y 200 nM usando Citofectina con los procedimientos descritos en el presente documento. Se determinaron los niveles de expresión de PTEN usando PCR en tiempo real y se normalizaron con RIBOGREEN™ como se ha descrito en otros ejemplos en el presente documento. Se determinó el porcentaje de inhibición de ARNm con PTEN. Las curvas resultantes de dosificación-respuesta se usaron para determinar el IC₅₀ y se evaluaron las Temperaturas en tampón fosfato 100 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7, a 260 nm usando oligómeros modificados 4 μM y ARN coincidente de longitud complementaria 4 μM. las actividades se enumeran a continuación.

SEQ ID NO/ ISIS NO	Secuencia	IC ₅₀	T °C
05/394425	Me _x C ₁ T ₁ GCTAGCCTCTGGATT ₁ T ₁ *	42	61,6
06/411001	C _{cm} U _{cm} GCTAGCCTCTGGATU _{cm} U _{cm} *	49	58,8
06/425453	C _{cv} U _{cv} GCTAGCCTCTGGATU _{cv} U _{cv}	44	60,5

Cada grupo de enlace internucleósido es un fosforotioato; el superíndice Me indica que la citidina siguiente es 5-metil citidina; cada nucleósido no anotado de otra manera es un 2'-desoxiribonucleósido y los nucleósido seguidos de un subíndice se definen como se muestra a continuación:



% de control de ARNm PTEN no tratado @
Dosificación (nM)

SEQ ID NO/ ISIS NO	6,25	12,5	25	50	100	200
05/394425	136	97	73	39	16	3
06/411001	128	94	96	41	21	4
06/425453	116	95	82	39	15	3.

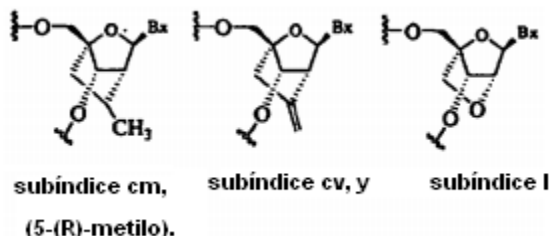
Ejemplo 56

Estudio in vivo de los efectos de los compuestos antisentido dirigidos a PTEN

Se inyectaron una vez ratones de Balb/c de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) con oligómeros modificados dirigidos a PTEN con dosificaciones de 32, 10, 32 y 100 mg/kg. Los ratones se sacrificaron 64 horas después de la administración final. Los tejidos derivados se homogeneizaron y se cuantificaron los niveles de ARNm a PTEN usando la PCR en tiempo real y un reactivo de cuantificación de ARN y RI-BOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Se determinaron los niveles de ARNm a PTEN relativo al ARN total (usando Ribogreen), antes de la normalización con un control tratado con salino. Las actividades relativas de los compuestos antisentido se muestran a continuación con los resultados presentados como el % de inhibición media de la expresión de ARNm para cada compuesto antisentido, normalizado con un control de inyección con suero salino.

SEQ ID NO/ ISIS NO	Secuencia	PTEN % Inhibición (dosificación mg/Kg)			
		1,9	6	19	60
05/394425	Me _x C ₁ T ₁ GCTAGCCTCTGGATT ₁ T ₁ *	0	65	92	96
06/411001	C _{cm} U _{cm} GCTAGCCTCTGGATU _{cm} U _{cm} *	0	10	56	89
06/425453	C _{cv} U _{cv} GCTAGCCTCTGGATU _{cv} U _{cv}	29	57	83	95

Cada grupo de enlace internucleósido es un fosforotioato; el superíndice Me indica que la citidina siguiente es 5-metil citidina; cada nucleósido no anotado de otra manera es un 2'-desoxiribonucleósido y los nucleósidos seguidos de un subíndice se definen como se muestra a continuación:



- 5 Se midieron los niveles de ALT y AST en ratones tratados con los oligómeros antisentido 394425, 411001 y 425453. Se analizó el suero por LabCorp Testing Facility (San Diego, CA) y se midieron los niveles ALT y AST en suero relativo a los ratones inyectados con solución salina. Los niveles aproximados de ALT y AST se enumeran en la tabla siguiente.

SEQ ID NO/ ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ED ₅₀
05/394425	no disponible			4,8
	1,9	31	59	
	6	28	51	
	19	55	91	
	60	1445	1249	
06/411001	no disponible			16,0
	1,9	32	67	
	6	30	66	
	19	25	68	
	60	25	66	
06/425453	no disponible			4,0
	1,9	26	45	
	6	30	59	
	19	30	49	
	60	234	164	
Salino	no disponible	33	87	no disponible.

10

Mientras que en la memoria descriptiva precedente se ha descrito la presente invención en relación a determinadas realizaciones de la misma y muchos detalles se han expuesto a objeto de la ilustración, para los expertos en la materia será obvio que la presente invención es susceptible de realizaciones adicionales y que determinados detalles descritos en el presente documento se pueden variar de manera considerable sin apartarse de los principios básicos de la presente invención, como se define las reivindicaciones.

15

Listado de secuencias

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
Seth, Punit
P. Swayze, Eric E.

20 <120> ANÁLOGOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS BICÍCLICOS
CARBOCÍCLICOS

<130> P053912EP

<140> EP 08780773.1

<141> 06-06-2008

25 <150> US 60/942.824

<151> 08-06-2007

<150> US 60/978.671
<151> 09-10-2007

<150> US 60/948.024
<151> 05-07-2007

5 <160> 6

<170> FastSEQ para la Versión 4.0 de Windows

<210> 1
<211> 3160
<212> DNA

10 <213> H. Sapiens

<400> 1

```

cctccccctcg cccgggcgcgg tccccgtccgc ctctcgctcg cctccccgcct cccctcggtc 60
ttccgagggcg cccgggctcc cggcgcgggcg gcggagggggg cgggcaggcc ggcgggcggt 120
gatgtggcag gactctttat gcgctgcggc aggatacgcg ctcggcgctg ggacgcgact 180
gcgctcagtt ctctctctc ggaagctgca gccatgatgg aagtttgaga gttgagccgc 240
tgtgagggcga ggccggggtc aggcgagggga gatgagagac ggcgggcgcc gcggcccgga 300
gccccctctca gcgcctgtga gcagccgcgg gggcagcgcc ctcggggagc cggccggcct 360
gcggcgggcg cagcggcggc gtttctcgcc tcctcttcgt cttttctaac cgtgcagcct 420
cttctcggc ttctctgaa aggggaagggt gaagccgtgg gctcgggcg ggacggctg 480
aggcgcgggc gcggcgggcg cggcacctcc cgctcctgga gcggggggga gaagcgcg 540
cggcgggcg cgcggcggt gcagctccag ggaggggggtc tgagtcgcct gtcaccattt 600
ccagggtgg gaacgcggga gagttggtct ctccccctt actgcctcca acacggcggc 660
ggcgggcggc gcacatccag ggacccgggc cggttttaa cctcccgctc gccggcgccg 720
caccctccgt ggccggggt ccggagggcg ccggcgggag cagccggtcg gaggattatt 780
cgtcttctcc ccattccgt gccgcgctg ccaggcctct ggctgctgag gagaagcagg 840
cccagtcgt gcaaccatcc agcagccgcc gcagcagcca ttaccggct gcggtccaga 900
gccaaagcggc ggagagcga ggggcatcag ctaccgcca gtccagagcc atttccatcc 960
tgcagaagaa gccccgccac cagcagcttc tgccatctct ctctccctt ttcttcagcc 1020
acaggctccc agacatgaca gccatcatca aagagatcgt tagcagaaac aaaaggagat 1080
atcaagagga tggattcgac tttagactga cctatattta tccaaacatt attgctatgg 1140
gatttcctgc agaaagactt gaaggcgtat acaggaacaa tattgatgat gtagtaagg 1200
ttttggattc aaagcataaa aaccattaca agatatacaa tctttgtgct gaaagacatt 1260
atgacaccgc caaatttaat tgcagagttg cacaatatcc ttttgaagac cataaccac 1320
cacagctaga acttatcaaa cccttttgtg aagatcttga ccaatggcta agtgaagatg 1380
acaatcatgt tgcagcaatt cactgtaaag ctggaaagg acgaactggt gtaatgatat 1440
gtgcatattt attacatcgg ggcaaat taaaggcaca agaggcccta gatttctatg 1500
gggaagtaag gaccagagac aaaaaggag taactattcc cagtcagagg cgctatgtgt 1560
attattatag ctacctgtta aagaatcatc tggattatag accagtggca ctgtgtttc 1620
acaagatgat gtttgaaact attccaatgt tcagtggcgg aacttgcaat cctcagttt 1680
tggcttgcca gctaaagggt aagatatatt cctccaattc aggaccaca cgacgggaag 1740
acaagttcat gtactttgag ttccctcagc cgttacctgt gtgtggtgat atcaaagtag 1800
agttcttcca caaacagaac aagatgctaa aaaaggacaa aatgtttcac ttttgggtaa 1860
atacattctt cataccagga ccagaggaaa cctcagaaaa agtagaaat ggaagtctat 1920
gtgatcaaga aatcgatagc atttgcagta tagagcgtgc agataatgac aaggaatatc 1980

```

```

tagtacttac ttttaacaaaa aatgatcttg acaaagcaaa taaagacaaa gccaacccgat 2040
acttttctcc aaatttttaag gtgaagctgt acttcacaaa aacagtagag gagccgtcaa 2100
atccagaggc tagcagttca acttctgtaa caccagatgt tagtgacaat gaacctgac 2160
attatagata ttctgacacc actgactctg atccagagaa tgaacctttt gatgaagatc 2220
agcatacaca aattacaaaa gtctgaattt ttttttatca agagggataa aacaccatga 2280
aaataaactt gaataaactg aaaatggacc tttttttttt taatggcaat aggacattgt 2340
gtcagattac cagttatagg aacaattctc ttttcctgac caatcctgtt ttacctata 2400
catccacagg gttttgacac ttgttgctca gttgaaaaaa ggttggtgtag ctgtgtcatg 2460
tatatacctt tttgtgtcaa aaggacattt aaaattcaat taggattaat aaagatggca 2520
ctttcccggt ttattccagt tttataaaaa gtggagacag actgatgtgt atacgtagga 2580
attttttcct tttgtgttct gtcaccaact gaagtggcta aagagctttg tgatatactg 2640
gttcacatcc tacccttttg cacttggtgg aacagataag tttgcagttg gctaagagag 2700
gtttccgaaa ggttttgcta ccattctaata gcatgtattc gggtaggggc aatggagggg 2760
aatgctcaga aaggaaataa ttttatgctg gactctggac catataccat ctccagctat 2820
ttacacacac ctttcttttag catgctacag ttattaatct ggacattcga ggaattggcc 2880
gctgtcactg cttgttggtt gcgcattttt ttttaaagca tattggtgct agaaaaggca 2940
gctaaaggaa gtgaatctgt attgggggtac aggaatgaac cttctgcaac atcttaagat 3000
ccacaaatga agggatataa aaataatgtc ataggtaaga aacacagcaa caatgactta 3060
accatataaa tgtggaggct atcaacaaag aatgggcttg aaacattata aaaattgaca 3120
atgatttatt aaatatgttt tctcaattgt aaaaaaaaaa 3160

```

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 2

aatggctaag tgaagatgac aatcat 26

10 <210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 3

tgcacatatt attacaccag ttcgt 25

<210> 4

<211> 30

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 4

25 ttgcagcaat tctgtgtaa gctggaaagg 30

<210> 5

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 5

ctgctagcct ctggattt 18

<210> 6

35 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

5

<222> 1, 2, 15, 16

<223> Bases en estas posiciones son ARN

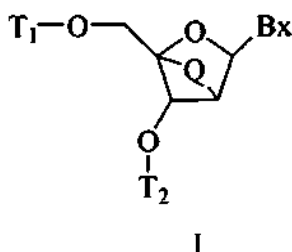
<400> 6

cugctagcct ctggatuu

18

REIVINDICACIONES

1. Un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula I:



en la que:

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

uno de T₁ y T₂ es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro de T₁ y T₂ es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo;

Q es C(q₁)=C(q₃), C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)];

q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H, 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)O₁, 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;

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, 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, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector, en el que

el grupo reactivo fósforo es fosforamidita, H-fosfonato, triéster de fosfato o un fósforo que contiene un grupo auxiliar quiral.

2. El nucleósido bicíclico de la reivindicación 1 en el que Q es 4'-C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)]-2'.

3. El nucleósido bicíclico de la reivindicación 1 en el que 4'-C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄)-2'.

4. El nucleósido bicíclico de la reivindicación 1 en el que Q es 4'-C(q₁)=C(q₃)-2'.

5. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que q₁, q₂, q₃ y q₄, cuando están presentes, son cada uno H.

6. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que uno de q₁, q₂, q₃ y q₄ es distinto de H y los grupos restantes de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H.

7. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ es distinto de H y los grupos restantes de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H.

8. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6 y 7 en el que los grupos q₁, q₂, q₃ y q₄, cuando están presentes, son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆.

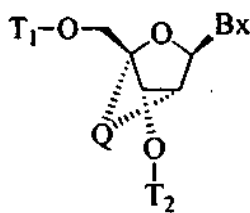
9. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 8 en el que q₁, q₂, q₃ y q₄, cuando están presentes, son cada uno independientemente, H, CH₃ o F.

10. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que Bx es uracilo, timina, citosina, 5-metilcitosina, 5-tiazolo-uracilo, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina, 2,6-diaminopurina u otras purinas o pirimidinas sustituidas o no sustituidas.

11. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que T₁ es 4,4'-dimetoxitritilo.

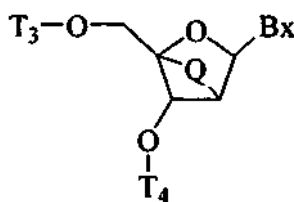
12. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que T₂ es diisopropilcianoetofofosforamidita o H-fosfonato.

13. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que tiene la configuración de Fórmula Ia:



Ia.

14. Un compuesto oligomérico que comprende al menos un nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV:



IV

5 en la que, independientemente, para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV:

Bx es un resto alcalino heterocíclico;

uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleósido que enlaza el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV con el compuesto oligomérico y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido, un grupo 5' o 3' terminal o un grupo de enlace internucleósido que enlaza el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV con el compuesto oligomérico;

Q es C(q₁)=C(q₃), C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)];

q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H, 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;

en el que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o polisustituido con grupo 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;

cada grupo J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, aminoalquilo C₁-C₆ o un grupo protector, en el que

el término "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero que tiene al menos una región que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico.

15. El compuesto oligomérico de la reivindicación 14 en el que para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV, Q es 4'-C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)]-2'.

16. El compuesto oligomérico de la reivindicación 14 en el que para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV, Q es 4'-C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄)-2'.

17. El compuesto oligomérico de la reivindicación 14 en el que para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV, Q es 4'-C(q₁)=C(q₃)-2'.

18. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 en el que para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV, q₁, q₂, q₃ y q₄, cuando están presentes, son cada uno H.

19. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 en el que, independientemente, para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV, uno de q₁, q₂, q₃ y q₄ es distinto de H y los grupos restantes de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H.

20. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 en el que, independientemente, para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV, dos de q₁, q₂, q₃ y q₄ son distintos de H y los grupos restantes de q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno H.

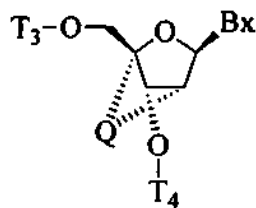
21. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20 en el que, independientemente, para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV, q₁, q₂, q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆.

22. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21 en el que, independientemente, para cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV, q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, H, CH_3 o F.

23. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22 en el que cada grupo Bx es uracilo, timina, citosina, 5-metilcitosina, 5-tiazolo-uracilo, 5-tiazolo-citosina, adenina, guanina, 2,6-diaminopurina u otras purina o pirimidina sustituida o no sustituida.

24. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23 en el que al menos uno de T_3 y T_4 es un grupo 5' o 3' terminal.

25. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24 en el que cada nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV tiene la configuración de Fórmula IVa:



IVa.

26. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 en el que cada grupo de enlace internucleósido es, independientemente, un fosfodiéster o un fosforotioato.

27. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26 que comprende al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen dicha fórmula localizada en el extremo 3' o 5' del compuesto oligomérico.

28. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 que comprende un compuesto oligomérico hueco que tiene al menos dos regiones, y cada región comprende de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen dicha fórmula, en el que una de dichas regiones de los nucleósidos bicíclicos que tienen 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 donaciones externas se separan por una región interna de comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades de monómeros seleccionados independientemente entre nucleósidos y nucleósidos modificados.

29. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 28 que comprende una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 monómeros.

30. Un procedimiento de inhibición de la expresión genética *in vitro* que comprende poner en contacto de una o más células o un tejido con un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29.

31. Un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29 para su uso en un procedimiento de inhibición de la expresión genética *in vivo* y dicho procedimiento comprende poner en contacto de una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29.

32. Un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29 para su uso en terapia médica.