

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 709**

51 Int. Cl.:
C07H 19/067 (2006.01)
C07H 19/167 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07C 255/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05780944 .4**
96 Fecha de presentación: **25.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1795536**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2007**

54 Título: **Compuesto de fosforamidita y método para producir un oligo-ARN**

30 Prioridad:
26.08.2004 JP 2004246185
07.04.2005 JP 2005110817
01.07.2005 JP 2005193313

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.08.2012

73 Titular/es:
NIPPON SHINYAKU CO., LTD.
14, KISSHOIN NISHINOSHO MONGUCHICHO,
MINAMI-KU
KYOTO-SHI, KYOTO 601-8550, JP

72 Inventor/es:
OHGI, Tadaaki;
ISHIYAMA, kouichi y
MASUTOMI, YutakaRoom 2-1C, Nippon Shinyaku

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 386 709 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

Compuesto de fosforamidita y método para producir un oligo-ARN.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un novedoso compuesto de fosforamidita en el que se introduce un novedoso grupo protector en el grupo 2'-hidroxilo y a un agente para introducir el grupo protector.

Antecedentes de la invención

10 Los ácidos oligorribonucleicos (oligo-ARN) son útiles como sondas de ARN para el análisis génico, materiales farmacéuticos de ARN (ARN antisentido, ribozimas, ARN para el control de la expresión génica mediada por ARNi), enzimas artificiales y aptámeros. Un procedimiento de síntesis sólida para preparar oligo-ARN se estableció a fines de la década de 1980. En el primer informe del procedimiento se usaron los compuestos de fosforamidita con terc-butildimetilsililo (TBDMS) o triisopropilsililo (TIPS) como un grupo protector 2'-hidroxilo (documento no patente 1).

La síntesis química de los oligo-ARN presenta muchos más problemas que la síntesis química de los ácidos oligodesoxirribonucleicos (oligo-ADN) constituidos solamente por desoxirribonucleótidos.

15 Por ejemplo, el uso del grupo TBDMS como un grupo protector de 2'-hidroxilo puede causar una reacción secundaria en la cual el grupo TBDMS que protege al grupo 2'-hidroxilo migra al grupo 3'-hidroxilo durante la fosforamidación del grupo 3'-hidroxilo.

20 Además, el uso de un sustituyente voluminoso tal como el grupo TBDMS como grupo protector de 2'-hidroxilo puede reducir la tasa de la reacción de condensación para la formación de la unión de internucleótidos debido al impedimento estérico en la cercanía del átomo de fósforo en la posición 3', resultando posiblemente en la escisión o reorganización del enlace de los internucleótidos durante la eliminación del grupo protector 2'-hidroxilo luego de la oligomerización.

Con el objetivo de superar los problemas planteados anteriormente, actualmente se están investigando los procedimientos más eficientes para sintetizar oligo-ARN.

25 Como grupo protector de 2'-hidroxilo, se sabe que el grupo 1-(2-cianoetoxi)etilo (CEE) se elimina junto con el grupo protector de bissililo 3' y 5' en condiciones neutras capaces de eliminar el grupo protector de bissililo (documento no patente 2).

30 En base a esta información, Wada desarrolló un compuesto de fosforamidita para producir oligo-ARN en los cuales el grupo CEE, que es capaz de eliminarse en condiciones neutras, se introduce en el grupo 2'-hidroxilo (documento no patente 3 y documento no patente 4). Sin embargo, dado que la introducción del grupo CEE en la posición 2'-hidroxilo conduce a la formación de un nuevo centro asimétrico, los oligo-ARN en los cuales los grupos 2'-hidroxilo son protegidos por el grupo CEE están en una mezcla diaestereoisomérica. Por lo tanto, la purificación y el aislamiento del oligo-ARN es complicado. Además, dado que los oligo-ARN en los cuales se introdujo el grupo CEE tienen un grupo metilo en el carbono unido al átomo 2'-oxígeno, se espera algún impedimento estérico alrededor del átomo de fósforo unido al grupo 3'-hidroxilo, lo que genera preocupaciones sobre una reducción en la eficiencia de condensación y la tasa de reacción de condensación.

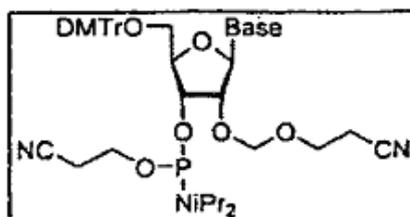
Documento no patente 1: N. A. Usman et al., Journal of the American Chemical Society, Vol. 109, 7845 (1987)

Documento no patente 2: Wolfgang Pfeleiderer et al., Helvetica Chimica Acta, Vol. 81, 1545 (1998)

Documento no patente 3: Takeshi Wada, Bioindustry, Vol. 21, No. 1, 17 (2004)

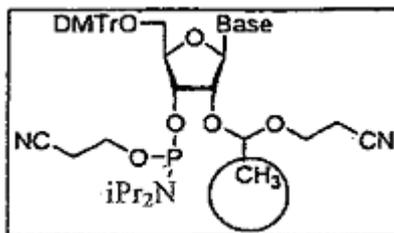
Documento no patente 4: T. Umemoto et al., Tetrahedron Letters, Vol. 45, 9529 (2004)

40 La publicación ORGANIC LETTERS, ACS, COLUMBUS, OH; ESTADOS UNIDOS, vol. 7, No. 16, 1º de enero de 2005 (2005-01-01), páginas 3477-3480, se refiere a un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general útil para sintetizar oligómeros de ARN.

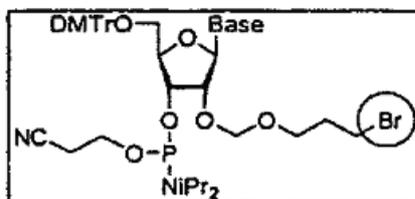


La publicación TET. LETTERS, vol. 45, No. 52, 20 de diciembre de 2004 (2004-12-20), páginas 9529-9531, se

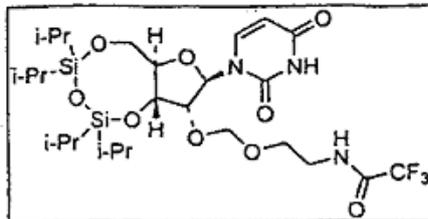
refiere a un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general útil para sintetizar oligonucleótidos. El compuesto de fosoramidita se sustituye por metilo en el átomo de carbono que se une al 2'-hidroxilo.



- 5 La publicación HELVETICA CHIMICA ACTA, CH, vol. 83, 1º de enero de 2000 (2000-01-01), páginas 1127-1144, se refiere a una preparación de bloques de construcción para la incorporación de ribonucleótidos sustituidos por 2'-O-[(3-bromopropoxi)metilo] representados por la siguiente fórmula general en secuencias de oligonucleótidos. El compuesto es útil para introducir funcionalidades adicionales en la posición 2'-O de oligonucleótidos.

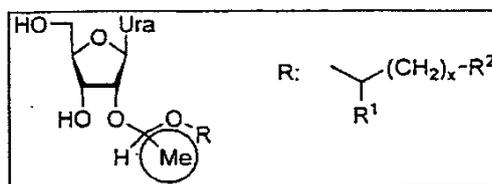


- 10 La BASE DE DATOS CAPLUS (en línea), CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, No. de acceso a la base de datos STN 2001:675264, se refiere a un procedimiento para sintetizar una ribonucleasa artificial que tiene funcionalidades adicionales usando el compuesto intermediario representado por la siguiente fórmula general.

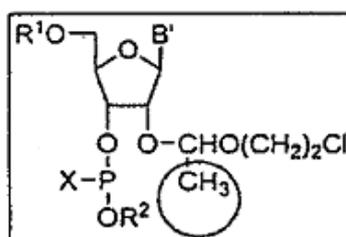


- 15 La publicación HELVETICA CHIMICA ACTA, 81 (8), 1545-1566, divulga compuestos de acetal representados por las siguientes fórmulas generales.

Los compuestos se sustituyen por metilo en el átomo de carbono que se une al 2'-hidroxilo.



- 20 El documento JP-A-3 074 398 se refiere a un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general útil para sintetizar oligonucleótidos. El compuesto de fosoramidita se sustituye por metilo en el átomo de carbono que se une al 2'-hidroxilo.

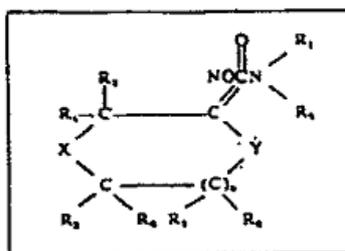


El documento JP-A-7 502 037 en la BASE DE DATOS DE CHEMICAL ABSTRACTS (en línea), No. de acceso de la base de datos (4063g-i), no divulga que los compuestos de JP-A-7 502 037 en la BASE DE DATOS DE CHEMICAL ABSTRACTS (en línea), No. de acceso de base de datos (4063g-i) son útiles como un reactivo para producir el compuesto de fosforamidita (1) de la presente invención.

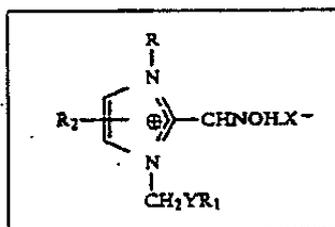
- 5 El documento JP-A-7 502 037 (Estados Unidos 5.504.263) se refiere a un proceso para la producción de hidrofluorocarburos de α -fluoroéteres, tales como $FCH_2OCH_2CH_2F$, y un proceso para la producción de α -fluoroéteres y novedosos α -fluoroéteres adecuados para el uso en la producción de hidrofluorocarburos.

El documento JP 62 116 533 A (Estados Unidos 4.629.814) se refiere a un proceso mejorado para la preparación de ciertos éteres de bis-bromoalquilo, tales como $BrCH_2OCH_2CH_2Br$.

- 10 El documento JP 49 126 825 A (Estados Unidos 3.956.500) se refiere a una novedosa 1,3-oxatolano y 1,4 oxatiano carbamoiloxima representada por la siguiente fórmula.



El documento US-A-4.925.856 se refiere a una sal de aldoxima útil en el tratamiento de envenenamiento por ciertos productos químicos que contienen fósforo.



- 15 La publicación J. ORG. CHEM., vol. 46, No. 3, 1981, páginas 571-577, se refiere a una preparación, un estudio estructural de resonancia magnética y una capacidad alquilante con respecto a iones de (haloalquil)oxonio y (haloalquil)carboxonio.

- 20 La publicación TET LETTERS vol. 26, 1973, páginas 2407-2408, se refiere a una reactividad con respecto a vinilcuprato.

La BASE DE DATOS DE CHEMICAL ABSTRACTS (en línea), No. de acceso de la base de datos (4063g-i) se refiere a una preparación de derivados de fluoroetanol, tales como $ClCH_2OCH_2CH_2F$.

Divulgación de la invención

Problema a solucionar mediante la invención

- 25 Un objetivo principal de la presente invención es proporcionar un compuesto de fosforamidita novedoso y útil para un procedimiento de síntesis de alto rendimiento para oligo-ARN.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto de éter novedoso que pueda usarse para acoplar un grupo protector al grupo 2'-hidroxilo de ribosa, en donde el grupo protector puede eliminarse en condiciones neutras.

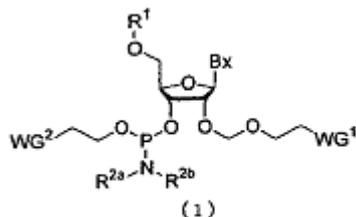
- 30 **Medios para resolver los problemas**

Luego de estudios intensivos y diligentes, los inventores de la presente invención encontraron un compuesto que podría lograr los objetivos anteriores y, por lo tanto, se completó la presente invención.

I. Un compuesto de fosforamidita de la presente invención

- 35 La presente invención puede incluir un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1) (a la que se hace referencia de aquí en adelante como "compuesto de fosforamidita de la presente invención").

[Quím. 1]

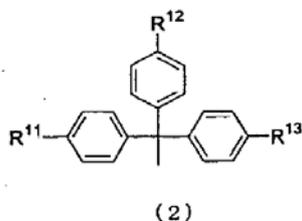


en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector;

- 5 R^1 es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),

[Quím. 2]



R^{11} , R^{12} y R^{13} son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi.

- 10 R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo, o R^{2a} y R^{2b} , junto con el átomo de nitrógeno adyacente, pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y WG^1 representa ciano, nitro, alquil C_1 - C_5 sulfonilo o halógeno y WG^2 representa un grupo de extracción de electrones.

- 15 Los ejemplos de la "nucleobase" B_x no se limitan particularmente en la medida que es una nucleobase usada en la síntesis de un ácido nucleico y puede incluir, por ejemplo, adenina, guanina, citosina, uracilo o una forma modificada de los mismos.

Una "forma modificada" de una nucleobase significa un compuesto en el cual una nucleobase tiene uno o más sustituyentes arbitrarios.

- 20 Los ejemplos del "sustituyente" para la "forma modificada" de B_x pueden incluir halógeno, acilo, alquilo, arilalquilo, alcoxi, alcoxialquilo, hidroxilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, carboxi, ciano y nitro. La forma modificada de B_x puede sustituirse por 1 a 3 de estos sustituyentes.

La nucleobase B_x puede estar protegida. Particularmente, es preferible que se proteja el grupo amino de una nucleobase que tiene un grupo amino, tal como adenina, guanina y citosina.

- 25 El grupo protector del grupo amino no se limita particularmente en la medida que es un grupo protector usado como un grupo protector de un ácido nucleico y puede incluir, por ejemplo, benzoilo, 4-metoxibenzoilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-terc-butilfenoxiacetilo, 4-isopropilfenoxiacetilo y (dimetilamino)metileno.

Los ejemplos del "grupo cíclico amino saturado" de R^2 pueden incluir pirrolidina-1-ilo, piperidina-1-ilo, morfolina-1-ilo y tiomorfolina-1-ilo.

- 30 Los grupos de extracción de electrones WG^1 y WG^2 pueden incluir ciano, nitro, alquilsulfonilo y halógeno. Entre ellos, es preferible el ciano.

Los ejemplos del "halógeno" del compuesto de fosforamidita de la presente invención pueden incluir flúor, cloro, bromo y yodo.

- 35 Los ejemplos del "acilo" del compuesto de fosforamidita de la presente invención pueden incluir un alcanilo recto o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y un aroilo que tiene de 7 a 13 átomos de carbono. Específicamente, el acilo puede incluir, por ejemplo, formilo, acetilo, n-propionilo, isopropionilo, n-butirilo, isobutirilo,

terc-butirilo, valerilo, hexanoilo, benzoilo, naftoilo y levulinilo.

5 Los ejemplos del "alquilo" del compuesto de fosforamidita de la presente invención pueden incluir un alquilo recto o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono. Específicamente, el alquilo puede incluir, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo y terc-pentilo. El alquilo puede sustituirse y ejemplos del "sustituyente" pueden incluir halógeno, alquilo, alcoxi, ciano y nitro. El alquilo puede sustituirse por 1 a 3 de estos sustituyentes.

Los ejemplos del resto "alquilo" del "arilalquilo", "alcoxialquilo", "monoalquilamino", "dialquilamino" y "alquilsulfonilo" del compuesto de fosforamidita de la presente invención puede incluir los mismos grupos alquilo mencionados anteriormente.

10 Los ejemplos del "alcoxi" del compuesto de fosforamidita de la presente invención pueden incluir un alcoxi recto o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Específicamente, el alcoxi puede incluir, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi y terc-butoxi. Entre estos, son preferibles los grupos alcoxi que tienen de 1 a 3 átomos de carbono, y el metoxi es más preferible.

15 Los ejemplos del resto "alcoxi" del "alcoxialquilo" del compuesto de fosforamidita de la presente invención pueden incluir los mismos grupos de alcoxi mencionados anteriormente.

Los ejemplos del resto "arilo" del "arilalquilo" del compuesto de fosforamidita de la presente invención pueden incluir grupos arilo que tienen de 6 a 12 átomos de carbono.

20 Específicamente, el arilo puede incluir, por ejemplo, fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo y bifenilo. El arilo puede sustituirse y ejemplos del "sustituyente" pueden incluir halógeno, alquilo, alcoxi, ciano y nitro. El arilo puede sustituirse por 1 a 3 de estos sustituyentes.

Los ejemplos del "halógeno", "alquilo" y "alcoxi", que son sustituyentes del alquilo o arilo del compuesto de fosforamidita de la presente invención, pueden incluir, respectivamente, los mismos grupos mencionados anteriormente.

El compuesto de fosforamidita de la presente invención puede usarse como un reactivo para producir oligo-ARN.

25 El compuesto de fosforamidita de la presente invención es un compuesto de fosforamidita que tiene un grupo protector de tipo de éter en la posición 2'-hidroxilo, que puede eliminarse en condiciones neutras. Además, el compuesto de fosforamidita de la presente invención se caracteriza por el hecho de que la reacción de condensación se lleva a cabo en un tiempo menor y resulta en un rendimiento mejor durante la síntesis del oligo-ARN cuando se lo compara con un compuesto de fosforamidita convencional. Esto se debe a que el grupo protector de tipo de éter introducido en el grupo 2'-hidroxilo es un grupo protector lineal y, por lo tanto, no completa estéricamente el espacio alrededor del átomo de fósforo unido al grupo 3'-hidroxilo. El compuesto de fosforamidita de la presente invención hace posible producir oligo-ARN de alta pureza esencialmente mediante el mismo procedimiento usado en la producción de oligo-ADN.

35 En el presente documento, el término "oligo-ADN" significa un ácido oligonucleico que tiene sólo desoxirribonucleótidos. Además, en el presente documento, el término "oligo-ARN" significa un ácido oligonucleico que contiene al menos un ribonucleótido y que también puede tener uno o más desoxirribonucleótidos.

Los ejemplos específicos del compuesto de fosforamidita de la presente invención pueden incluir los siguientes compuestos 1 a 5:

1. N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

40 2. N²-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

3. N²-fenoxiacetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

4. N⁴-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

5. 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)uridina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

45 **Breve descripción de los dibujos**

FIGURA 1

La FIGURA 1 muestra un cromatograma obtenido por análisis por HPLC de fase inversa.

En la figura, el eje vertical indica el tiempo (minutos) y el eje horizontal indica la absorbancia óptica.

Mejor forma de llevar a cabo la invención

50 II. Procedimiento para producir el compuesto de fosforamidita de la presente invención

El compuesto de fosforamidita de la presente invención puede producirse como se describe a continuación.

En el siguiente procedimiento de producción es común, cuando las materias primas tienen un sustituyente que afecta la reacción (por ejemplo hidroxilo, amino y carboxi), que las materias primas se usan para la reacción luego de protegerse con un grupo protector adecuado de acuerdo con un procedimiento conocido.

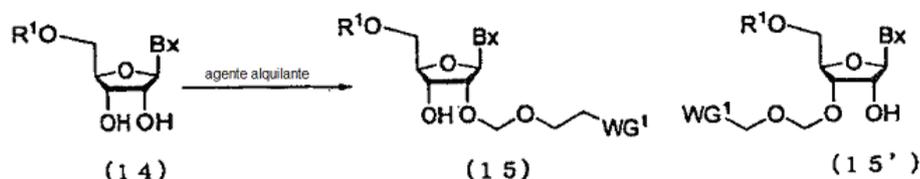
- 5 Luego de que la reacción se completa, el grupo protector puede eliminarse mediante un procedimiento conocido, tal como una reacción catalítica, tratamiento alcalino, tratamiento ácido o similares. El compuesto de fosforamidita de la presente invención puede producirse a partir de un compuesto conocido o un intermediario que puede producirse fácilmente, por ejemplo, a través de las siguientes etapas a a h.

10 El procedimiento para producir el compuesto de fosforamidita de la presente invención se describe en detalle a continuación.

(1) Etapa a:

- 15 Proceso para producir un derivado de nucleósido representado por las siguientes fórmulas generales (15) y (15'), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo permitiendo que un reactivo de alquilación actúe en un derivado de nucleósido representado por la siguiente fórmula general (14).

[Quím. 3]

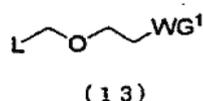


en donde:

B_x, R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente.

- 20 Ejemplos del "reactivo alquilante" pueden incluir un compuesto de éter representado por la siguiente fórmula general (13).

[Quím. 4]



en donde:

- 25 L representa halógeno y WG¹ representa ciano o cuando L es un grupo aril C₆-C₁₂ tio, un grupo alquil C₁-C₅ sulfóxido o un grupo alquil C₁-C₅ tio, WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno.

Ejemplos del "halógeno", el resto "arilo" del "grupo ariltio" y los restos "alquilo" del "grupo alquilsulfóxido" y el "grupo alquiltio" de L pueden incluir los mismos halógeno, arilo y alquilo, respectivamente, que aquellos del compuesto de fosforamidita de la presente invención.

- 30 Ejemplos específicos del compuesto de éter (13) pueden incluir los siguientes compuestos 1 y 2:

1. Clorometil 2-cianoetiléter
2. 2-Cianoetilmetiltiometiléter

- 35 El compuesto de éter (13) es un nuevo reactivo alquilante que puede introducir un sustituyente de tipo de éter, que puede eliminarse en condiciones neutras, en la posición 2'-hidroxilo en condiciones básicas, y que es útil como un reactivo para producir el compuesto de fosforamidita de la presente invención.

El compuesto de éter (13) puede producirse mediante las siguientes etapas 1 a 4.

Etapa 1:

Proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (24) alquiltiometilando un compuesto de alcohol representado por la siguiente fórmula general (20).

[Quím. 5]



en donde:

WG¹ es el mismo que se definió anteriormente; y5 R³ representa alquilo o arilo.

El compuesto (24) es el compuesto de éter (13) en donde L es un grupo alquilito.

Ejemplos del "alquilo" de R³ pueden incluir el mismo alquilo que el del compuesto de fosforamidita de la presente invención.

10 Cuando R³ es metilo, ejemplos del "reactivo alquiltiometilante" pueden incluir un disolvente mezclado que contiene dimetilsulfóxido, anhídrido acético y ácido acético. La cantidad de dimetilsulfóxido a usarse puede estar en el rango de 10 a 200 moles por mol de compuesto (20), y preferiblemente 20 a 100 moles por mol de compuesto. La cantidad de ácido acético a usarse puede estar en el rango de 10 a 150 moles por mol de compuesto (20), y preferiblemente 20 a 100 moles por mol de compuesto. La cantidad de anhídrido acético a usarse puede estar en el rango de 10 a 150 moles por mol de compuesto (20), y preferiblemente 20 a 100 moles por mol de compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 0°C a 100°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 1 y 48 horas.

Etapa 2:

Proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (25) halogenando el compuesto (24).

20 [Quím. 6]



en donde:

WG¹ y R³ son los mismos que se definieron anteriormente; yX² representa el halógeno

25 El compuesto (25) es un compuesto en donde L del compuesto de éter (13) es un halógeno.

Ejemplos del "halógeno" de X² pueden incluir el mismo halógeno que el del compuesto de fosforamidita de la presente invención. La etapa puede realizarse mediante un procedimiento conocido (T. Benneche et al., Synthesis 762 (1983)).

30 El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, un hidrocarburo halogenado tal como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono y 1,2-dicloroetano.

Ejemplos del "agente de halogenación" pueden incluir cloruro de sulfuro y oxiclorigenado de fósforo.

35 La cantidad de agente de halogenación a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (24), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 0°C a 100°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 30 minutos y 24 horas.

Etapa 3:

Proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (25a) ariltiolando el compuesto (25).[Quím. 7]



en donde:

WG¹ y X² son los mismos que se definieron anteriormente; y

R^{3a} representa arilo.

- 5 El compuesto (25a) es un compuesto de la clase de compuestos de éter (13) en donde L es un grupo arilito.

Ejemplos del "arilo" R^{3a} pueden incluir el mismo arilo que el del compuesto de fosforamidita de la presente invención.

- 10 La etapa puede llevarse a cabo por un procedimiento conocido. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, diclorometano y acetonitrilo. Ejemplos del "reactivo ariltiolante" pueden incluir tiofenol y 4-metil bencenotiol. La cantidad de reactivo de ariltiolación a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (25), y preferiblemente 1 a 5 moles por mol de compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 0°C a 100°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 1 y 48 horas.

Etapa 4:

- 15 Proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (24a) oxidando el compuesto (24).

[Quím. 8]



En donde:

- 20 WG¹ y R³ son los mismos que se definieron anteriormente.

El compuesto (24a) es un compuesto de la clase de compuestos de éter (13) en donde L es un grupo alquilsulfóxido.

Ejemplos del "alquilo" de R³ pueden incluir el mismo alquilo que el del compuesto de fosforamidita de la presente invención.

- 25 La etapa puede llevarse a cabo por un procedimiento conocido. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, diclorometano, cloroformo y metanol.

- 30 Ejemplos del "agente oxidante" pueden incluir ácido metacloroperbenzoico, sal de metaperyodato y peróxido de hidrógeno. La cantidad de reactivo de oxidación a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 10 moles por mol de compuesto (24), y preferiblemente 1 a 2 moles por mol de compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 0°C a 100°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 1 y 48 horas.

Cuando el compuesto (25) se usa como el reactivo alquilante, la etapa puede llevarse a cabo como se describe a continuación.

La etapa puede realizarse haciendo reaccionar el reactivo alquilante y una base con el compuesto (14), que está comercialmente disponible o se sintetiza de acuerdo con un procedimiento conocido.

- 35 El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, un hidrocarburo halogenado tal como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono y 1,2-dicloroetano. La cantidad de reactivo de alquilación a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto. En la etapa, por medio del intermediario producido haciendo reaccionar un reactivo de metal y una base con el compuesto (14), puede hacerse reaccionar el reactivo de alquilación si es necesario. Ejemplos del "reactivo de metal" pueden incluir dicloruro de dibutilestanilo. La cantidad de reactivo de metal a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto. Ejemplos de la "base" pueden incluir una base orgánica tal como piridina, 2,6-dimetilpiridina, 2,4,6-trimetilpiridina, N-metilimidazol, trietilamina, tributilamina,

N,N-diisopropiletilamina y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno. La cantidad de base a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 0°C a 120°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 30 minutos y 24 horas.

Cuando el compuesto (24) o (25a) se usa como el reactivo alquilante, la etapa puede llevarse a cabo como se describe a continuación.

La etapa puede realizarse haciendo reaccionar el reactivo alquilante, un ácido y un reactivo para halogenar el átomo de azufre en el compuesto (14) que está comercialmente disponible o se sintetiza de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, M. Matteucci, Tetrahedron Letters, Vol. 31, 2385 (1990)). La cantidad de reactivo de alquilación a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 5 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 1,05 a 3 moles por mol de compuesto. Ejemplos del "ácido" pueden incluir ácido trifluorometanosulfónico, trifluorometanosulfonato de plata y trimetilsilil trifluorometanosulfonato. La cantidad del ácido a usarse puede estar en el rango de 0,01 a 20 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 0,02 a 10 moles por mol de compuesto. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, benceno, tolueno, xileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo y mezclas de los mismos. Ejemplos del "reactivo para halogenar un átomo de azufre" a usarse en la etapa pueden incluir N-bromosuccinimida (NBS) y N-yodosuccinimida (NIS). La cantidad de reactivo para halogenar un átomo de azufre a usarse puede estar en el rango de 1 a 10 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 1,05 a 5 moles por mol de compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de -7,8°C a 30°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 5 minutos y 5 horas.

Cuando el compuesto (24a) se usa como el reactivo alquilante, la etapa puede llevarse a cabo como se describe a continuación.

La etapa puede realizarse haciendo reaccionar el reactivo alquilante, un anhídrido ácido y una base con el compuesto (14), que está comercialmente disponible o se sintetiza de acuerdo con un procedimiento conocido. La cantidad de reactivo de alquilación a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 5 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 1,05 a 3 moles por mol de compuesto. Ejemplos del "anhídrido ácido" pueden incluir anhídrido trifluorometanosulfónico y anhídrido acético. La cantidad de anhídrido ácido a usarse puede estar en el rango de 0,01 a 20 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 0,02 a 10 moles por mol de compuesto. Ejemplos de la "base" pueden incluir tetrametilurea y colidina. La cantidad de la base a usarse puede estar en el rango de 0,01 a 20 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 0,02 a 10 moles por mol de compuesto. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano y mezclas de los mismos. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de -78°C a 30°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de los materiales y la temperatura de reacción, y preferiblemente está entre 5 minutos y 24 horas.

(2) Etapa b:

Proceso para aislar y purificar el derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa (a);

En la etapa, el derivado de nucleósido puede aislarse y purificarse de la mezcla producida mediante la etapa (a) usando una técnica de separación y purificación estándar tal como cromatografía de capa fina, cromatografía en columna de gel de sílice o similares.

(3) Etapa c:

Proceso que se realiza separadamente de la etapa b, para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo permitiendo que un reactivo de alquilación actúe en un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (16).

[Quím. 9]

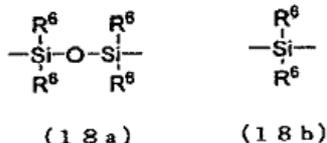


en donde:

B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

A representa un sustituyente de silicio representado por las siguientes fórmulas generales (18a) o (18b).

[Quím. 10]



En donde:

R⁶ representa alquilo.

- 5 Ejemplos del “alquilo” de R⁶ pueden incluir el mismo alquilo que el del compuesto de fosoramidita de la presente invención.

Ejemplos del “reactivo alquilante” pueden incluir los mismos artículos que se mencionaron anteriormente.

Cuando el compuesto (25) se usa como el reactivo alquilante, la etapa puede llevarse a cabo como se describe a continuación.

- 10 La etapa puede realizarse haciendo reaccionar el reactivo alquilante y una base con el compuesto (16), que está comercialmente disponible o se sintetiza de acuerdo con un procedimiento conocido. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, un hidrocarburo halogenado tal como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono y 1,2-dicloroetano. La cantidad del reactivo alquilante a usarse puede estar en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (14), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto. En la etapa, luego del intermediario producido haciendo reaccionar un reactivo de metal y una base con el compuesto (16), el reactivo alquilante puede hacerse reaccionar si es necesario. Ejemplos del “reactivo de metal” pueden incluir dicloruro de dibutilestanilo y cloruro de t-butil magnesio. La cantidad de reactivo de metal a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto. Ejemplos de la “base” pueden incluir una base orgánica tal como piridina, 2,6-dimetilpiridina, 2,4,6-trimetilpiridina, N-metilimidazol, trietilamina, tributilamina, N,N-diisopropiletilamina y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno. La cantidad de la base a usarse puede estar en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 0°C a 120°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 30 minutos y 24 horas.

- 25 Cuando el compuesto (24) o (25a) se usa como el reactivo alquilante, la etapa puede llevarse a cabo como se describe a continuación.

La etapa puede realizarse haciendo reaccionar el reactivo alquilante, un ácido y un reactivo para halogenar el átomo de azufre en el compuesto (16) que está comercialmente disponible o se sintetiza de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo M. Matteucci, Tetrahedron Letters, Vol. 31, 2385 (1990)).

- 30 La cantidad del reactivo de alquilación a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 5 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 1,05 a 3 moles por mol de compuesto. Ejemplos del “ácido” pueden incluir ácido trifluorometanosulfónico, trifluorometanosulfonato de plata y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo. La cantidad del ácido a usarse puede estar en el rango de 0,01 a 20 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 0,02 a 10 moles por mol del compuesto. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, benceno, tolueno, xileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo y mezclas de los mismos. Ejemplos del “reactivo para halogenar un átomo de azufre” a usarse en la etapa pueden incluir N-bromosuccinimida (NBS) o N-yodosuccinimida (NIS). La cantidad del reactivo para halogenar un átomo de azufre a usarse puede estar en el rango de 1 a 10 moles por mol del compuesto (16) y preferiblemente 1,05 a 5 moles por mol del compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de -78°C a 30°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 5 minutos y 5 horas.

Cuando el compuesto (24a) se usa como el reactivo alquilante, la etapa puede llevarse a cabo como se describe a continuación.

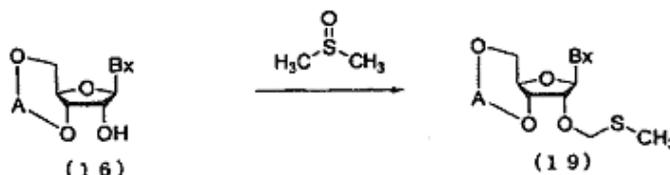
- 45 La etapa puede realizarse haciendo reaccionar el reactivo alquilante, un anhídrido ácido y una base con el compuesto (16), que está comercialmente disponible o se sintetiza de acuerdo con un procedimiento conocido. La cantidad del reactivo alquilante a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 5 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 1,05 a 3 moles por mol del compuesto. Ejemplos del “anhídrido ácido” pueden incluir anhídrido trifluorometanosulfónico y anhídrido acético. La cantidad de anhídrido ácido a usarse puede estar en el rango de 0,01 a 20 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 0,02 a 10 moles por mol de compuesto. Ejemplos de la “base” pueden incluir tetrametilurea y colidina. La cantidad de la base a usarse puede estar en el rango de 0,01 a 20 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 0,02 a 10 moles por mol del compuesto. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo,

diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano y mezclas de los mismos. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de -78°C a 30°C . El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de los materiales y la temperatura de reacción, y preferiblemente está entre 5 minutos y 24 horas.

(4) Etapa d:

- 5 Proceso que se realiza separadamente de las etapas a a c para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (19) permitiendo que dimetilsulfóxido, ácido acético y anhídrido acético actúen en el compuesto de ácido ribonucleico (16).

[Quím. 11]



- 10 En donde:

A y B_x son los mismos que se definieron anteriormente.

La etapa puede realizarse haciendo reaccionar el reactivo dimetilsulfóxido, ácido acético y anhídrido acético con compuesto (14), que está comercialmente disponible o se sintetiza de acuerdo con un procedimiento conocido.

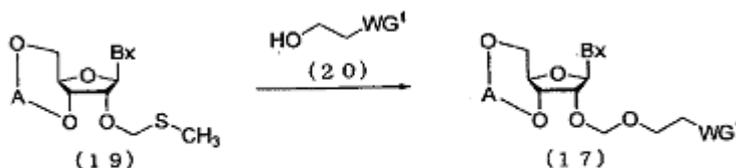
- 15 La cantidad de dimetilsulfóxido a usarse puede estar en el rango de 10 a 200 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente de 20 a 100 veces de moles por mol del compuesto.

- 20 La cantidad de ácido acético a usarse puede estar en el rango de 10 a 150 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 20 a 100 moles por mol del compuesto. La cantidad de anhídrido acético a usarse puede estar en el rango de 10 a 150 moles por mol de compuesto (16), y preferiblemente 20 a 100 moles por mol del compuesto. Es preferible que la temperatura de reacción esté en el rango de 10°C a 50°C . El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción, y preferiblemente está entre 30 minutos y 24 horas.

(5) Etapa e:

- 25 Proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo, permitiendo un compuesto de alcohol representado por la siguiente fórmula general (20), un ácido y un reactivo para halogenar un átomo de azufre para actuar como un derivado de nucleósido (19) producido mediante la etapa d.

[Quím. 12]



En donde:

- 30 A, B_x , y WG^1 son los mismos que se definieron anteriormente.

- 35 La etapa puede realizarse haciendo reaccionar el compuesto de alcohol (20), un ácido y un reactivo para halogenar el átomo de azufre en el compuesto de ácido ribonucleico (19) de acuerdo con un procedimiento conocido. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, benceno, tolueno, xileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo y mezclas de los mismos. La cantidad del compuesto de alcohol (20) a usarse puede estar en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (19), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto. Ejemplos del "ácido" pueden incluir ácido trifluorometanosulfónico, trifluorometanosulfonato de plata y trimetilsilil trifluorometanosulfonato. Ejemplos del "reactivo para halogenar un átomo de azufre" a usarse en la etapa pueden incluir N-bromosuccinimida (NBS) y N-yodosuccinimida (NIS). La cantidad de reactivo para halogenar un átomo de azufre a usarse puede estar en el rango de 0,1 a 20 moles por mol de compuesto (19), y preferiblemente 0,2 a 10 moles por mol del compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de -100°C a 20°C . El

tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 5 minutos y 12 horas.

(6) Etapa f:

- 5 Proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (21) eliminando los grupos protectores de los grupos 3'- y 5'-hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (17) producido mediante la etapa c o la etapa e.

[Quím. 13]



En donde:

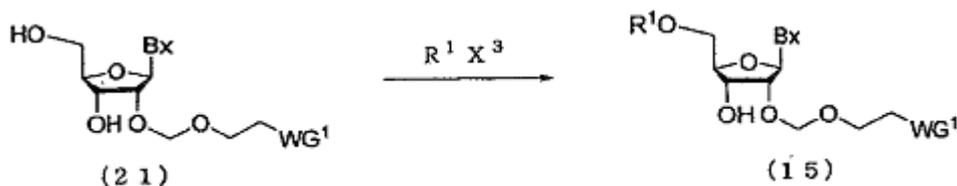
- 10 A, B_x, y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente.

La etapa puede realizarse disolviendo el compuesto (17) en un disolvente orgánico y haciendo reaccionar un agente de fluoración y un ácido como una mezcla de una relación de mezcla arbitraria. Ejemplos del "agente de fluoración" a usarse en la etapa pueden incluir fluoruro de amonio, fluoruro de tetra n-butilamonio (TBAF), trihidrofluoruro de trietilamina, piridina de fluoruro de hidrógeno. La cantidad de reactivo de fluoración a usarse puede estar en el rango de 0,1 a 20 moles por mol de compuesto (17), y preferiblemente 0,2 a 10 moles por mol del compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 0°C a 120°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de materias primas y la temperatura de reacción y se ubica preferiblemente entre 30 minutos y 24 horas.

(7) Etapa g:

- 20 Proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico (15) introduciendo un grupo protector (R¹), que puede eliminarse en condiciones ácidas, en el grupo 5'-hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (21) producido mediante la etapa f.

[Quím. 14]



En donde:

- 25 A, B_x, R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

X³ representa halógeno.

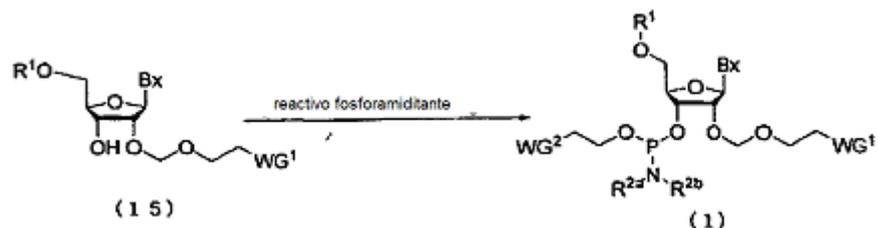
Ejemplos del "halógeno" de X³ pueden incluir el mismo halógeno que los del compuesto de fosforamida de la presente invención. La etapa puede realizarse haciendo reaccionar R¹X³ con el compuesto (21) de acuerdo con un procedimiento conocido.

- 30 La cantidad de R¹X³ a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (21), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol del compuesto. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Ejemplos de la "base" pueden incluir una base orgánica tal como piridina, 2,6-dimetilpiridina, 2,4,6-trimetilpiridina, N-metilimidazol, trietilamina, tributilamina, N,N-diisopropiletilamina y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno. La cantidad de base a usarse puede estar adecuadamente en el rango de 1 a 20 moles por mol de compuesto (21), y preferiblemente 1 a 10 moles por mol del compuesto. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 0°C a 120°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de los materiales y la temperatura de reacción, y preferiblemente está entre 30 minutos y 24 horas.

(8) Etapa h:

Proceso para producir el compuesto de fosoramidita de la presente invención fosoramiditando el grupo 3'-hidroxilo permitiendo que un reactivo fosoramiditante y si es necesario un agente activador actúen en un derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa b o la etapa g.

[Quím. 15]



5

los mismos artículos que aquellos del compuesto de fosoramidita de la presente invención.

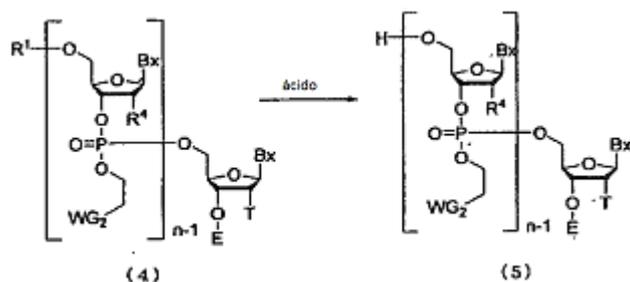
Un procedimiento para producir un oligo-ARN (3) con el compuesto de fosoramidita de la presente invención puede realizarse mediante un procedimiento conocido y, por ejemplo, puede realizarse condensando un compuesto de monómero de ácido nucleico en dirección 3' a 5' etapa por etapa de acuerdo con las siguientes etapas A a G.

10 Los compuestos y reactivos a usarse en la siguiente etapa excepto el compuesto de fosoramidita de la presente invención no se limitan particularmente en la medida que se usan generalmente en la síntesis de oligo-ARN o oligo-ADN. Además, todas las etapas pueden realizarse usando un sintetizador automático para ADN o en manual como en el caso del uso de agentes convencionales para sintetizar un ácido nucleico. El uso de un sintetizador automático es deseable desde el punto de vista de la simplicidad y facilidad del procedimiento y la precisión de la síntesis. Los
 15 compuestos y reactivos descritos en las siguientes etapas A a G excepto un compuesto de monómero de ácido nucleico no se limitan particularmente en la medida que se usan generalmente en la síntesis de oligo-ARN o oligo-ARN.

(1) Etapa A:

20 Proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (5) eliminando el grupo protector de 5'-hidroxilo de un compuesto representado por la siguiente fórmula general (4) haciéndolo reaccionar con un ácido.

[Quím. 18]

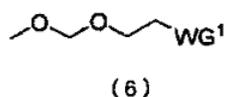


En donde:

25 n, R¹ y WG² son los mismos que se definieron anteriormente;

cada B_x representa independientemente adenina, guanina, citosina, uracilo, timina o una forma modificada de los mismos; y cada R⁴ representa independientemente H, aciloxi o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (6).

[Quím. 19]



30

En donde:

WG¹ es el mismo que se definió anteriormente; y

E representa acilo o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (7).

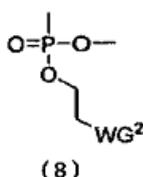
[Quím. 20]



En donde:

- 5 Q representa una unión simple o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (8).

[Quím. 21]



En donde:

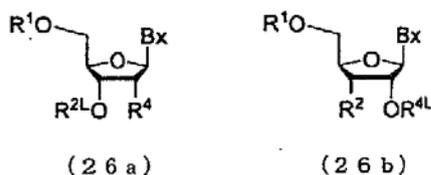
WG² es el mismo que se definió anteriormente; y

- 10 T representa H, aciloxi, un sustituyente representado por la fórmula general anterior (6) o (7), con la condición que E o T sea un sustituyente (7).

La etapa se realiza haciendo reaccionar un ácido con un compuesto representado por la siguiente fórmula general (26a), (26b) [un compuesto (4) en donde n es 1] que se une al soporte sólido, o un oligo-ARN o un oligo-ADN producido realizando las operaciones de la etapa A a la etapa D [compuesto (4) en donde n es 2 a 100] que se une al soporte sólido (de aquí en adelante denominado el "compuesto unido al soporte sólido").

- 15

[Quím. 22]



En donde:

B_x y R¹ son los mismos que se definieron anteriormente;

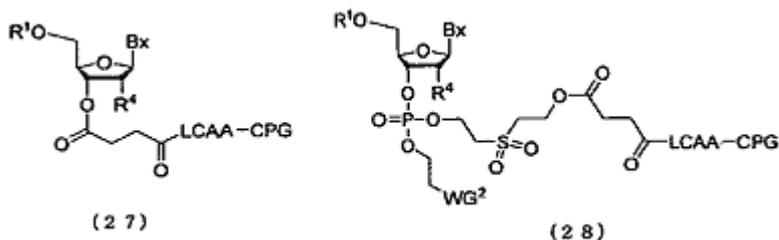
- 20 R^{2L} y R^{4L} representan un sustituyente (7);

R² representa aciloxi; y

R⁴ representa H, aciloxi o un sustituyente (6).

- 25 Ejemplos del resto "acilo" del grupo "aciloxi" de R² y R⁴ pueden incluir acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, benzoilo, 4-metoxibenzoilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-terc-butilfenoxiacetilo y 4-isopropilfenoxiacetilo. Ejemplos del "soporte sólido" pueden incluir un vidrio de poro controlado (CPG), un vidrio de poro controlado por oxalilo (ver, por ejemplo, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol.19, 1527 (1991)), soporte TentaGel – soporte de derivación de aminopolietilenglicol (ver, por ejemplo, Wright et al., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)) y un copolímero de poliestireno y divinilbenceno Poros. Ejemplos del "ligante" pueden incluir 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-dietanol sulfonilo y un alquilamino de cadena larga (LCAA). Los compuestos (26a) y (26b) que se unen al soporte sólido se producen de acuerdo con un procedimiento conocido o están disponibles comercialmente, y ejemplos de una
- 30 realización preferida son compuestos representados por la siguiente fórmula general (27) o (28).

[Quím. 23]



En donde:

B_x , R^1 , R^4 y WG^2 son los mismos que se definieron anteriormente.

5 Los compuestos (27) y (28) en donde R^4 es un sustituyente (6) pueden producirse a partir de un compuesto de fosoramidita de la presente invención de acuerdo con un procedimiento conocido.

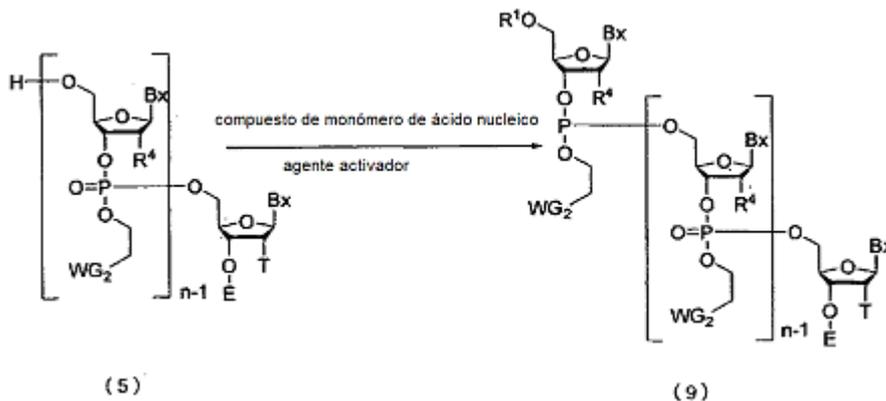
10 Ejemplos del "ácido" a usarse en la etapa pueden incluir ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético. El ácido a usarse en la etapa puede diluirse en un disolvente adecuado para que sea de una concentración de 1 a 5%. El disolvente no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, agua y mezclas de los mismos. La temperatura de reacción en la reacción está preferiblemente en el rango de 20°C a 50°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de ácido y la temperatura de reacción, y está preferiblemente entre 1 minuto y 1 hora.

La cantidad del reactivo a usarse está preferiblemente en el rango de 1 a 100 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido, y más preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido.

(2) Etapa B:

15 Proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (9) condensando un monómero de ácido nucleico con el compuesto producido mediante la etapa A usando un agente activador.

[Quím. 24]

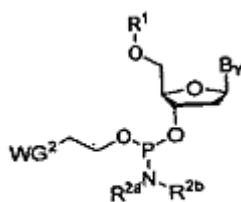


En donde:

20 B_x , E , n , R^1 , R^4 , T y WG^2 son los mismos que se definieron anteriormente.

La etapa puede realizarse haciendo reaccionar un compuesto de monómero de ácido nucleico y un agente activador con un compuesto unido al soporte sólido. Ejemplos del "compuesto de monómero de ácido nucleico" pueden incluir el compuesto de fosoramidita de la presente invención y un compuesto representado por la siguiente fórmula general (29) que está comercialmente disponible.

25 [Quím. 25]



(29)

En donde:

R¹, R^{2a}, R^{2b} y WG² son los mismos que se definieron anteriormente; y

B_y representa una nucleobase que puede tener un grupo protector.

- 5 Ejemplos de la "nucleobase" B_y no se limitan particularmente en la medida que es una nucleobase usada para sintetizar un ácido nucleico y puede incluir, por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina y una forma modificada de los mismos. La forma modificada es la misma que la que se define anteriormente para B_x.

- 10 Ejemplos del "sustituyente" para la "forma modificada" de B_y pueden incluir halógeno, alquilo, arilaquilo, alcoxi, hidroxilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, carboxi, ciano y nitro; y la forma modificada de B_y puede sustituirse con 1 a 3 de estos sustituyentes. Ejemplos del "halógeno", "arilo", "alquilo", "arilalquilo", "alcoxi", "alcoxialquilo", "amino", "monoalquilamino" y "dialquilamino" para la "forma modificada" de B_y pueden incluir los mismos artículos que los del compuesto de fosoramidita de la presente invención.

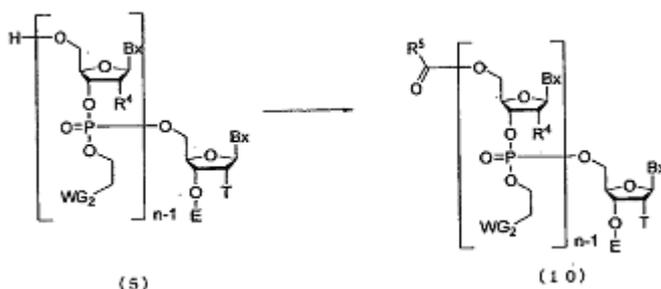
- 15 La nucleobase de B_y puede protegerse, y especialmente la nucleobase que tiene un grupo amino (por ejemplo adenina, guanina, citosina) puede protegerse preferiblemente del grupo amino. El grupo protector del grupo amino de B_y puede incluir los mismos artículos que los de B_x.

Ejemplos del "agente activador" pueden incluir los mismos artículos que se mencionaron anteriormente.

- 20 El disolvente de reacción no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, acetonitrilo y tetrahidrofurano. La temperatura de reacción en la reacción está preferiblemente en el rango de 20°C a 50°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de agente activador y la temperatura de reacción, y está preferiblemente entre 1 minuto y 1 hora. La cantidad del agente a usarse está preferiblemente en el rango de 1 a 100 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido, y más preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido.

(3) Etapa C:

Proceso para proteger el grupo 5'-hidroxilo del compuesto sin reaccionar (5) en la etapa B. [Quím. 26]



25

En donde:

B_x, E, n, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente; y

R⁵ representa metilo o fenoximetilo.

- 30 La etapa es una reacción para proteger el grupo 5'-hidroxilo sin reaccionar en la etapa (B), y puede realizarse haciendo reaccionar un agente protector con un compuesto unido al soporte sólido. Ejemplos del "agente protector" pueden incluir anhídrido acético y anhídrido fenoxiacético.

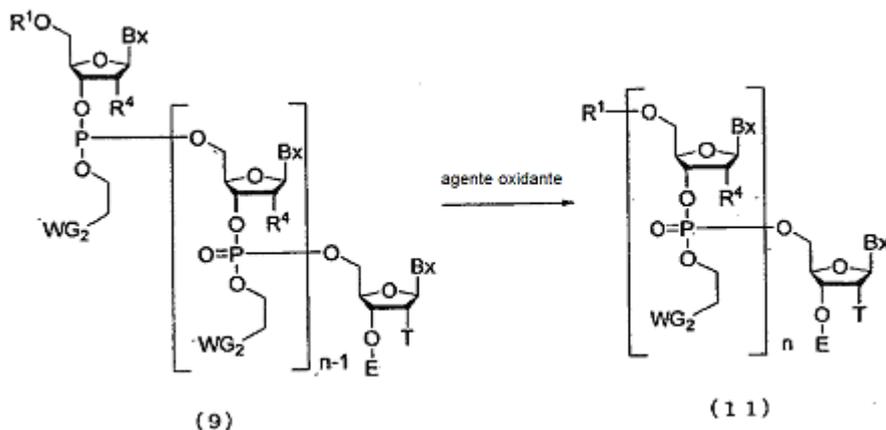
El agente protector a usarse puede diluirse en un disolvente adecuado para que esté en una concentración de 0,05 a 1M.

El disolvente no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, piridina,

diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano y mezclas de los mismos. Además, por ejemplo, pueden usarse 4-dimetilaminopiridina, N-metilimidazol como un acelerador de reacción en la etapa si es necesario. La temperatura de reacción en la reacción está preferiblemente en el rango de 20°C a 50°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de agente protector y la temperatura de reacción, y está preferiblemente entre 1 y 30 minutos. La cantidad del agente a usarse está preferiblemente en el rango de 1 a 100 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido, y más preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido.

(4) Etapa D:

Proceso para convertir un grupo fósforo en un grupo fosfato haciendo reaccionar un agente oxidante con compuesto (9) producido en la etapa B. [Quím. 27]



En donde:

B_x, E, n, R¹, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente.

La etapa es una reacción para convertir fósforo trivalente en fósforo pentavalente usando un agente oxidante, y puede realizarse haciendo reaccionar un agente oxidante con un compuesto unido al sólido.

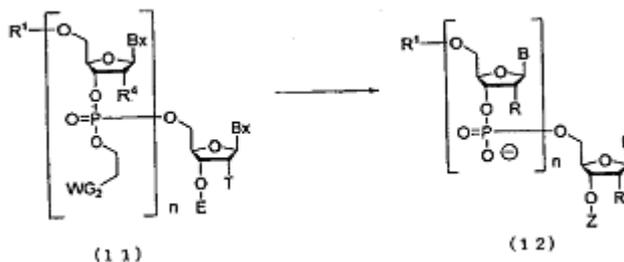
Ejemplos del "agente oxidante" pueden incluir yodo y hidropéroxido de terc-butilo.

Además, el agente oxidante a usarse puede diluirse en un disolvente adecuado para que esté en una concentración de 0,05 a 1M. El disolvente no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, piridina, tetrahidrofurano, agua y mezclas de los mismos. Por ejemplo, se puede usar yodo/agua/piridina-tetrahidrofurano, yodo/piridina-ácido acético y un agente de peroxidación (t-butilhidropéroxido/cloruro de metileno y similares). La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 20°C a 50°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de agente oxidante y la temperatura de reacción, y está preferiblemente entre 1 y 30 minutos. La cantidad del agente a usarse está preferiblemente en el rango de 1 a 100 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido, y más preferiblemente 1 a 50 moles por mol de compuesto.

(5) Etapa E:

Proceso para escindir el compuesto (11) producido mediante la etapa D a partir del soporte sólido, y luego eliminar los grupos protectores de cada nucleobase y cada grupo 2'-hidroxilo.

[Quím. 28]



En donde:

B, B_x, E, R, R¹, R⁴, n, T, WG² y Z son los mismos que se definieron anteriormente.

La etapa de escisión es una reacción para escindir un oligo-ARN que tiene una longitud de cadena deseada del soporte sólido y un ligante con un agente de escisión y se realiza agregando un agente de escisión al soporte sólido que contiene un oligo-ARN que tiene una longitud de cadena deseada.

5 En la etapa, puede eliminarse el grupo protector de una nucleobase. Ejemplos del "agente de escisión" pueden incluir amoníaco acuoso concentrado y metilamina. El agente de escisión a usarse en la etapa puede diluirse por, por ejemplo, metanol, etanol, alcohol isopropilo, acetonitrilo, tetrahidrofurano y mezclas de los mismos.

10 Entre ellos, el etanol es preferible. La temperatura de reacción puede estar en el rango de 15°C a 75°C, preferiblemente 15°C a 30°C, y más preferiblemente 18°C a 25°C. El tiempo de reacción para la desprotección puede estar en el rango de 1 a 30 horas, preferiblemente 1 a 24 horas, y más preferiblemente 1 a 4 horas. La concentración de amonio-hidróxido en la solución a usarse para la desprotección puede ser de 20 a 30% en peso, preferiblemente 25 a 30% en peso, más preferiblemente 28 a 30% en peso. La cantidad del agente a usarse está preferiblemente en el rango de 1 a 100 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido, y preferiblemente de 10 a 50 veces de moles por mol de compuesto. La etapa para eliminar el grupo protector del grupo 2'-hidroxilo se realiza haciendo reaccionar el agente para eliminar el grupo protector del grupo 2'-hidroxilo tal como fluoruro de tetrabutilamonio, sal de fluoruro de trihidrógeno/trietilamina. El disolvente a usarse no se limita específicamente salvo que participe en la reacción y puede incluir, por ejemplo, tetrahidrofurano, N-metilpirrolidona, piridina, dimetilsulfóxido y mezclas de los mismos. Si es necesario, alquilamina, amidina, tior, derivados de tior o mezclas de estos pueden agregarse como un compuesto que depura el acrilonitrilo que es un producto derivado en la etapa.

Ejemplos de la "alquilamina" pueden incluir una alquilamina recta que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

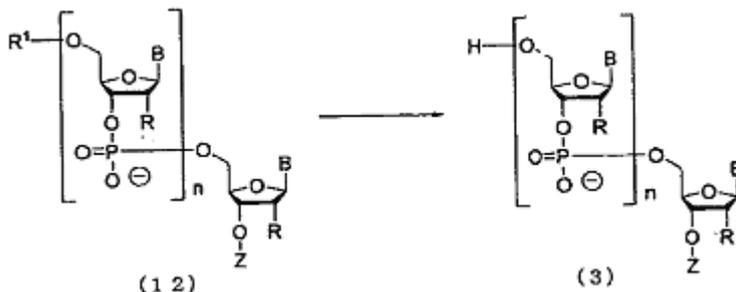
20 Específicamente, la alquilamina puede incluir, por ejemplo, metilamina, etilamina, n-propilamina, n-butilamina, n-pentilamina y n-hexilamina. Ejemplos de la "amidina" pueden incluir benzamidina y formamidina. Ejemplos del "tior" pueden incluir un tior recto que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

Específicamente, el "tior" puede incluir, por ejemplo, metanotior, etanotior, 1-propanotior, 1-butanotior, 1-pentanotior y 1-hexanotior.

25 Ejemplos del "derivado de tior" pueden incluir el mismo u otro alcohol y éter y tienen un alquiltior recto que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Específicamente, el derivado de tior puede incluir, por ejemplo, 2-mercaptoetanol, 4-mercapto-1-butanol, 6-mercapto-1-hexanol, mercaptometil éter, 2-mercaptoetil éter, 3-mercaptopropil éter, 4-mercaptobutil éter, 5-mercaptopentilo éter y 6-mercaptohexil éter. La temperatura de reacción está preferiblemente en el rango de 20°C a 80°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo del agente desprotector a usarse y la temperatura de reacción, y está preferiblemente en el rango de 1 hora a 100 horas. La cantidad del agente a usarse está preferiblemente en el rango de 50 a 500 moles por mol de grupo protector eliminado, y más preferiblemente 50 a 100 moles por mol del grupo protector eliminado. El oligo-ARN protegido en el grupo 5'-hidroxilo puede aislarse y purificarse de la mezcla de reacción anteriormente mencionada usando una técnica de separación y purificación estándar tal como extracción, concentración, neutralización, filtración, centrifugación, recristalización, cromatografía en columna de gel de sílice, cromatografía de capa fina, cromatografía en columna hidrófoba, cromatografía en columna de intercambio de iones, cromatografía en columna de filtración de gel, diálisis, ultrafiltración y similares.

(6) Etapa F:

Proceso para eliminar el grupo protector de 5'-hidroxilo del compuesto (12) producido mediante la etapa E.[Quím. 29]



40

En donde:

B, n, R, R¹ y Z son los mismos que se definieron anteriormente.

45 La etapa es una reacción para eliminar finalmente el grupo protector del grupo 5'-hidroxilo del oligorribonucleótido y puede realizarse haciendo reaccionar un ácido en el oligo-ARN escindido del soporte sólido. Ejemplos del "ácido" a usarse en la etapa pueden incluir ácido tricloroacético, ácido dicloroacético y ácido acético. El ácido diluido en un disolvente adecuado puede usarse en la etapa. El disolvente no se limita específicamente salvo que participe en la

reacción y puede incluir, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, agua, una solución amortiguadora en donde el pH está en el rango de 2 a 5 y mezclas de los mismos. Ejemplos de la "solución amortiguadora" pueden incluir una solución amortiguadora de acetato. La temperatura de reacción en la reacción está preferiblemente en el rango de 20°C a 50°C. El tiempo de reacción varía dependiendo del tipo de ácido y la temperatura de reacción y está preferiblemente entre 1 minuto y 1 hora.

La cantidad del agente a usarse está preferiblemente en el rango de 1 a 100 moles por mol de compuesto unido al soporte sólido, y más preferiblemente 1 a 10 moles por mol de compuesto.

(7) Etapa G:

Proceso para aislar y purificar el compuesto (3) producido mediante la etapa F.

La etapa de aislar y purificar es una etapa para aislar y purificar un oligo-ARN de la mezcla de reacción anterior con un procedimiento conocido para aislar y purificar que puede incluir, por ejemplo, extracción, concentración, neutralización, filtración, separación centrífuga, recristalización, cromatografía en columna de fase inversa (C₈ a C₁₈), cromatografía en columna (C₁₈ a C₁₈) de cartucho de fase inversa, cromatografía en columna de intercambio de iones, cromatografía en columna de intercambio de aniones, cromatografía en columna de filtración de gel, cromatografía líquida de alto rendimiento, diálisis, ultrafiltración y combinaciones de los mismos. Ejemplos del "eluyente" pueden incluir acetonitrilo, metanol, etanol, alcohol isopropílico, agua y disolvente mezclados en una relación arbitraria. En este caso, por ejemplo, el pH de la solución puede controlarse para que esté en el rango de pH 1 a 9 agregando fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, acetato de amonio, acetato de trietilamonio, acetato de sodio, acetato de potasio, ácido tris-clorhídrico o ácido etilendiaminotetraacético como un aditivo en una concentración de 1 mM a 2 M.

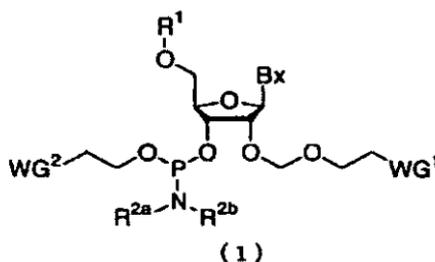
Un oligo-ARN que tiene una longitud de cadena deseada puede producirse repitiendo las etapas A a D. Además, en el procedimiento, se usa el compuesto (26a) en donde R⁴ es el sustituyente (6), el compuesto (26a) en donde R⁴ es H o aciloxi, o el compuesto (26b) en donde R² es alquiloxi, etc.

Cuando se usa el compuesto (26a) en donde R⁴ es H o aciloxi o el compuesto (26b) en donde R² es alquiloxi como un material de partida, es necesario usar uno o más compuestos de fosforamidita de la presente invención como un compuesto de monómero de ácido nucleico.

Además, en el procedimiento, el aislamiento y purificación de un oligo-ARN también se realiza realizando las operaciones de la etapa F antes de realizar las operaciones de la etapa E, las operaciones de la etapa E, y luego las operaciones de la etapa G.

Específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

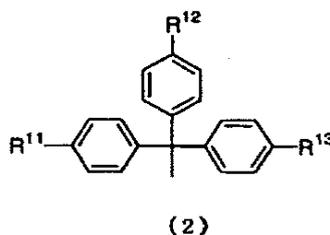
1. Un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1),



en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector;

R¹ es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),

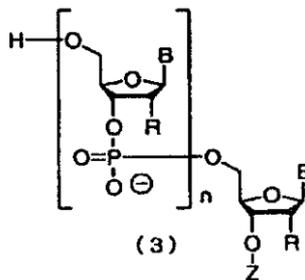


en donde:

R^{11} , R^{12} y R^{13} son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo, o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y WG^1 representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno y WG^2 representa un grupo de extracción de electrones.

- 5 2. El compuesto de fosforamidita de acuerdo con 1, en donde WG^1 es ciano.
3. Un procedimiento para producir un oligorribonucleótido representado por la siguiente fórmula general (3), caracterizado por usar el compuesto de fosforamidita de acuerdo con la reivindicación 1 o 2,



10 en donde:

cada B representa independientemente adenina, guanina, citosina, uracilo, timina o una forma modificada de las mismas;

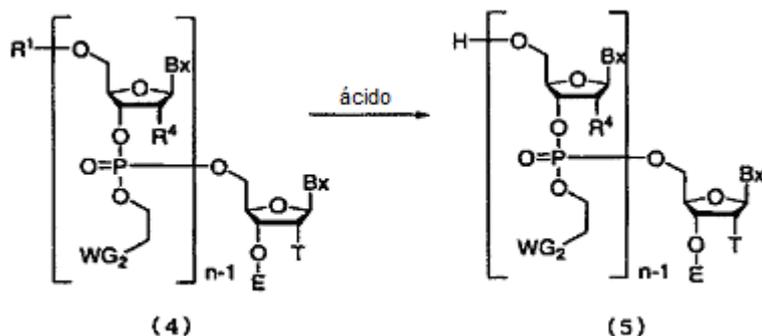
cada R representa independientemente H o hidroxilo y al menos uno de R es hidroxilo;

15 Z representa H o un grupo fosfato; y

n representa un número entero en el rango de 1 a 100.

4. El procedimiento para producir el oligorribonucleótido (3) de acuerdo con 3, que comprende las siguientes etapas A a G,

20 Etapa A: proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (5) eliminando el grupo 5'-hidroxilo haciendo reaccionar un ácido con un compuesto representado por la siguiente fórmula general (4),

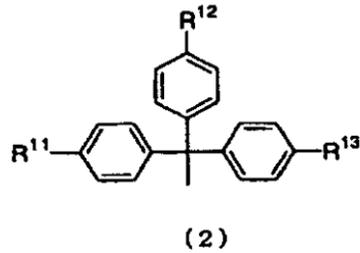


en donde:

n es el mismo que se definió anteriormente;

cada B_x representa independientemente una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

25 R^1 es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),

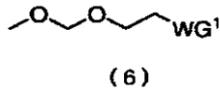


en donde:

R^{11} , R^{12} y R^{13} son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

cada WG^2 representa un grupo de extracción de electrones; y

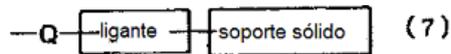
- 5 cada R^4 representa independientemente H, aciloxi o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (6),



en donde:

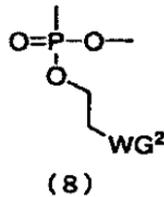
- 10 WG^1 representa ciano, nitro, alquil C_1-C_5 sulfonilo o halógeno; y

E representa acilo o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (7),



en donde

Q representa una unión simple o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (8),



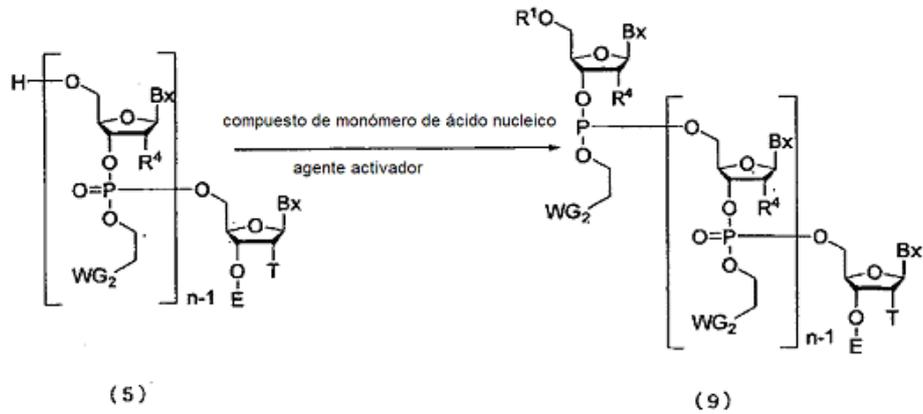
- 15

en donde:

WG^2 es el mismo que se definió anteriormente; y

- 20 T representa H, aciloxi o el sustituyente representado por la fórmula general anterior (6), con la condición de que ninguno de E o T sea un sustituyente (7).

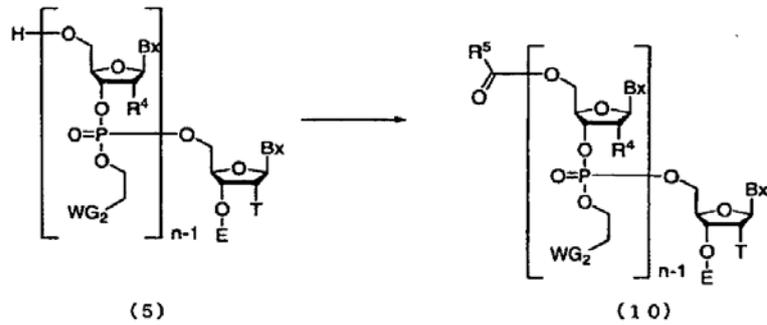
Etapa B: proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (9) condensando un compuesto de monómero de ácido nucleico con el compuesto producido en la etapa A usando un agente activador,



en donde:

B_x, E, n, R¹, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa C: proceso para proteger el grupo 5'-hidroxilo del compuesto sin reaccionar (5) en la etapa B,



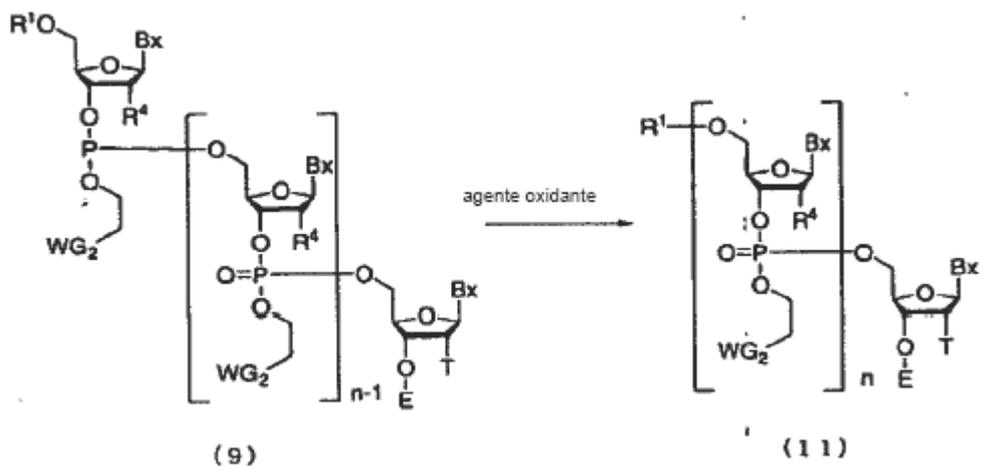
5

en donde:

B_x, E, n, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente; y

R⁵ representa metilo o fenoximetilo,

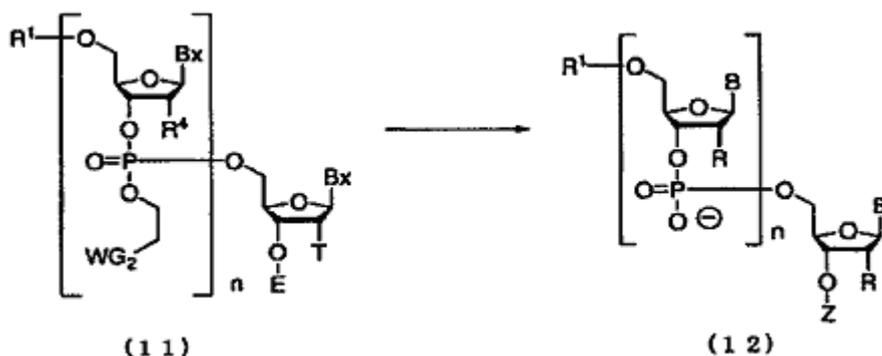
10 Etapa D: proceso para convertir un grupo fosforoso en un grupo fosfato haciendo reaccionar un agente oxidante con el compuesto (9) que se produce en la etapa B,



en donde:

15 B_x, E, n, R¹, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente,

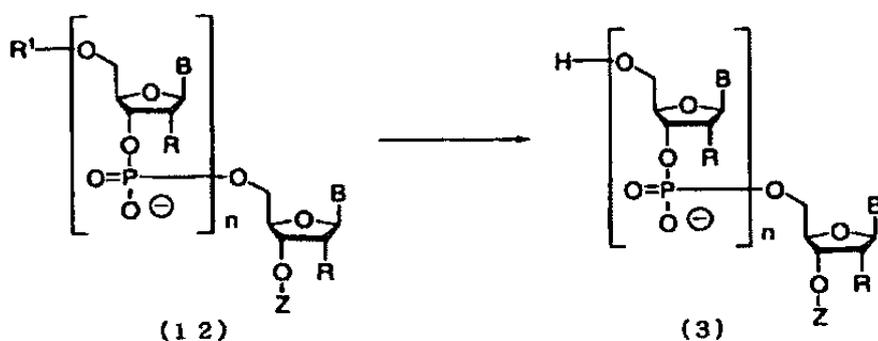
Etapa E: proceso para escindir el compuesto (11) producido mediante la etapa D a partir del soporte s6lido y luego desproteger cada nucleobase y cada grupo 2'-hidroxilo,



en donde:

B, B_x, E, n, R, R¹, R⁴, T, WG² y Z son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa F: proceso para eliminar el grupo protector de 5'-hidroxilo del compuesto (12) producido mediante la etapa (E),



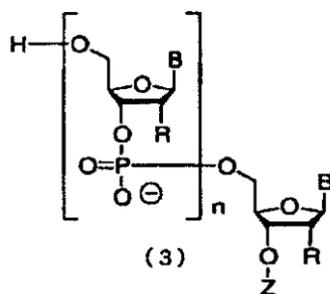
5

en donde:

B, n, R, R¹ y Z son como se definieron anteriormente,

Etapa G: proceso para aislar y purificar el oligorribonucleótido (3) producido en la etapa F.

5. Un procedimiento para producir un oligonucleótido representado por la siguiente fórmula general (3), que comprende las siguientes etapas A a D, en donde el compuesto de monómero de ácido nucleico en la etapa B es el compuesto de fosoramidita de acuerdo con 1 o 2,



15 en donde:

cada B representa independientemente adenina, guanina, citosina, uracilo, timina o una forma modificada de los mismos;

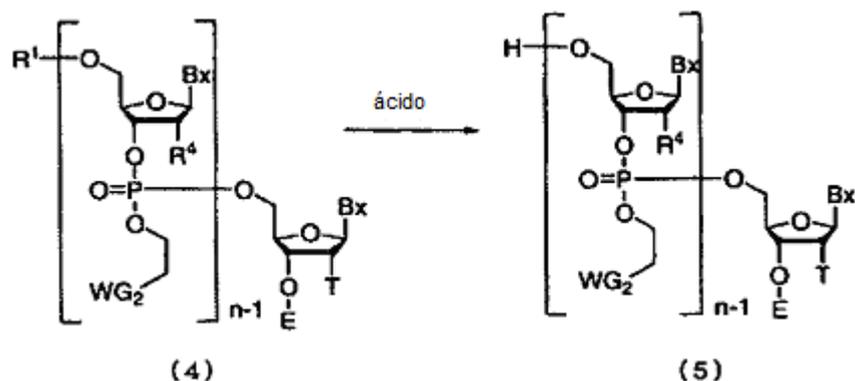
cada R representa independientemente H o hidroxilo y al menos uno de R es hidroxilo;

A representa H o un grupo fosfato; y

20 n representa un número entero en el rango de 1 a 100.

Etapa A: proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (5) eliminando el grupo protector de 5'-hidroxilo haciendo reaccionar un ácido en un compuesto representado por la siguiente fórmula

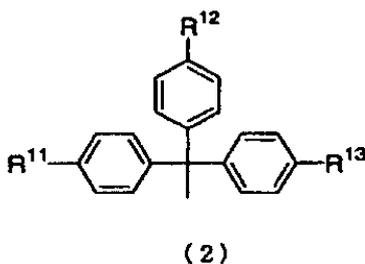
general (4),



5 en donde:

n es el mismo que se definió anteriormente;

cada B_x representa independientemente una nucleobase que puede tener un grupo protector; y R¹ es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),

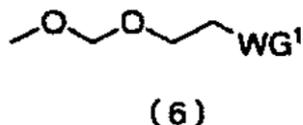


10 en donde:

R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

cada WG² representa un grupo de extracción de electrones; y

cada R⁴ representa independientemente H, aciloxi o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (6),



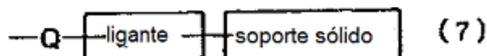
15

en donde:

WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno; y

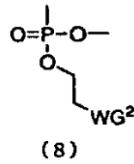
E representa acilo o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (7),

20



en donde:

Q representa una unión simple o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (8),

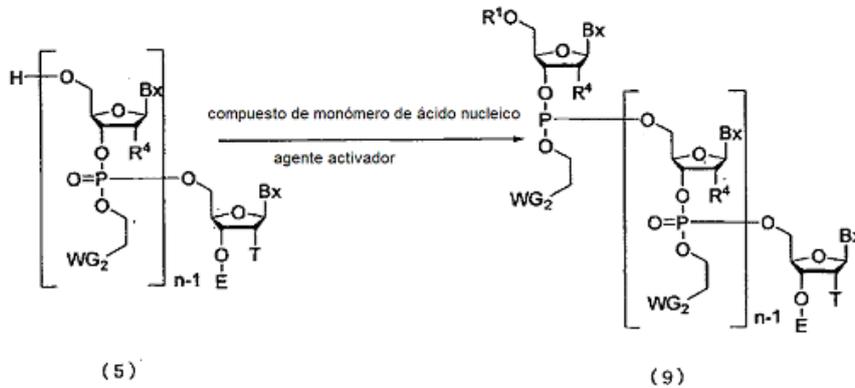


en donde:

WG² es el mismo que se definió anteriormente; y

5 T representa H, aciloxi o el sustituyente representado por la fórmula anterior general (6), con la condición de que E o T sea un sustituyente (7),

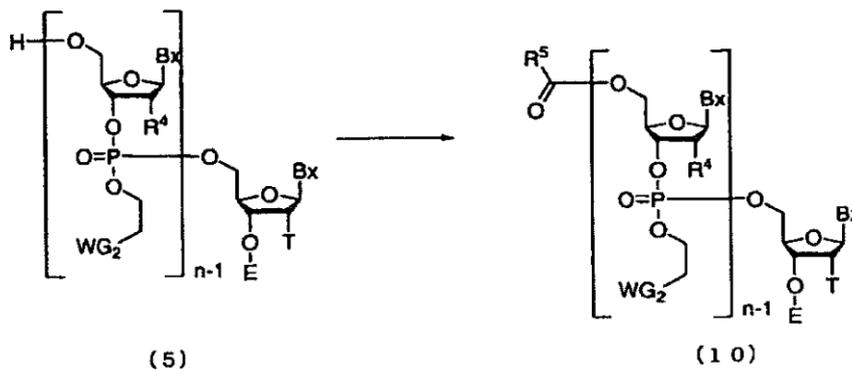
Etapa B: proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (9) condensando un compuesto de monómero de ácido nucleico con el compuesto producido en la etapa A usando un agente activador,



10 en donde:

B_x, E, n, R¹, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa C: proceso para proteger el grupo 5'-hidroxilo del compuesto sin reaccionar (5) en la etapa B,



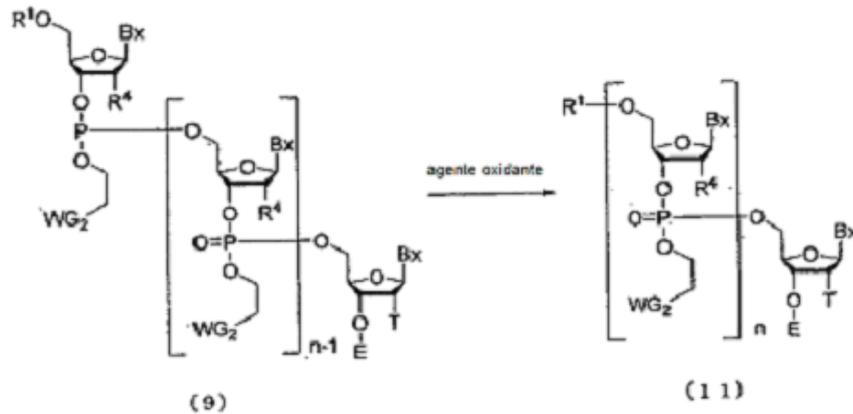
15 en donde:

B_x, E, n, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente; y

R⁵ representa metilo o fenoximetilo,

Etapa D: proceso para convertir un grupo fosforoso en un grupo fosfato haciendo reaccionar un agente oxidante en el compuesto (9) producido en la etapa B,

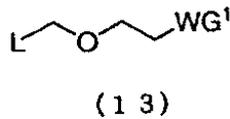
20



en donde:

B_x, E, n, R¹, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente.

- 5 6. El procedimiento para producir un oligorribonucleótido de acuerdo con 4 o 5, que se caracteriza por la adición de alquilamina, amidina, tiol, un derivado de tiol o mezclas de los mismos en la etapa E.
7. Un compuesto de éter representado por la siguiente fórmula general (13),



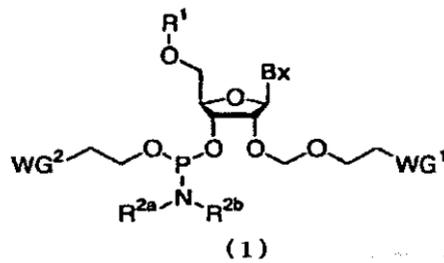
10 en donde:

cuando L es halógeno, WG¹ representa ciano;

cuando L es un grupo aril C₆-C₁₂ tio, un grupo alquil sulfóxido C₁-C₅ o un grupo alquil C₁-C₅ tio, WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno.

8. El compuesto de éter de acuerdo con 7, en donde WG¹ es ciano.

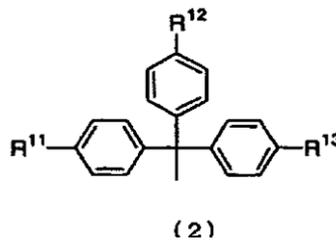
- 15 9. Un procedimiento para producir un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general (1), comprendiendo el procedimiento las etapas a a c,



en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

- 20 R¹ representa un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



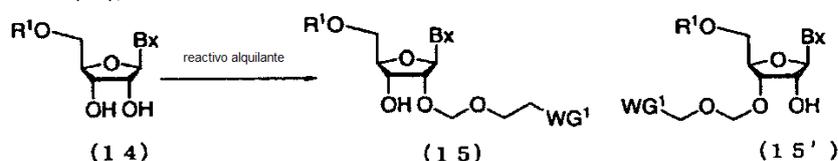
en donde:

R^{11} , R^{12} y R^{13} son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

- 5 R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

WG^1 representa ciano, nitro, alquil C_1 - C_5 sulfonilo o halógeno y WG^2 representa un grupo de extracción de electrones,

- 10 Etapa a: proceso para producir un derivado de nucleósido representado por las siguientes fórmulas generales (15) y (15'), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo, permitiendo que un reactivo alquilante actúe en un derivado de nucleósido representado por la siguiente fórmula general (14),



15

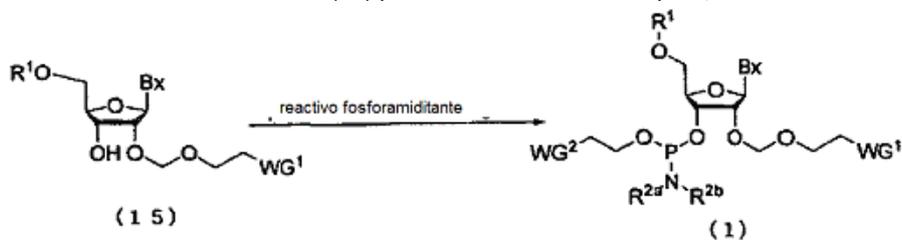
en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

R^1 y WG^1 son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa b: proceso para aislar y purificar el derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa a,

- 20 Etapa c: proceso para producir un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1) fosforamiditando el grupo 3'-hidroxilo permitiendo que un reactivo fosforamiditante y si es necesario un agente activador actúe en un derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa b,

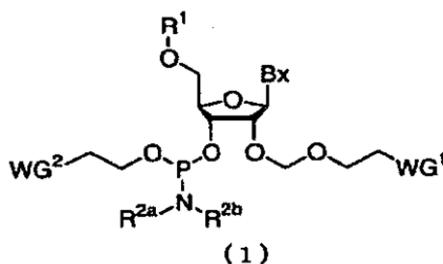


en donde:

- 25 B_x , R^1 y WG^1 son los mismos que se definieron anteriormente;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo, o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y WG^2 representa un grupo de extracción de electrones.

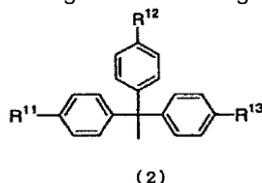
- 30 8. Un procedimiento para producir un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1), comprendiendo el procedimiento las etapas a2 a d2,



en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

R¹ representa un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



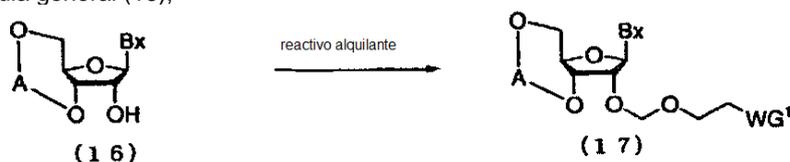
en donde:

5 R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno y WG² representa un grupo de extracción de electrones,

10

Etapa a2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo, permitiendo que un reactivo alquilante actúe en un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (16),

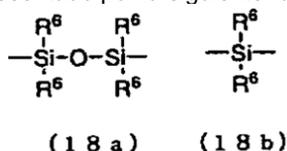


15

en donde:

B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

A representa un sustituyente de silicio representado por la siguiente fórmula general (18a) o (18b),



20

en donde:

R⁶ representa alquilo,

Etapa b2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (21) eliminando los grupos protectores del grupo hidroxilo 3' y 5' del compuesto de ácido ribonucleico (17) producido mediante la etapa a2,



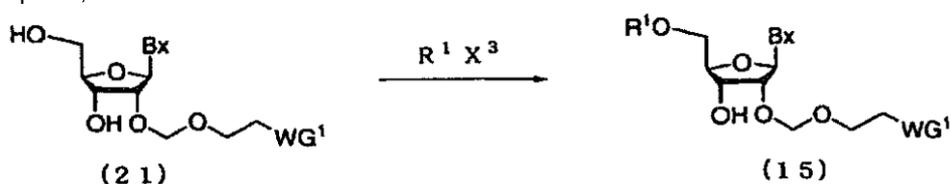
25

en donde:

A, B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa c2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico (15) introduciendo un grupo protector (R¹), que puede eliminarse en condiciones ácidas, en el grupo hidroxilo 5' del compuesto de ácido ribonucleico (21) producido mediante la etapa b2,

30

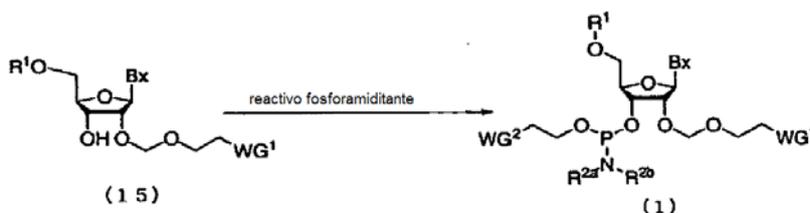


en donde:

B_x R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

X³ representa halógeno,

- 5 Etapa d2: proceso para producir un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1) fosforamiditando el grupo 3' hidroxilo permitiendo que un reactivo fosforamiditante y si es necesario un agente activador actúe en un derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa v2,

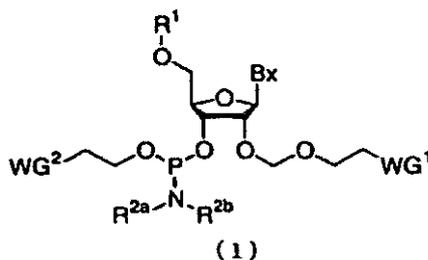


en donde:

- 10 B_x R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y WG² representa un grupo de extracción de electrones.

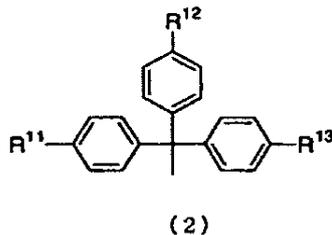
- 15 10. Un procedimiento para producir un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1), comprendiendo el procedimiento las etapas a2 a d2,



en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

- 20 R¹ representa un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



en donde:

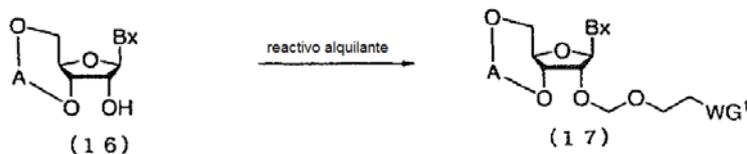
R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

- 25 R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

- 30 WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno y WG² representa un grupo de extracción de electrones,

Etapa a2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17) permitiendo que un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduzca

en el grupo 2'-hidroxilo, permitiendo que un reactivo alquilante actúe en un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (16),

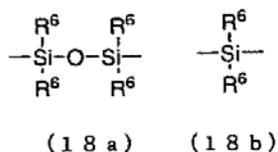


5

en donde:

B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

A representa un sustituyente de silicio representado por la siguiente fórmula general (18a) o (18b),



10

en donde:

R⁶ representa alquilo,

15 Etapa b2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (21), eliminando los grupos protectores del grupo 3' y 5' hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (17) producidos por la etapa a2,

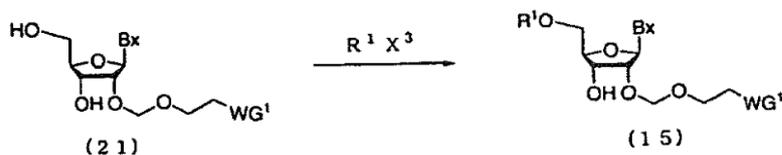


20

en donde:

A, B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa c2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico (15) introduciendo un grupo protector (R¹) que puede eliminarse en condiciones ácidas, en el grupo 5' hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (21) producido mediante la etapa b2,

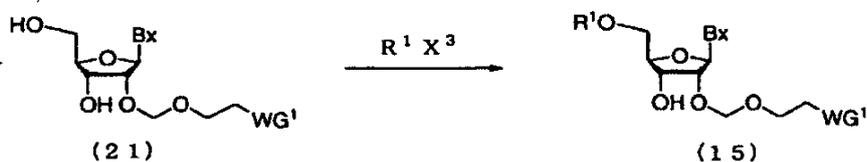


25

en donde:

A, B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente,

30 Etapa d3: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico (15) introduciendo un grupo protector (R¹) que puede eliminarse en condiciones ácidas, en el grupo 5' hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (21) producido mediante la etapa c3,

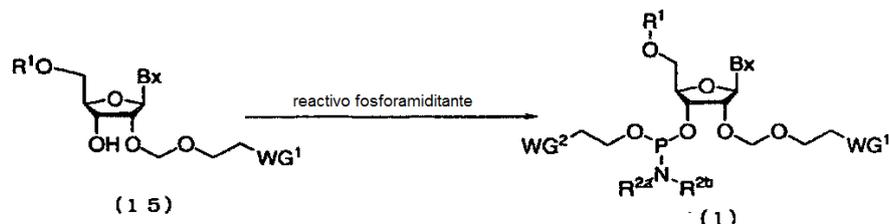


en donde:

B_x, R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

X³ representa halógeno,

- 5 Etapa d2: proceso para producir un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1) fosforamiditando el grupo 3' hidroxilo permitiendo que un reactivo fosforamiditante y si es necesario un agente activador actúe en un derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa v2,



- 10 en donde:

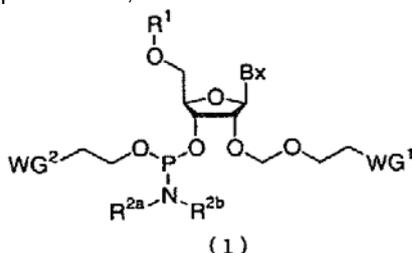
B_x, R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

- 15

WG² representa un grupo de extracción de electrones,

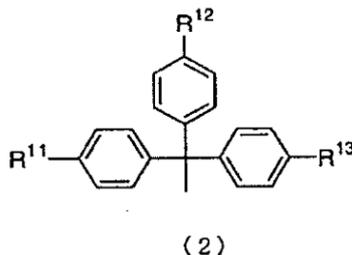
11. Un procedimiento para producir un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1), comprendiendo el procedimiento las etapas a3 a e3,



- 20 en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

R¹ representa un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



- 25 en donde:

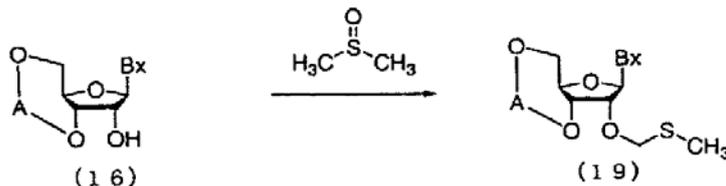
R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente forman un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

- 30

WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno y WG² representa un grupo de extracción de electrones,

Etapa a3: proceso que se realiza de forma separada de las etapas a a c, para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por las siguiente fórmula general (19) permitiendo que el dimetilsulfóxido, ácido acético y anhídrido acético actúen en el compuesto de ácido ribonucleico (16),



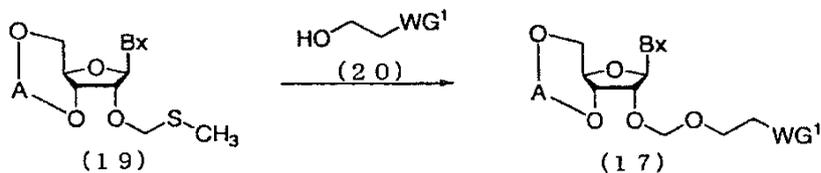
5

en donde:

A y B_x son los mismos que se definieron anteriormente,

10

Etapa b3: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo, permitiendo que un compuesto de alcohol representado por la siguiente fórmula general (20), un ácido y un agente de halogenación para un átomo de azufre actúen en un derivado de nucleósido (19) producido en la etapa a3,



15

en donde:

A, B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente,

20

Etapa c3: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (21) eliminando los grupos protectores del grupo 3' y 5' hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (17) producido mediante la etapa b3,

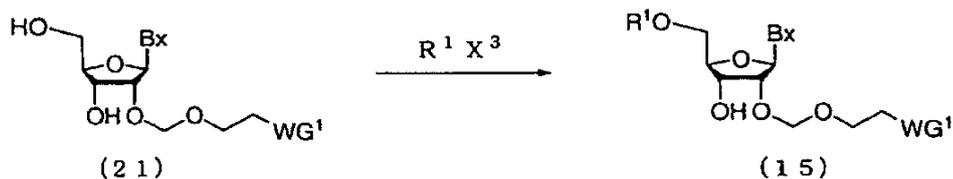


en donde:

25

A, B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa d3: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico (15) introduciendo un grupo protector (R¹), que puede eliminarse en condiciones ácidas, en el grupo 3' y 5' hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (21) producido mediante la etapa c3,



30

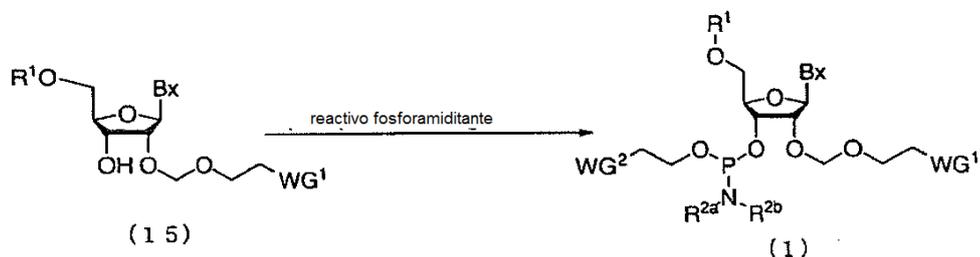
en donde:

B_x, R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

35

X³ representa halógeno,

Etapa e3: proceso para producir un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1) fosforamiditando el grupo 3' hidroxilo permitiendo que un reactivo fosforamiditante y si es necesario un agente activador actúen en un derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa d3,



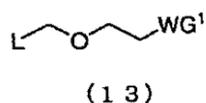
5

en donde:

B_x, R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente;

10 R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros opcionalmente teniendo un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y WG² representa un grupo de extracción de electrones.

12. El procedimiento para producir un compuesto de fosforamidita de acuerdo con 9 a 11, en donde el reactivo alquilante es un compuesto de éter representado por la siguiente fórmula general (13).



15

en donde:

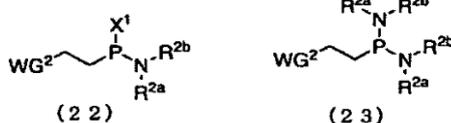
L representa halógeno, un grupo ariltilio, un grupo alquilsulfóxido o un grupo alquilitio;

y

WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno.

20 13. El procedimiento para producir un compuesto de fosforamidita de acuerdo con cualquiera de 9 a 12, en donde WG¹ es ciano.

14. El procedimiento para producir un compuesto de fosforamidita de acuerdo con cualquiera de 9 a 13, en donde el reactivo de fosforamidita es un compuesto representado por la siguiente fórmula general (22) o (23),



25 en donde:

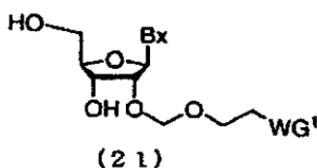
R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente;

30 WG² representa un grupo de extracción de electrones; y

X¹ representa halógeno.

15. El procedimiento para producir un compuesto de fosforamidita de acuerdo con cualquiera de 9 a 14, en donde el agente activador es 1H-tetrazol, 5-etiltiotetrazol, 5-bencilmercapto-1H-tetrazol, 4,5-dicloroimidazol, 4-5-dicianoimidazol, benzotriazol triflato, pridinio triflato, N-N-diisopropieletilamina o 2,4,6-colidina/N-metilimidazol.

35 16. Un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (21),

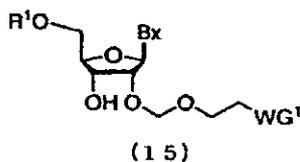


en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno.

5 17. El compuesto de ácido ribonucleico de acuerdo con 16, en donde WG¹ es ciano.

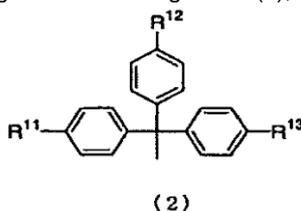
18. Un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (15),



en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector;

10 R¹ es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



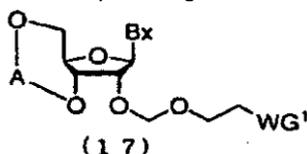
en donde:

R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

y WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno.

15 19. El compuesto de ácido ribonucleico de acuerdo con 18, en donde WG¹ es ciano.

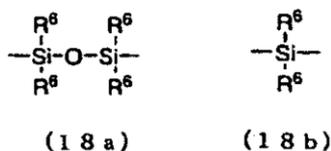
20. Un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17),



en donde:

B_x representa un nucleobase que puede tener un grupo protector;

20 A representa un sustituyente de silicio representado por la siguiente fórmula general (18a) o (18b),



en donde:

R⁶ representa alquilo;

y

25 WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno.

21. El compuesto de ácido ribonucleico de acuerdo con 20, en donde WG¹ es ciano.

EJEMPLOS

La presente invención se describirá ahora más detalladamente con referencia a los ejemplos, a los cuales, sin embargo, la presente invención no se limita.

5 Ejemplo 1

Clorometil 2-cianoetiléter

Etapa 1

Producción de metiltiometil 2-cianoetil éter

10 Se disolvió 3-hidroxiopropionitrilo (32 g, 450 mmol) en 450 mL de dimetilsulfóxido y se agregaron 324 mL de anhídrido acético y 231 mL de ácido acético al mismo, y la solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas.

15 Se disolvió bicarbonato de sodio (990 g) en 4,5 L de agua, y la solución de reacción se agregó a la solución de bicarbonato de sodio acuoso por goteo durante 1 hora. La solución de reacción se agitó durante 1 hora y se sometió a la extracción con etil acetato, y el extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se destiló. El producto aceitoso obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener 41 g de metiltiometil 2-cianoetiléter como un producto aceitoso incoloro (rendimiento 70%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : 2,18 (s, 3H); 2,66 (t, 2H, J =6,3 Hz); 3,77 (t, 2H, J =6,3 Hz); 4,69 (s, 2H)

Etapa 2

Producción de clorometil 2-cianoetil éter

20 Se disolvió metiltiometil 2-cianoetil éter (3,3 g, 25 mmol) en 70 mL de cloruro de metileno y se agregaron 2 mL de cloruro de sulfurilo (25 mmol) por goteo, y la reacción se llevó a cabo adicionalmente a temperatura ambiente durante 1 hora.

Luego de que se completó la reacción, el disolvente se destiló bajo presión reducida para obtener 2,5 g del compuesto objetivo como un producto aceitoso incoloro (rendimiento 85%).

25 Punto de ebullición: 84 - 85°C (0,3 Torr)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 2,72 (t, 2H, J =6, 3 Hz); 3, 92 (t, 2H, J =6,3 Hz); 5,52 (s, 2H)

Ejemplo 2

5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)-uridina 3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

Etapa 1

30 Producción de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)-uridina

Se disolvió 5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)uridina (546 mg, 1 mmol) en 4 mL de 1,2 dicloroetano, y 452 mg de diisopropiletilamina (3,5 mmol) se agregó al mismo, y 365 mg de dibutilestanil dicloruro (1,2 mmol) se agregaron adicionalmente al mismo. La reacción se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

35 Posteriormente, la reacción se llevó a cabo a 80°C y se agregaron 155,4 mg de clorometil 2-cianoetiléter (1,3 mmol) por goteo, y la solución de reacción se agitó durante 30 minutos.

Luego de que la reacción se completó, la solución de reacción se agregó en una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso y se sometió a extracción con cloruro de metileno, y el extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se destiló. La mezcla obtenida se purificó mediante 30 g de cromatografía en columna de gel de sílice para obtener 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)-uridina (197 mg; rendimiento 34 %).

40 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 2, 47 (d, 1H, J =7,8 Hz); 2,69 (t, 2H, J =6,3 Hz); 3,55 (dd, 1H, J = 11, 3, 2, 2 Hz); 3,62 (dd, 1H, J =11,3, 2,2 Hz); 3, 83 (s, 6H); 3,87 (t, 2H, J =6,3 Hz); 4,07 - 4,08 (m, 1H); 4,32 (dd, 1H, J =5,3, 1,9 Hz); 4,54 (q, 1H, J =5, 3 Hz); 4,94, 5,11 (2d, 2H, J =6,9 Hz); 5,32 (d, 1H, J =8,2 Hz); 6,00 (d, 1H, J =1,9 Hz); 6,85 - 6,88 (m, 4H); 7,29 - 7,41 (m, 9H); 8,02 (d, 1H, J =8,2 Hz); 8,53 (br,s, 1H)

ESI-Masa: 652 [M+Na]⁺

45 Etapa 2

Producción de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)-uridina 3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil fosforamidita)

Se disolvió 5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)-uridina (209 g, 0,332 mmol) en 2 mL de acetonitrilo obtenido en la etapa 1 y 23 mg de tetrazol (0,332 mmol) y se agregaron 150 mg de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropil fosforodiamidita (0,498 mmol) por goteo y la reacción se llevó a cabo a 45°C durante 1,5 horas.

- 5 Luego de que la reacción se completó, la solución de reacción se mezcló con una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso y se sometió a extracción con etil acetato, y el extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se destiló. La mezcla obtenida se purificó mediante 20 g de cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (200 mg; rendimiento 73 %).

ESI-Masa: 852 [M+Na]⁺

Ejemplo 3

- 10 2'-O-(2-Cianoetoximetil)uridina

Etapa 1

Producción de 3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil) -2'-O-(2-cianoetoximetil)uridina

- 15 Se disolvió 3',5'-O-(Tetraisopropildisiloxan-1,3-diil) uridina (150 mg, 0,3 mmol) en 7 mL de tetrahidrofurano bajo una atmósfera de argón, y 54 mg de metiltiometil 2-cianoetiléter (0,4 mmol) y se agregaron 100 mg de tamices moleculares de 4A, y la solución de reacción se agitó durante 10 minutos. La reacción se llevó a cabo a 0°C y se agregaron 2 mL de una solución de ácido trifluorometanosulfónico (10 mg, 0,06 mmol) en tetrahidrofurano. Luego se agregaron 92 mg de N-yodosuccinimida (0,4 mmol), y la solución de reacción se agitó durante 1 hora. Luego de que se completó la reacción, la solución de reacción se filtró a través de celite y se lavó con cloruro de metilo, y la capa orgánica obtenida se lavó con solución 1 M de tiosulfato de hidrógeno de sodio acuoso. La capa orgánica se lavó con una solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se extrajo por destilación.

- 20 El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de capa fina para obtener 3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)uridina (150 mg; rendimiento 85 %).

- 25 ¹H-NMR (CDCl₃) : 0,97 - 1,12 (m, 28H); 2,68 - 2,73 (m, 2H); 3,78 - 3,86 (m, 1H); 3,96 - 4,05 (m, 2H); 4,12 - 4,30 (m, 4H); 5,0 - 5,04 (m, 2H); 5,70 (d, 1H, J =8,2 Hz); 5,75 (s, 1H); 7,90 (d, 1H, J =8,2 Hz); 9,62 (br,s, 1H)

ESI-Masa: 570 [M+H]⁺

Etapa 2

Producción de 2'-O-(2-cianoetoximetil)uridina

- 30 Se disolvió 3',5'-O-(Tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)uridina (200 mg, 0,35 mmol) obtenida en la etapa 1 en 2 mL de metanol y se agregaron en el mismo 65 mg de fluoruro de amonio (1,76 mmol) y la solución de reacción se agitó con calentamiento a 50°C durante 5 horas.

Luego del enfriamiento de aire, se agregó acetonitrilo a la solución de reacción. La solución se agitó y se filtró y se concentró.

- 35 El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (108 mg; rendimiento 94 %).

¹H-NMR (CD₃OD): 2,72 - 2,76 (t, 2H, J =6,2 Hz); 3,68 - 3,92 (m, 4H); 4,00 - 4,03 (m, 1H); 4,26 - 4,32 (m, 2H); 4,81 - 4,95 (m, 2H); 5,71 (d, 1H, J =8,1 Hz); 6,00 (d, 1H, J =3,3 Hz); 8,10 (d, 1H, J =8,1 Hz)

ESI-Masa: 350 [M+Na]⁺

Ejemplo 4

- 40 Producción de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil) uridina

Se sometió 2'-O-(2-Cianoetoximetil)uridina (14 g, 43 mmol) a una destilación azeotrópica con piridina y luego se secó con una bomba de vacío durante 30 minutos.

El residuo se disolvió en 300 mL de tetrahidrofurano y 68 g de piridina (856 mmol) y se agregaron 20 g de tamices moleculares de 4A bajo una atmósfera de argón y la mezcla se agitó durante 10 minutos.

- 45 A la solución de reacción se agregaron 19,6 g de 4,4'-dimetoxitritilcloruro (57,8 mmol) en 3 porciones cada 1 hora y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1 hora.

Luego de que se agregaron 10 mL de metanol y la solución de reacción se agitó durante 2 minutos, la solución de reacción se filtró con celite y se lavó con etil acetato.

Luego de concentrar el filtrado, el residuo se disolvió en etil acetato y se lavó con una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso.

Luego de que la capa orgánica se lavó con salmuera saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se destiló.

- 5 El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (26,5 g; rendimiento 98 %).

Ejemplo 5

N⁴-Acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil fosforamidita)

Etapa 1

- 10 Producción de N⁴-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina

Se disolvió N⁴-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-citidina (588 mg, 1 mmol) en 4 mL de 1,2-dicloroetano y se agregaron 452 mg de diisopropiletilamina (3,5 mmol) al mismo y luego se agregaron 365 mg de dibutilestanil dicloruro (1,2 mmol) adicionalmente al mismo. La reacción se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

- 15 Posteriormente, la reacción se llevó a cabo a 80°C y se agregaron 155,4 mg de cloromoetil 2-cianoetiléter (1,3 mmol) por goteo, y la solución de reacción se agitó durante 60 minutos.

Luego de que la reacción se completó, la solución de reacción se agregó en una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso y se extrajo con cloruro de metileno.

El extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se destiló.

- 20 La mezcla obtenida se purificó mediante 30 g de cromatografía en columna de gel de sílice para obtener N⁴-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina (219 mg; rendimiento 35 %).

¹H-NMR (CDCl₃) : 2,19 (s, 3H); 2,56 (d, 1H, J =8,8 Hz); 2,65 (t, 2H, J =6,2 Hz); 3,55 (dd, 1H, J =10,5; 2,5 Hz); 3,63 (dd, 1H, J =10,5, 2,5 Hz); 3,82 (s, 6H); 3,86 (t, 2H, J =6,2 Hz); 4,09 - 4,14 (m, 1H); 4,28 (d, 1H, J =5,1 Hz); 4,44 - 4,49 (m, 1H); 4,97, 5,24 (2d, 2H, J =6,9 Hz); 5,96 (s, 1H); 6,86 - 6,88 (m, 4H); 7,09 (d, 1H, J =6,9 Hz); 7,26 - 7,42 (m, 9H); 8,48 (d, 1H, J =6,9 Hz); 8,59 (br,s, 1H)

- 25 ESI-Masa: 693 [M+Na]⁺

Etapa 2

Producción de N⁴-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

- 30 El N⁴-Acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil) citidina (205 mg, 0,306mmol) obtenido en la etapa 1 se disolvió en 2 mL de cloruro de metileno y se agregaron 105 mg de diisopropiletilamina (0,812 mmol) y se agregaron por goteo 116 mg de 2-cianoetil N,N-diisopropil clorofosforamidita (0,49 mmol). La solución de reacción se hizo reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente.

Luego de que se completó la reacción, el disolvente se destiló y la mezcla obtenida se purificó con 20 g de cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (242 mg; rendimiento 91 %).

- 35 ESI-Masa: 871 [M+H]⁺

Ejemplo 6

N⁴-Acetil-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina

Etapa 1

Producción de N⁴-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan -1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina

- 40 Se mezclaron N⁴-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)citidina (1,00 g, 1,89 mmol) y metiltiometil 2-cianoetiléter (500 mg, 3,79 mmol) y la mezcla se disolvió en un disolvente mezclado de 10 mL de tolueno y 10 mL de tetrahidrofurano.

- 45 Posteriormente, se agregaron 975 mg de trifluorometanosulfonato de plata y se secó agregando tamices moleculares de 4A. Bajo enfriamiento con hielo, se agregaron 370 mg de N-bromosuccinimida (2,08 mmol) y la solución se agitó durante 10 minutos en el recipiente de reacción protegido de la luz.

Además se agregaron 70 mg de N-bromosuccinimida (0,39mmol) y se agitó durante 25 minutos.

Luego de que se completó la reacción, la solución de reacción se diluyó con cloruro de metileno y se lavó con una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso. El extracto se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se destiló. La mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener N⁴-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil) citidina (936 mg; rendimiento 81 %).

- 5 ¹H-NMR (CDCl₃) : 0,90 - 1,11 (m, 28H); 2,28 (s, 3H); 2,62 - 2,79 (m, 2H); 3, 78 - 3,89 (m, 1H); 3, 96 - 4,04 (m, 2H); 4,19 - 4,23 (m, 3H); 4,30 (d, 1H, J =13,6 Hz); 5,00 (d, 1H, J =6,8 Hz); 5,09 (d, 1H, J =6,8 Hz); 5,77 (s, 1H); 7,44 (d, 1H, J =7,5 Hz); 8,30 (d, 1H, J =7,5 Hz); 10,13 (s, 1H)

ESI-Masa: 611 [M+H]⁺

Etapa 2

- 10 Producción de N⁴-Acetil-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina

La N⁴-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina (500 mg, 0,819 mmol) obtenida en la etapa 1 se disolvió en un disolvente mezclado de 2,5 mL de tetrahidrofurano y 2,5 mL de metanol y se agregaron 150 mg de fluoruro de amonio (4,10 mmol) y luego la solución de reacción se hizo reaccionar a 50°C durante 4 horas.

- 15 Luego de que se completó la reacción, la solución de reacción se diluyó con acetonitrilo y se filtró, y el disolvente se destiló. La mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (210 mg; rendimiento 70 %).

- 20 ¹H-NMR (D₂O): 2, 13 (s, 3H); 2,66 - 2,71 (m, 2H); 3, 72 - 3,78 (m, 3H); 3,90 (dd, 1H, J =13,0, 2,6 Hz); 4, 06 - 4, 11 (m, 1H); 4,20 (dd, 1H, J =7,1, 5,2 Hz); 4,29 (dd, 1H, J =5,1, 2,9 Hz); 4,83 (d, 1H, J =7,2 Hz); 4,94 (d, 1H, J =7,2 Hz); 5, 95 (d, 1H, J =2,9 Hz); 7,25 (d, 1H, J =7, 6 Hz); 8,25 (d, 1H, J =7,6 Hz)

ESI-Masa: 391 [M+Na]⁺

Ejemplo 7

Producción de N⁴-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina

- 25 Se sometió 2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina (9,9 g, 26,8 mmol) a destilación azeotrópica con piridina y luego se secó con una bomba de vacío durante 30 minutos. El residuo se disolvió en 190 mL de tetrahidrofurano y 43 g de piridina (538 mmol) y se agregaron 20 g de tamices moleculares de 4A bajo una atmósfera de argón y la mezcla se agitó durante 10 minutos.

A la solución de reacción se agregaron 11,8 g de 4,4'-dimetoxitritilcloruro (34,9 mmol) en 3 porciones cada 1 hora y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1 hora.

- 30 Luego de que se agregaron 2 mL de metanol y la solución de reacción se agitó durante 2 minutos, la solución de reacción se filtró con celite y se lavó con etil acetato.

Luego de concentrar el filtrado con evaporación, el residuo se disolvió en etil acetato y se lavó con una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso. Luego de que la capa orgánica se lavó con salmuera saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se destiló.

- 35 El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (15 g; rendimiento 83 %).

Ejemplo 8

N²-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

- 40 Etapa 1

Producción de N²-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina

Se disolvió N²-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina (627 mg, 1 mmol) en 4 mL de 1,2 dicloroetano y se agregaron 452 mg de diisopropiletilamina (3,5 mmol) y luego se agregaron 365 mg de dibutilestanil dicloruro (1,2 mmol). Luego la solución de reacción se hizo reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente.

- 45 Posteriormente, la solución de reacción se calentó hasta 80°C y se agregaron 155,4 mg de cloroetil 2-cianoetiléter (1,3 mmol) por goteo, y la solución de reacción se agitó durante 60 minutos.

Luego de que la reacción se completó, la solución de reacción se mezcló con una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso y se sometió a la extracción con cloruro de metileno. El extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se destiló.

La mezcla obtenida se purificó mediante 30 g de cromatografía en columna de gel de sílice para obtener N²-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina (450 mg; rendimiento 63 %).

5 ¹H-NMR (CDCl₃) : 1,92 (s, 3H); 2,47 - 2,51 (m, 2H); 2,68 (br,s, 1H); 3,30 (dd, 1H, J =10,7, 3,8 Hz); 3,47 (dd, 1H, J =10,7, 3,8 Hz); 3,55 - 3,60 (m, 1H); 3,65 - 3,70 (m, 1H); 3,74, 3,75 (2s, 6H); 4,22 - 4,23 (m, 1H); 4,55 - 4,58 (m, 1H); 4,78, 4,83 (2d, 2H, J =7,0 Hz); 5,01 (t, 1H, J =5,1 Hz); 5,99 (d, 1H, J=5,1 Hz); 6,76 - 6,79 (m, 4H); 7,17 - 7,44 (m, 9H); 7,88 (s, 1H); 8,36 (br,s, 1H); 12,06 (br,s, 1H)

Etapa 2

Producción de N²-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

10 La N²-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina (400 mg, 0,563 mmol) obtenido en la etapa 1 se disolvió en 2 mL de cloruro de metileno y se agregaron 181 mg de diisopropiletilamina (1,4 mmol) y se agregaron por goteo 161 mg de 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (0,68 mmol). Luego la reacción se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

15 Luego de que se completó la reacción, el disolvente se destiló y la mezcla obtenida se purificó con 20 g de cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (471 mg; rendimiento 92 %).

Ejemplo 9

N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

Etapa 1

Producción de N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina

20 Se disolvió N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)adenosina (22,0 g, 36,0 mmol) en 170 mL de 1,2 dicloroetano y se agregaron 16,3 g de diisopropiletilamina (126 mmol) y luego se agregaron 12,1 g de dibutilestanil dicloruro (39,7 mmol). Luego la reacción se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de reacción se calentó hasta 80°C y se agregaron 4,30 g de cloromoetil 2-cianoetiléter (36,0 mmol) por goteo y la solución de reacción se agitó durante 30 minutos.

25 Luego de que la reacción se completó, la solución de reacción se mezcló con una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso y se sometió a la extracción con cloruro de metileno.

El extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se destiló. La mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil) adenosina (7,47 g; rendimiento 33 %).

30 ¹H-NMR (CDCl₃): 2,51 (t, 2H, J =6,2 Hz); 2,58 (d, 1H, J =5,5 Hz); 2,61-(s, 3H); 3,45 (dd, 1H, J =10,7, 4,0 Hz); 3,54 (dd, 1H, J =10,7, 3,2 Hz); 3,62 - 3,79 (m, 2H); 3,79 (s, 6H); 4,25 (br,q, 1H, J =4, 6 Hz); 4,59 (q, 1H, J =5,2 Hz); 4,87 - 4,94 (m, 3H); 6,23 (d, 1H, J =4,4 Hz); 6,80 - 6,83 (m, 4H); 7,22 - 7,32 (m, 7H); 7,40 - 7,43 (m, 2H); 8,20 (s, 1H); 8,61 (br,s, 1H); 8,62 (s, 1H)

ESI-Masa: 695 [M+H]⁺

35 Etapa 2

Producción de N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

40 El N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina (10,0 g, 14,4 mmol) obtenido en la etapa 1 se disolvió en 75 mL de cloruro de metileno y se agregaron 4,7 g de diisopropiletilamina (36 mmol) y se agregaron por goteo 4,82 g de 2-cianoetil N,N-diisopropil clorofosforamidita (20,3 mmol). Luego la reacción se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

Luego de que se completó la reacción, el disolvente se destiló y la mezcla obtenida, en la cual permanecieron aproximadamente 30 mL del disolvente, se purificó con cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (12,0 g; rendimiento 93 %). ESI-Masa: 895 [M+H]⁺

45 Ejemplo 10

N⁶-Acetil-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina

Etapa 1

Producción de N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina

En 8 mL de cloruro de metileno se suspendieron 245 mg de N-yodosuccinimida (1,09 mmol) y 280 mg de

trifluorometanosulfonato de plata (1,09 mmol), y la solución se secó agregando tamices moleculares de 4A.

A la solución de reacción se le agregó una solución de N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-adenosina (400 mg, 0,73 mmol) y 145 mg de metiltiometil 2-cianoetiléter (1,11 mmol) en 4 mL de cloruro de metileno bajo enfriamiento por hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas.

5 Luego de que se completó la reacción, la solución de reacción se diluyó con cloruro de metileno y se lavó con una solución de tiosulfato de sodio saturado acuoso y solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso. El extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se destiló. La mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina (201 mg; rendimiento 45 %).

10 ¹H-NMR (CDCl₃) : 0,98 - 1,11 (m, 28H); 2,62 (s, 3H); 2,69 (td, 2H, 6,5, J=1,5 Hz); 3,81 - 3,89 (m, 1H); 4,02 - 4,09 (m, 2H); 4,17 (d, 1H, J=9,4 Hz); 4,28 (d, 1H, J=13,4 Hz); 4,50 (d, 1H, J=4,5 Hz); 4,67 (dd, 1H, J=8, 8, 4,5 Hz); 5,02 (d, 1H, J=7,0 Hz); 5,08 (d, 1H, J=7,0 Hz); 6,10 (s, 1H); 8,34 (s, 1H); 8,66 (s, 1H); 8,67 (s, 1H)

ESI-Masa: 636 [M+H]⁺

Etapas 2

15 Producción de N⁶-Acetil-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina

El N⁶-Acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina (300 mg, 0,47 mmol) obtenido en la etapa 1 se disolvió en un disolvente mezclado de 0,1 mL de ácido acético y 2 mL de 0,5 M de una solución de fluoruro de tetrabutilamonio, y la solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego de que se completó la reacción, la mezcla de reacción obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (160 mg; rendimiento 86 %).

20 ¹H-NMR (DMSO-d₆) : 2,25 (s, 3H); 2,53 - 2,68 (m, 2H); 3,41 - 3,46 (m, 1H); 3,56 - 3,64 (m, 2H); 3,69 - 3,73 (m, 1H); 4,00 - 4,01 (m, 1H); 4,36 - 4,37 (m, 1H); 4,72 - 4,78 (m, 3H); 5,20 (bt, 2H); 5,41 (d, 1H, J=5,2 Hz); 6,17 (d, 1H, J=5,7 Hz); 8,66 (s, 1H); 8,72 (s, 1H); 10,72 (s, 1H)

ESI-Masa: 415 [M+Na]⁺

25 Ejemplo 11

Producción de N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina

Se disolvió N⁶-acetil-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina (9,50 g, 24,2 mmol) en 100 mL de piridina deshidratada y luego se secó por concentración. Luego, el residuo se disolvió en 100 mL de piridina deshidratada bajo una atmósfera de argón.

30 Bajo enfriamiento con hielo, se agregaron 10,7 g de 4,4'-dimetoxitritil-cloruro (31,2 mmol), y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora y 20 minutos. Luego de que se completó la reacción, la solución de reacción se diluyó con cloruro de metileno y se lavó con agua. El extracto se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se destiló. La mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (13,8 g; rendimiento 82 %).

35 Ejemplo 12

N²-fenoxiacetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamida)

Etapas 1

Producción de N²-fenoxiacetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina

40 Se disolvió N²-fenoxiacetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina (720 mg, 1 mmol) en 4 mL de 1,2-dicloroetano y se agregaron 452 mg de diisopropiletilamina (3,5 mmol) y luego se agregaron 365 mg de dibutilestanil dicloruro (1,2 mmol). Luego la reacción se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se llevó a cabo a 80°C y se agregaron 155,4 mg de cloromoetil 2-cianoetiléter (1,3 mmol) por goteo y la solución se agitó durante 60 minutos.

45 Luego de que la reacción se completó, la solución de reacción se mezcló con una solución de bicarbonato de sodio saturado acuoso y se sometió a la extracción con cloruro de metileno. El extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se destiló. La mezcla obtenida se purificó mediante 30 g de cromatografía en columna de gel de sílice para obtener N²-fenoxiacetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina (384 mg; rendimiento 48 %).

50 ¹H-NMR (CDCl₃): 2,47 - 2,51 (m, 2H); 2,58 (br,s, 1H); 3,42 (dd, 1H, J=10,1, 3,8 Hz); 3,46 (dd, 1H, J=10,1, 3,8 Hz);

3,53 - 3,57 (m, 1H); 3,69 - 3,73 (m, 1H); 3,77 (s, 6H); 4,24 - 4,26 (m, 1H); 4,48 - 4,50 (m, 1H); 4,61 - 4,65 (m, 2H); 4,83, 4,87 (2d, 2H, J =7,0 Hz); 4,88 (t, 1H, J =5,7 Hz); 6,05 (d, 1H, J =5,7 Hz); 6,80 - 6,82 (m, 4H); 6,92 - 6,96 (m, 3H); 7,07 - 7,11 (m, 2H); 7,20 - 7,42 (m, 9H); 7,84 (s, 1H); 8,99 (s, 1H); 11,81 (br,s, 1H)

ESI-Masa: 825 [M+Na]+,

5 Etapa 2

Producción de N²-fenoxiacetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)

10 El N²-fenoxiacetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina (320 mg, 0,399 mmol) obtenido en la etapa 1 se disolvió en 4 mL de cloruro de metileno y se agregaron 128,8 mg de diisopropiletilamina (0,996 mmol) y por goteo y se agregaron 141,5 mg de 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforamidita (0,598 mmol) por goteo. Luego la reacción se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Luego de que se completó la reacción, el disolvente se destiló y la mezcla obtenida se purificó con 30 g de cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (316 mg; rendimiento 79 %).

ESI-Masa: 1003 [M+H]⁺

15 Ejemplo 13

N²-fenoxiacetil-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina

Etapa 1

Producción de N²-fenoxiacetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina

20 Se disolvió N²-fenoxiacetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)guanosina (2,0 g, 3,0 mmol) en 16 mL de tetrahidrofurano, y 0,99 g de metiltiometil 2-cianoetiléter (7,6 mmol) y se agregó 1,0 g de tamices moleculares de 4A, y la solución de reacción se agitó a -45°C durante 10 minutos bajo una atmósfera de argón.

Luego se agregó una solución de 0,68 g de ácido trifluorometanosulfónico (4,5 mmol) en 5 mL de tetrahidrofurano y la solución de reacción se agitó, se agregaron 1,02 g de N-yodosuccinimida (4,5 mmol) y la solución de reacción se agitó durante 15 minutos.

25 Luego se agregó una solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado a la solución de reacción y luego la solución de reacción se filtró, la capa orgánica se lavó con solución 1M de tiosulfato de hidrógeno de sodio acuoso.

Adicionalmente, la solución de reacción se lavó con agua y salmuera saturada secuencialmente, y el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente de destiló.

30 El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener N²-fenoxiacetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3 -diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina (2,0 g; rendimiento 89 %).

¹H-NMR (CDCl₃) : 0,99 - 1,11 (m, 28H) : 2,59 - 2,77 (m, 2H); 3,82 - 4,05 (m, 3H); 4,15 (d, 1H, J =9,3 Hz); 4,25 - 4,35 (m, 2H); 4,52 - 4,56 (dd, 1H, J =9,3, 4,3 Hz); 5,00 - 5,07 (2d, 2H, J =7, 2 Hz); 5,95 (s, 1H), 6,99 - 7,12 (m, 3H); 7,35 - 7,40 (m, 2H); 8,09 (s, 1H); 9,38 (br, s, 1H); 11,85 (br,s, 1H)

ESI-Masa: 766 [M+Na]+

35 Etapa 2

Producción de N²-fenoxiacetil-2'-O-(2-cianoetoximetil)-guanosina

40 Se preparó una solución que consiste en 0,14 mL de ácido acético (0,14 mmol) y 2,83 mL de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en tetrahidrofurano (2,83 mmol). El N²-fenoxiacetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3 -diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina (1,0 g, 1,35 mmol) obtenido en la etapa 1 se disolvió en 2,83 mL de tetrahidrofurano y se agregó la solución preparada anteriormente, y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora bajo una atmósfera de argón.

La solución de reacción se concentró bajo presión reducida, y el residuo se disolvió en cloruro de metileno y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto objetivo (0,67 g; rendimiento 99%).

45 ¹H-NMR (DMSO-d₆): 2,59 - 2,66 (m, 2H); 3,41 - 3,63 (m, 4H); 3,98 (m, 1H); 4,32 (m, 1H); 4,58 - 4,62 (t, 1H, J =5,3 Hz); 4,71 - 4,78 (dd, 2H, J =13,1, 6,8 Hz); 4,87 (s, 2H); 5,12 (s, 1H) 5,37 (s, 1H); 5,97 (d, 1H, J =6,1 Hz) 6,96 - 6,99 (m, 3H); 7,28 - 7,34 (m, 2H); 8,30 (s, 1H); 11,78 (br,s, 2H)

ESI-Masa: 500 [M-H]⁻

5 El oligo-ARN del compuesto del título se sintetizó ingresando un soporte sólido CPG disponible comercialmente (37 mg, 1 μ mol) que contiene 2'/3'-O-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil) uridina a una columna con un filtro de vidrio y usando un sintetizador automático para ácido nucleico (Expedite™: Applied Biosystems). Se usó 5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)uridina 3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita) como un compuesto de monómero de ácido nucleico, tetrazol como un catalizador de condensación, solución de yodo como un agente oxidante, anhídrido acético y solución de N-metilimidazol como una solución protectora.

Luego de condensar los compuestos de monómero de ácido nucleico 20 veces, el oligo-ARN se escindió haciéndolo reaccionar con 10 M de solución de etanol acuosa de metilamina como un agente de escisión a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas, y los grupos protectores de cada parte de fosfato se eliminaron.

10 Luego de concentrar la mezcla de reacción bajo presión reducida y eliminar picos indeseables con una columna de fase inversa (ODS), la solución de reacción se purificó con un eluyente (acetonitrilo – 50 mM solución amortiguadora de trietilamina - acetato).

Luego de concentrar el residuo bajo presión reducida, el residuo se hizo reaccionar con una solución 1 M THF de fluoruro de tetrabutilamonio a temperatura ambiente durante 1 hora para eliminar el grupo protector de 2'-hidroxilo.

15 Luego de desalinizar la solución de reacción, el grupo protector del extremo 5' se eliminó con 80% de ácido acético (tratamiento a temperatura ambiente durante 10 minutos). Luego de concentrar bajo presión reducida, la capa acuosa se lavó con éter y el compuesto objetivo de alta pureza se obtuvo sin purificar.

MALDI-TOF-MS:

Calculado 6367,52 [M+H]⁺

20 Encontrado 6366,50 [M+H]⁺

Queda claro, a partir del resultado analítico de la HPLC de fase inversa de la Figura 1, que el compuesto obtenido es de alta pureza.

La condición de medición es la siguiente:

Condición de medición:

25 Dispositivo HPLC

Unidad para aspirar: LC -6A (SHIMADZU CORPORATION)

Detector: SPD-6A (SHIMADZU CORPORATION)

Columna HPLC de fase inversa: Mightysil RP-18GP <4,6 mm ϕ x15 cm> (KANTO KAGAKU)

Temperatura de columna 35°C

30 Gradiente de fase móvil: Gradiente lineal, 20 min. (Solución B: 0 % - 70 %)

Solución A: 50mM trietilamina – solución amortiguadora de acetato incluyendo 5 % de acetonitrilo

Solución B: 50mM trietilamina – solución amortiguadora de acetato incluyendo 90 % de acetonitrilo

Una tasa de flujo de una fase móvil: 1 ml/min.

Longitud de onda para detección con espectrofotómetro visible ultravioleta: 260 nm

35 Ejemplo 17

Citidilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-uridina

40 El oligo-ARN del compuesto del título se sintetizó ingresando un soporte sólido CPG disponible comercialmente (37 mg, 1 μ mol) que contiene 2'/3'-O-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)uridina a una columna con un filtro de vidrio y usando un sintetizador automático de ácido nucleico (Expedite™: Applied Biosystems). Se usó 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)uridina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita), N⁴-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)citidina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita), N⁶-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita) y N²-fenoxiacetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita) como un compuesto de monómero de ácido nucleico; 5-etiltiotetrazol como un catalizador de condensación; solución de yodo como un agente oxidante; anhídrido fenoxiacético y solución de N-metilimidazol como una solución protectora.

5 Uridilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-guanilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-citidilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-uridilil-[3'→5']-adenilil-[3'→5']-timidina

El compuesto objetivo se sintetizó de la misma manera que el Ejemplo 17 (83 OD₂₆₀; rendimiento 15 %).

10 MALDI-TOF-MS:

Calculado 17476,6 [M+H]⁺

Encontrado 17474,6 [M+H]⁺

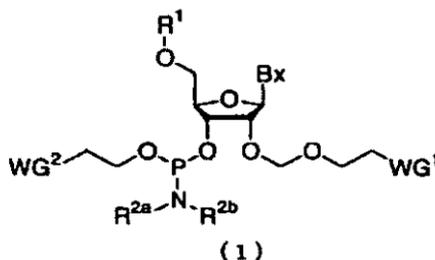
Aplicabilidad industrial

15 El compuesto de fosforamidita de la presente invención tiene un grupo protector de tipo de éter que se introduce en el grupo 2'-hidroxilo. El grupo protector de tipo de éter es un grupo protector lineal y la estructura estérica alrededor de un átomo de fósforo unido al grupo 3'-hidroxilo no está llena y, por lo tanto, el compuesto de fosforamidita de la presente invención hace posible realizar una reacción de condensación en un tiempo mucho más corto y obtener un mejor rendimiento de condensación en el proceso de sintetizar un oligo-ARN en comparación con un compuesto de fosforamidita convencional.

20 El uso del compuesto de fosforamidita de la presente invención hace posible producir un oligo-ARN de alta pureza usando esencialmente el mismo procedimiento que en la producción de oligo-ADN.

REIVINDICACIONES

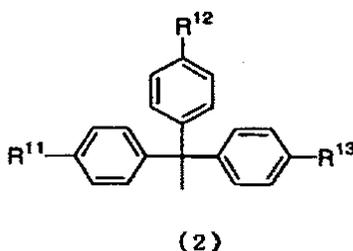
1. Un compuesto de fosforamidita representado por la siguiente fórmula general (1),



5 en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector;

R¹ es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



10 en donde:

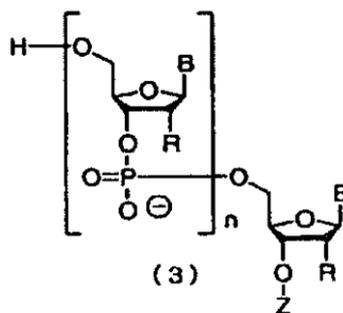
R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno y WG² representa un grupo de extracción de electrones.

2. El compuesto de fosforamidita de acuerdo con la reivindicación 1, en donde WG¹ es ciano.

3. Un procedimiento para producir un oligorribonucleótido representado por la siguiente fórmula general (3), caracterizado por usar el compuesto de fosforamidita de acuerdo con la reivindicación 1 o 2,



en donde:

cada B representa independientemente adenina, guanina, citosina, uracilo, timina o una forma modificada de los mismos;

cada R representa independientemente H o hidroxilo, y al menos uno de Rs es hidroxilo;

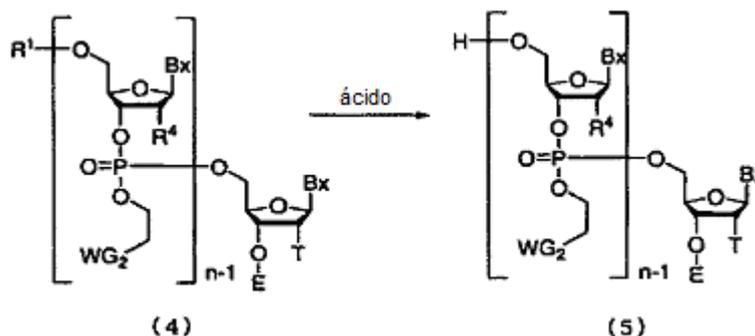
Z representa H o un grupo fosfato; y

n representa un número entero en el rango de 1 a 100.

4. El procedimiento para producir el oligorribonucleótido (3) de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende las siguientes etapas A a G,

Etapa A: proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (5) eliminando el grupo 5'-hidroxilo haciendo reaccionar un ácido con un compuesto representado por la siguiente fórmula general (4),

5

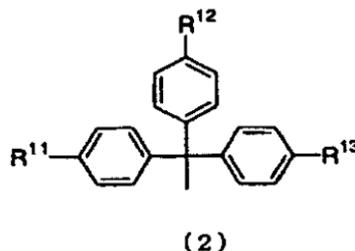


en donde:

n es el mismo que se definió anteriormente;

cada B_x representa independientemente una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

10 R¹ es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),

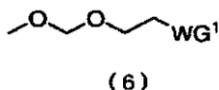


en donde:

R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

15 cada WG² representa un grupo de extracción de electrones; y

cada R⁴ representa independientemente H, aciloxi o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (6),



20 en donde:

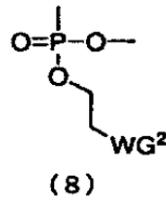
WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno; y

E representa acilo o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (7),



25 en donde:

Q representa una unión simple o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (8),

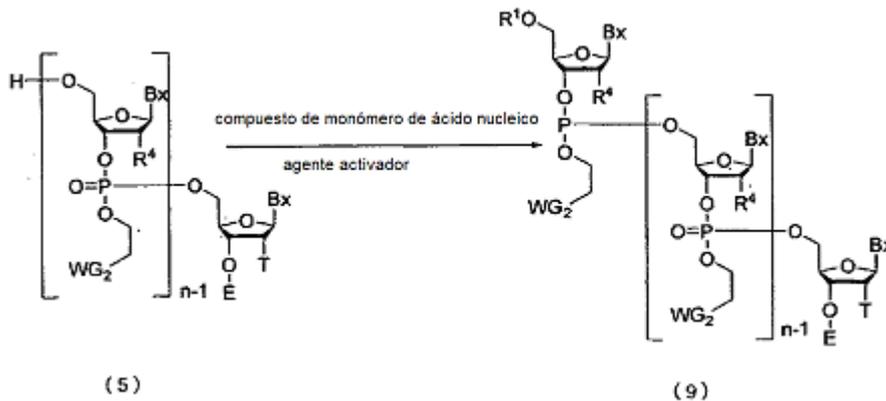


en donde:

WG² es el mismo que se definió anteriormente; y

- 5 T representa H, aciloxi o el sustituyente representado por la fórmula general anterior (6), con la condición de que ninguno de E o T sea un sustituyente (7).

Etapa B: proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (9) condensando un compuesto de monómero de ácido nucleico con el compuesto producido en la etapa A usando un agente activador,

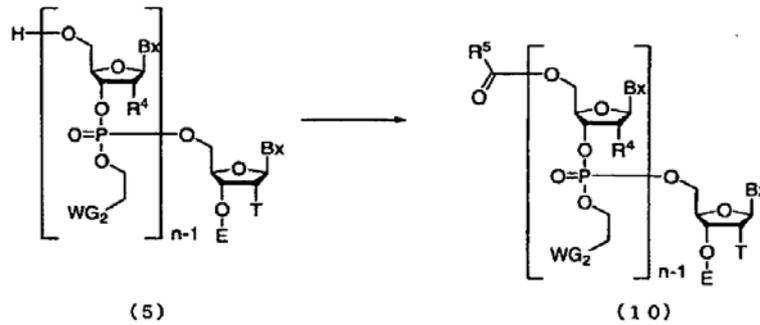


10

en donde:

B_x, E, n, R¹, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa C: proceso para proteger el grupo 5'-hidroxilo del compuesto sin reaccionar (5) en la etapa B,



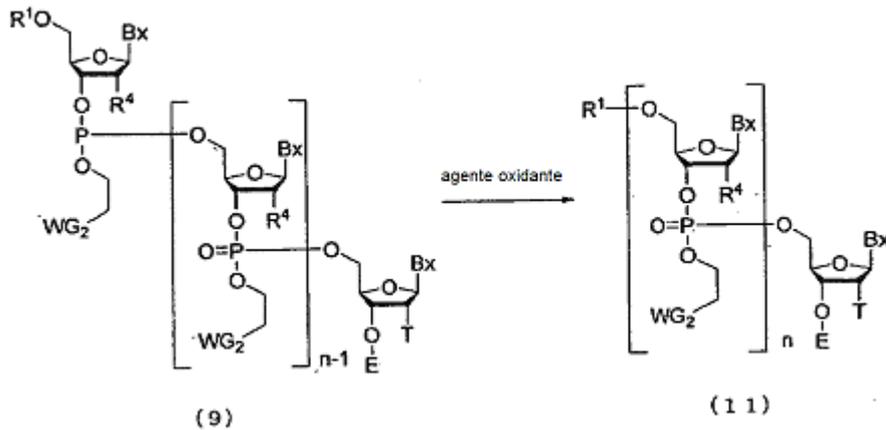
15

en donde:

B_x, E, n, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente; y

R⁵ representa metilo o fenoximetilo,

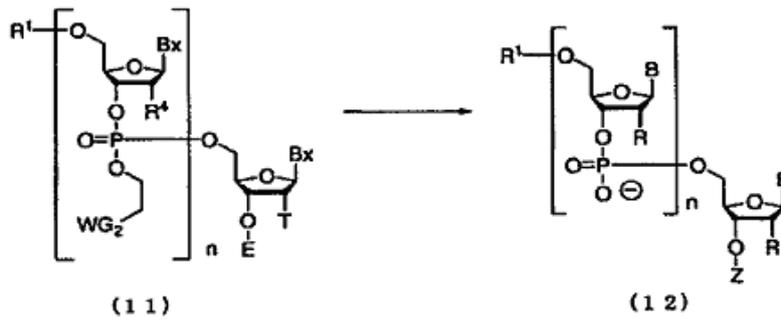
- 20 Etapa D: proceso para convertir un grupo fosforoso en un grupo fosfato haciendo reaccionar un agente oxidante con el compuesto (9) que se produce en la etapa B,



en donde:

B_x, E, n, R¹, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente,

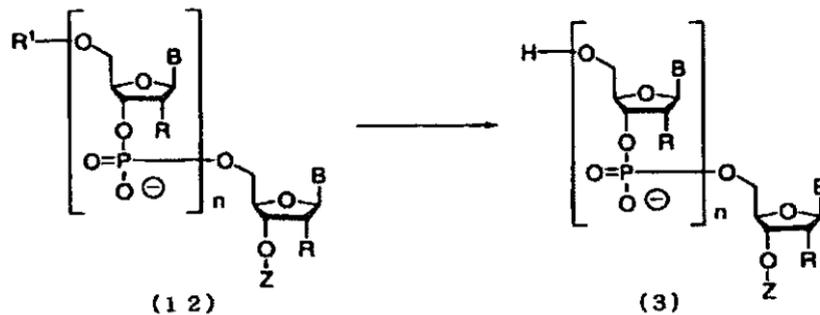
5 Etapa E: proceso para escindir el compuesto (11) producido mediante la etapa D a partir del soporte sólido y luego desproteger cada nucleobase y cada grupo 2'-hidroxilo,



en donde:

B, B_x, E, n, R, R¹, R⁴, T, WG² y Z son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa F: proceso para eliminar el grupo protector de 5'-hidroxilo del compuesto (12) producido mediante la etapa (E),



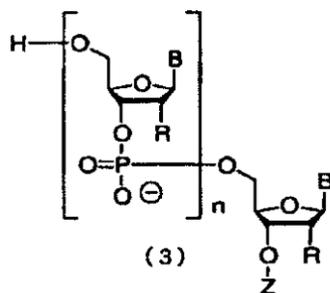
10

en donde:

B, n, R, R¹ y Z son como se definieron anteriormente,

Etapa G: proceso para aislar y purificar el oligorribonucleótido (3) producido en la etapa F.

15 5. Un procedimiento para producir un oligonucleótido representado por la siguiente fórmula general (3) que comprende las siguientes etapas A a D, en donde el compuesto de monómero de ácido nucleico en la etapa B es el compuesto de fosoramidita de acuerdo con la reivindicación 1 o 2,



en donde:

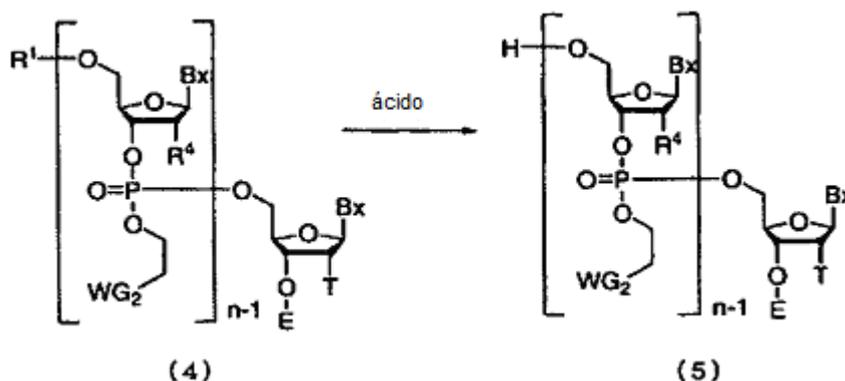
5 cada B representa independientemente adenina, guanina, citosina, uracilo, timina o una forma modificada de los mismos;

cada R representa independientemente H o hidroxilo y al menos uno de R es hidroxilo;

Z representa H o un grupo fosfato; y

n representa un número entero en el rango de 1 a 100.

10 Etapa A: proceso para producir un compuesto representado por la siguiente fórmula general (5) eliminando el grupo protector de 5'-hidroxilo haciendo reaccionar un ácido en un compuesto representado por la siguiente fórmula general (4),

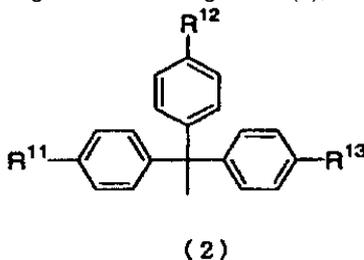


15 en donde:

n es el mismo que se definió anteriormente;

cada B_x representa independientemente una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

R¹ es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),

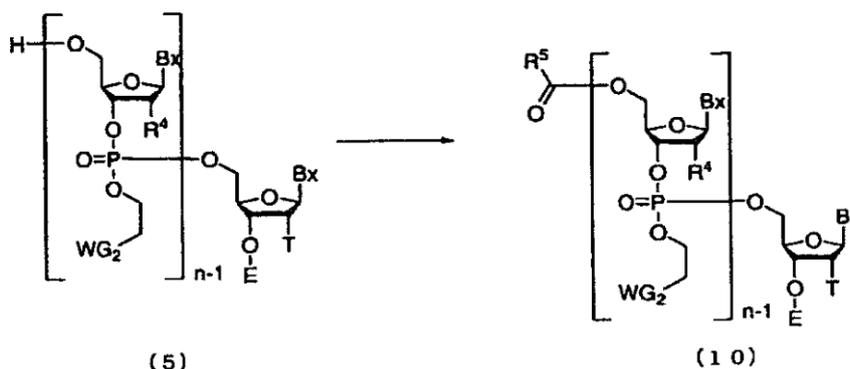


20 en donde:

R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

cada WG² representa un grupo de extracción de electrones; y

25 cada R⁴ representa independientemente H, aciloxi o un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (6),

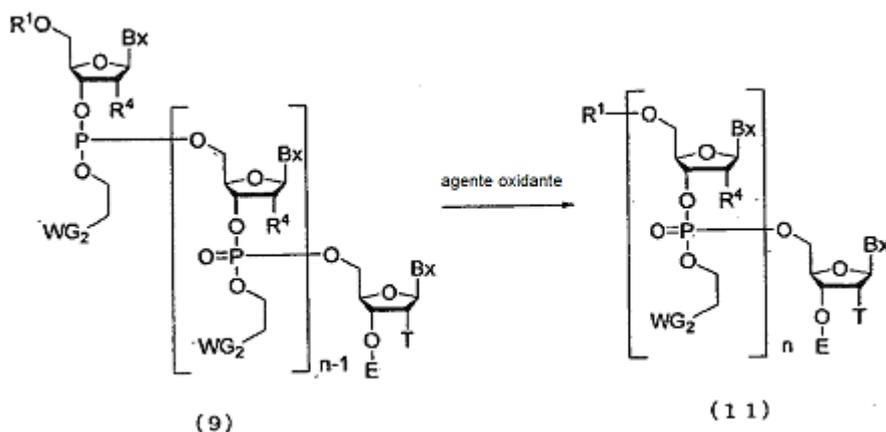


en donde:

B_x, E, n, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente; y

5 R⁵ representa metilo o fenoximetilo,

Etapa D: proceso para convertir un grupo fosforoso en un grupo fosfato haciendo reaccionar un agente oxidante en el compuesto (9) producido en la etapa B,



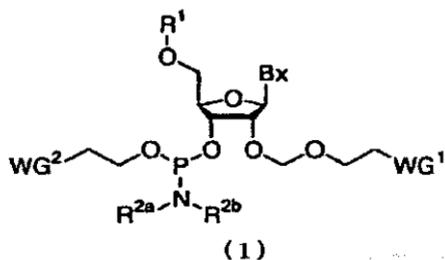
10

en donde:

B_x, E, n, R¹, R⁴, T y WG² son los mismos que se definieron anteriormente.

6. El procedimiento para producir un oligorribonucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 que se caracteriza por la adición de alquilamina, amidina, tiol, un derivado de tiol o mezclas de los mismos en la etapa E.

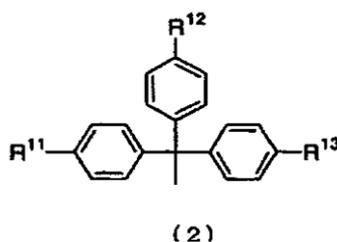
15 7. Un procedimiento para producir un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general (1), comprendiendo el procedimiento las etapas a a c,



en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

20 R¹ representa un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



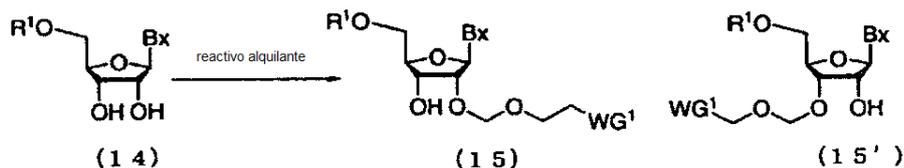
en donde:

R^{11} , R^{12} y R^{13} son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

5 R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

10 WG^1 representa ciano, nitro, alquil C_1 - C_5 sulfonilo o halógeno y WG^2 representa un grupo de extracción de electrones,

Etapa a: proceso para producir un derivado de nucleósido representado por las siguientes fórmulas generales (15) y (15'), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo, permitiendo que un reactivo alquilante actúe en un derivado de nucleósido representado por la siguiente fórmula general (14),



15

en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

R^1 y WG^1 son los mismos que se definieron anteriormente,

20 Etapa b: proceso para aislar y purificar el derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa a,

Etapa c: proceso para producir un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general (1) fosoramiditando el grupo 3'-hidroxilo permitiendo que un reactivo fosoramiditante y si es necesario un agente activador actúe en un derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa b,



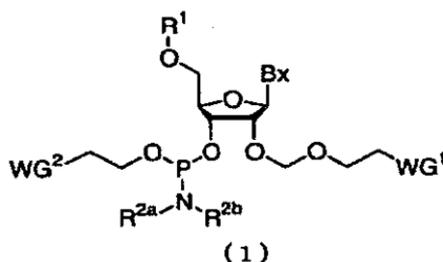
25 en donde:

B_x , R^1 y WG^1 son los mismos que se definieron anteriormente;

30 R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo, o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

WG^2 representa un grupo de extracción de electrones.

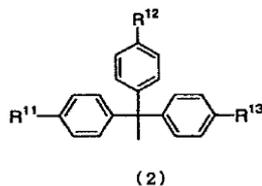
8. Un procedimiento para producir un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general (1), comprendiendo el procedimiento las etapas a2 a d2,



en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

R¹ representa un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



5

en donde:

R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

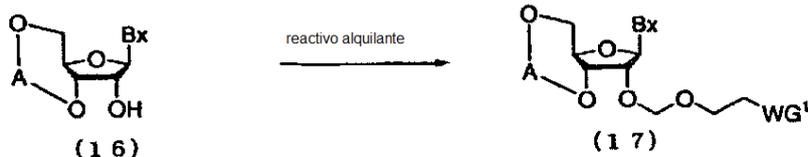
R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

10

WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno y WG² representa un grupo de extracción de electrones,

Etapa a2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo, permitiendo que un reactivo alquilante actúe en un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (16),

15

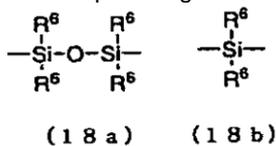


20

en donde:

B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

A representa un sustituyente de silicio representado por la siguiente fórmula general (18a) o (18b),



en donde:

25

R⁶ representa alquilo,

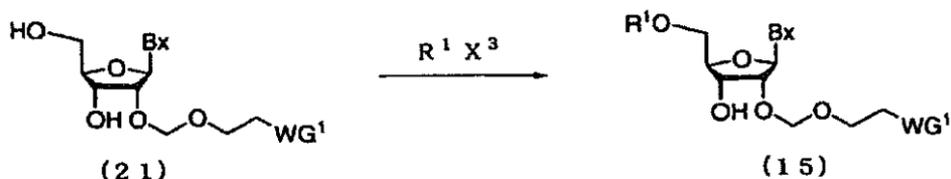
Etapa b2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (21) eliminando los grupos protectores del grupo hidroxilo 3' y 5' del compuesto de ácido ribonucleico (17) producido mediante la etapa a2,



en donde:

A, B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente,

5 Etapa c2: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico (15) introduciendo un grupo protector (R¹), que puede eliminarse en condiciones ácidas, en el grupo hidroxilo 5' del compuesto de ácido ribonucleico (21) producido mediante la etapa b2,



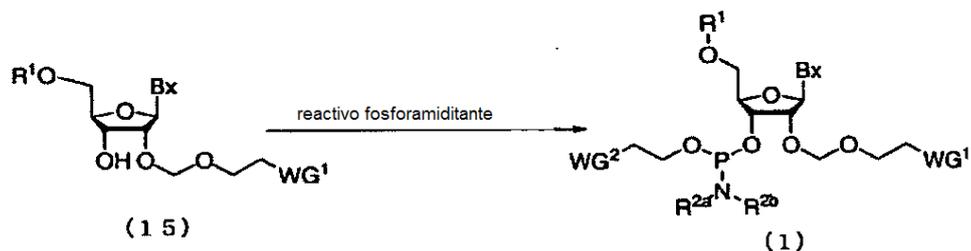
en donde:

10 B_x R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

X³ representa halógeno,

Etapa d2: proceso para producir un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general (1) fosoramiditando el grupo 3' hidroxilo permitiendo que un reactivo fosoramiditante y si es necesario un agente activador actúe en un derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa v2,

15



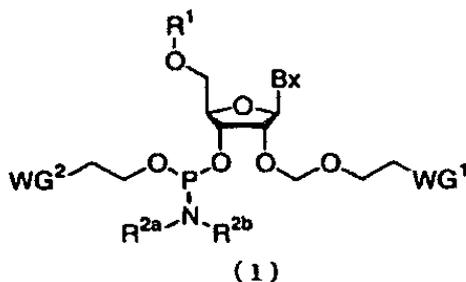
en donde:

B_x R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente;

20 R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

WG² representa un grupo de extracción de electrones.

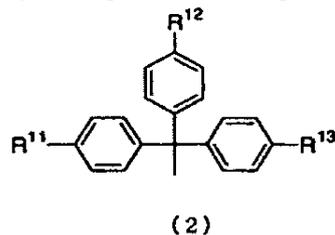
25 9. Un procedimiento para producir un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general (1), comprendiendo el procedimiento las etapas a3 a e3,



en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y

R¹ representa un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



5 en donde:

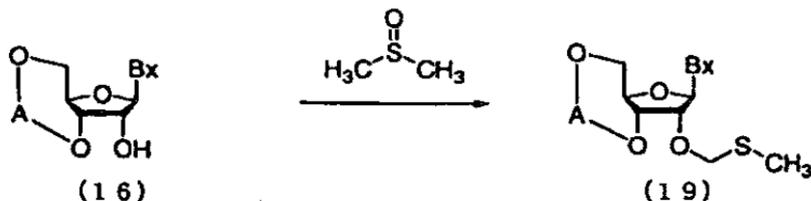
R¹¹, R¹² y R¹³ son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

10 WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno y WG² representa un grupo de extracción de electrones,

Etapa a3: proceso que se realiza de forma separada de las etapas a a c para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (19) permitiendo que dimetilsulfóxido, ácido acético y anhídrido acético actúen en el compuesto de ácido ribonucleico (16),

15

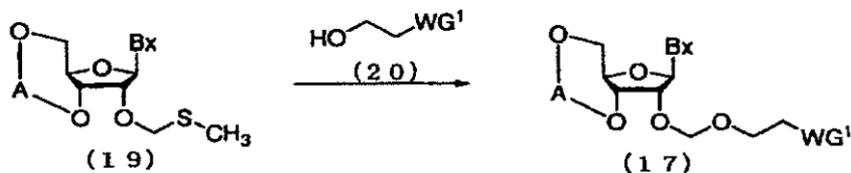


en donde:

A y B_x son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa b3: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17), en donde un grupo protector de tipo de éter que puede eliminarse en condiciones neutras se introduce en el grupo 2'-hidroxilo, permitiendo que un compuesto de alcohol representado por la siguiente fórmula general (20), un ácido y un agente de halogenación para un átomo de azufre actúen en un derivado de nucleósido (19) producido en la etapa a3,

20



25 en donde:

A, B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa c3: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (21) eliminando los grupos protectores del grupo 3' y 5' hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (17) producido en la etapa b3,

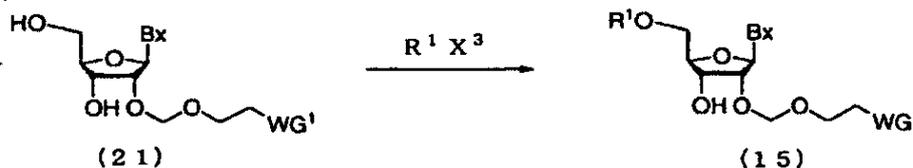
30



en donde:

A, B_x y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente,

Etapa d3: proceso para producir un compuesto de ácido ribonucleico (15) introduciendo un grupo protector (R¹) que puede eliminarse en condiciones ácidas, en el grupo 5' hidroxilo del compuesto de ácido ribonucleico (21) producido mediante la etapa c3,



5

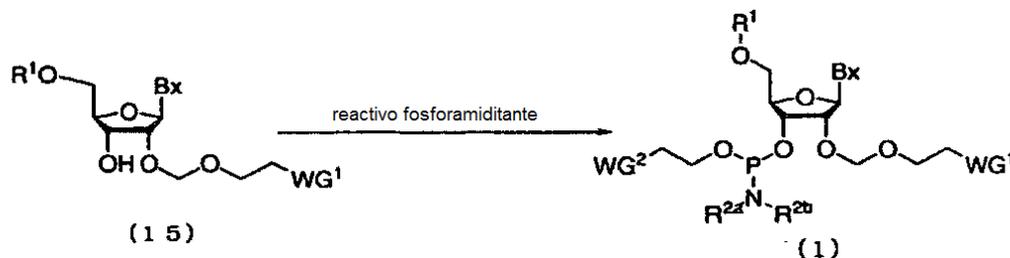
en donde:

B_x, R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente; y

X³ representa halógeno,

10

Etapa e3: proceso para producir un compuesto de fosoramidita representado por la siguiente fórmula general (1) fosoramiditando el grupo 3' hidroxilo permitiendo que un reactivo fosoramiditante y si es necesario un agente activador actúe en un derivado de nucleósido (15) producido mediante la etapa d3,



15

en donde:

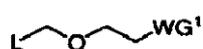
B_x, R¹ y WG¹ son los mismos que se definieron anteriormente;

R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente; y

20

WG² representa un grupo de extracción de electrones.

10. El procedimiento para producir un compuesto de fosoramidita de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 9, en donde el reactivo alquilante es un compuesto de éter representado por la siguiente fórmula general (13),



25

(13)

en donde:

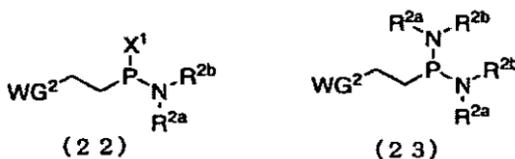
L representa halógeno, un grupo arilíto, un grupo alquil sulfóxido o un grupo alquiltio; y

WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno.

30

11. El procedimiento para producir un compuesto de fosoramidita de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde WG¹ es ciano.

12. El procedimiento para producir un compuesto de fosoramidita de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el reactivo de fosoramidita es un compuesto representado por la siguiente fórmula general (22) o (23),



en donde:

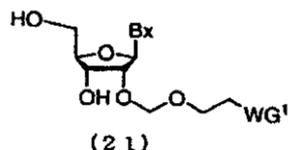
5 R^{2a} y R^{2b} son iguales o diferentes y cada uno representa alquilo o R^{2a} y R^{2b} tomados junto con el átomo de nitrógeno adyacente pueden formar un grupo cíclico amino saturado de 5 a 6 miembros, teniendo el grupo cíclico amino opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre como un miembro que compone el anillo además del átomo de nitrógeno adyacente;

WG^2 representa un grupo de extracción de electrones; y

X^1 representa halógeno.

10 13. El procedimiento para producir un compuesto de fosoramidita de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde el agente activador es 1H-tetrazol, 5-etiltiotetrazol, 5-bencilmercapto-1H-tetrazol, 4,5-dicloroimidazol, 4-5-dicianoimidazol, benzotriazol triflato, imidazol triflato, pridinio triflato, N-N-diisopropieletilamina o 2,4,6-colidina/N-metilimidazol.

14. Un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (21),

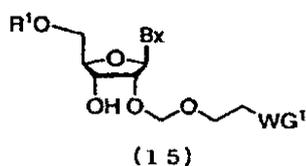


15 en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector; y WG^1 representa ciano, nitro, alquil C_1 - C_5 sulfonilo o halógeno.

15. El compuesto de ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 14, en donde WG^1 es ciano.

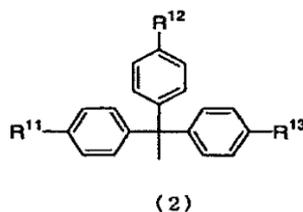
16. Un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (15),



20 en donde:

B_x representa una nucleobase que puede tener un grupo protector;

R^1 es un sustituyente representado por la siguiente fórmula general (2),



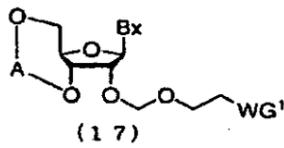
25 en donde:

R^{11} , R^{12} y R^{13} son iguales o diferentes y cada uno representa hidrógeno o alcoxi;

y WG^1 representa ciano, nitro, alquil C_1 - C_5 sulfonilo o halógeno.

17. El compuesto de ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 16, en donde WG^1 es ciano.

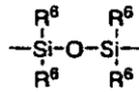
18. Un compuesto de ácido ribonucleico representado por la siguiente fórmula general (17),



en donde:

B_x representa un nucleobase que puede tener un grupo protector;

A representa un sustituyente de silicio representado por la siguiente fórmula general (18a) o (18b),



(1 8 a)



(1 8 b)

5

en donde:

R⁶ representa alquilo;

y

WG¹ representa ciano, nitro, alquil C₁-C₅ sulfonilo o halógeno.

10

19. El compuesto de ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 18, en donde WG¹ es ciano.

[Fig.1]

