(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 388 590**

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **08769651 .4**
(96) Fecha de presentación: **22.05.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2170917**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

(54) Título: **Análogos de ácidos nucleicos bicíclicos con puente aminometileno N-sustituido.**

(30) Prioridad:
30.05.2007 US 940835 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2012

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

(72) Inventor/es:
PRAKASH, Thazha, P.;
SWAYZE, Eric, E. y
BHAT, Balkrishen

(74) Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 388 590 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análogos de ácidos nucleicos bicíclicos con puente aminometileno N-sustituido.

Listado de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en un formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un fichero titulado CHEM0033WOSEQ.txt, creado el 22 de mayo del 2008 que tiene un tamaño de 8 Kb. En el presente documento se incorpora la información del listado de secuencias en el formato electrónico.

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad con respecto a la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/940.835, presentada el 30 de mayo del 2007 y titulada, “Análogos de Ácidos Nucleicos Bicíclicos N-Alcoxiamino”.

Campo de la invención

En el presente documento se proporcionan nucleósidos bicíclicos que comprenden un grupo amino sustituido en el puente, compuestos oligoméricos que tienen al menos uno de estos nucleósidos bicíclicos y procedimientos para el uso de los compuestos oligoméricos. En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos se hibridan con una parte de un ARN diana dando como resultado la pérdida de función normal del ARN diana.

Antecedentes de la invención

La tecnología antisentido es un medio eficaz para reducir la expresión de uno o más productos génicos específicos y puede, por tanto, demostrar que es excepcionalmente útil en diversas aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. Los nucleósidos modificados químicamente se incorporan rutinariamente en compuestos oligoméricos antisentido para potenciar una o más propiedades, tales como, resistencia a nucleasas o afinidad de unión. Un grupo de modificaciones químicas de este tipo incluye nucleósidos bicíclicos en los que la parte furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos en el anillo de furanosa formando así un sistema anular bicíclico. Dichos nucleósidos bicíclicos tienen diversos nombres incluyendo, respectivamente, los BNA (por las siglas Bicyclic Nucleic Acids) y los LNA (por las siglas Locked Nucleic Acids) por ácidos nucleicos bicíclicos o ácidos nucleicos bloqueados.

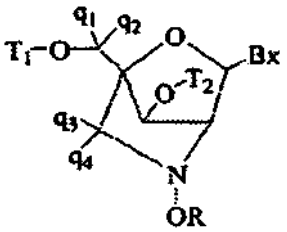
En la literatura de patentes, así como en la bibliografía científica, se han preparado y descrito diversos BNA, véanse, por ejemplo: Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y col., Tetruhedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000), 97, 5633-5638; Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Wengel y col., Solicitud Internacional PCT WO 98-DK393 19980914, Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039. Los ejemplos de patentes de Estados Unidos expedidas y de solicitudes publicadas incluyen, por ejemplo: las Patentes de Estados Unidos 7.053.207, 6.770.748, 6.268.490 y 6.794.499 y las solicitudes publicadas de Estados Unidos 20040219565, 20040014959, 20030207841, 20040192918, 20030224377, 20040143114 y 20030082807.

Una publicación reciente desvela hepatotoxicidad significativa en animales tratados con oligonucleótidos antisentido que contienen ácidos nucleicos bloqueados (véase, por ejemplo, Swayze y col., Nucl. Acids Res., 2007,35(2), 687-700). Sørensen y col. (Chem Comm, 2003, 2130 - 2131) desvelan diversos derivados de 2’amino LNA que incluyen puentes 2’ - 4’ funcionalizados con grupos hidrocarbilo.

Por consiguiente, desde hace tiempo sigue existiendo una necesidad de agentes que regulen específicamente la expresión de genes mediante mecanismos antisentido. En el presente documento se desvelan análogos de ácidos nucleicos bicíclicos con puente aminometileno N-sustituido y compuestos oligoméricos antisentido, preparados a partir de los mismos, que son útiles para modular las rutas de expresión de genes, incluyendo los que dependen de mecanismos de acción tales como enzimas de RNasaH, ARNi y ARNbc, así como otros mecanismos antisentido basados en la degradación diana u ocupación diana. Un experto en la materia, que ya posea la presente descripción, podrá, sin excesiva experimentación, identificar, preparar y aprovechar los compuestos antisentido para estos usos.

Breve sumario de la invención

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



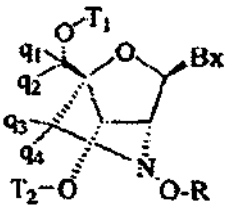
I

en la que:

Bx es un resto de base heterocíclica;
uno de T_1 y T_2 es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro de T_1 y T_2 es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo de fósforo reactivo;
R es alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;
q_1 y q_2 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
q_3 y q_4 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, OJ_1, SJ_1, NJ_1J_2, N_3, $COOJ_1$, CN, O-C(=O)NJ_1J_2, N(H)C(=NH)NJ_1J_2 o N(H)C(=X)N(H)J_2 en el que X es O ó S; y
cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, aminoalquilo C_1-C_6 o un grupo protector en el que el grupo fosforoso reactivo es un fosforamidito, H-fosfonato, triéster de fosfato o fósforo que contiene un auxiliar quiral.

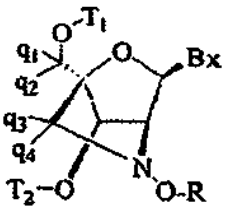
En ciertas realizaciones, R es alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido. En ciertas realizaciones, R es alquilo C_1-C_3. En ciertas realizaciones, R es metilo. En ciertas realizaciones, R es alquilo C_1-C_3 sustituido. En ciertas realizaciones, R es $-(CH_2)_nO(CH_2)_mCH_3$, en el que n es de 1 a 3 y m es 0 ó de 1 a 3. En ciertas realizaciones, R es $-(CH_2)_2OCH_3$.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula I que tienen la configuración que se muestra en la Fórmula Ia:



Ia.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula I que tienen la configuración que se muestra en la Fórmula Ib:



Ib.

En ciertas realizaciones, q_1 y q_2 son cada uno, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido. En ciertas realizaciones, uno de q_1 y q_2 es H. En ciertas realizaciones, q_1 y q_2 son cada uno H.

En ciertas realizaciones, q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido. En ciertas realizaciones, uno de q_3 y q_4 es H. En ciertas realizaciones, q_3 y q_4 son cada uno H.

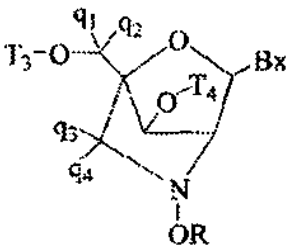
En ciertas realizaciones, uno de q_1, q_2, q_3 y q_4 es CH_3 y los otros tres de q_1, q_2, q_3 y q_4 son independientemente H. En ciertas realizaciones, uno de q_1 y q_2 es CH_3 y uno de q_3 y q_4 es CH_3 y los otros dos de q_1, q_2, q_3 y q_4 son independientemente H.

En ciertas realizaciones, T_1 y T_2 son cada uno, independientemente, un grupo protector de hidroxilo. En ciertas realizaciones, cada uno de dichos grupos protectores de hidroxilo es independientemente, acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropiranilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)-etilo, 2-trimetilsililetilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, benzoílo, p-fenilbenzoílo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, trifenilmetilo (tritilo), 4-metoxitritilo, 4,4'-dimetoxitritilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, triisopropilsililo, benzoilformiato, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloilo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, triflato, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo o pixilo sustituido. En ciertas realizaciones, T_1 es acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo o dimetoxitritilo. En ciertas realizaciones, T_1 es 4,4'-dimetoxitritilo. En cierta realización, T_2 es un grupo de fósforo reactivo. En ciertas realizaciones, T_2 es diisopropilcianoetoxi fosforamidito o H-fosfonato. En ciertas realizaciones, T_1 es 4,4'-trimetoxitritilo y T_2 es diisopropilcianoetoxi fosforamidito.

En ciertas realizaciones, Bx es uracilo, timina, citosina, adenina o guanina. En ciertas realizaciones, Bx es una pirimidina, pirimidina sustituida, purina o purina sustituida. En ciertas realizaciones, Bx es uracilo, 5-metiluracilo, 5-metilcitosina, 5-tiazolo-uracilo, 5-tiazolo-citosina o 2,6-diaminopurina. En ciertas realizaciones, Bx es uracilo, 5-metiluracilo, 5-tiazolo-uracilo, 2-tio-uracilo, 5-propinil-uracilo, timina, 2'-tio-timina, citosina, 5-metilcitosina, 5-tiazolo-citosina, 5-propinil-citosina, adenina, guanina, 2,6-diaminopurina, 1H-pirimido[5,4-b][1,4benzoxazin-2(3,H)-ona), 1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona, 2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona o H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona.

En ciertas realizaciones, cada J_1 y J_2 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_3.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos Oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II:



II.

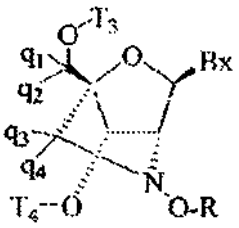
en la que para cada uno de dichos al menos un nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II:

Bx es un resto de base heterocíclica;
T_3 y T_4 son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleósido que une el nucleósido bicíclico a los compuestos Oligoméricos o uno de T_3 y T_4 es un grupo de unión internucleósido que une el nucleósido bicíclico al compuesto oligomérico y el otro de T_3 y T_4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo 5' o 3'-terminal;
R es alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;
q_1 y q_2 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
q_3 y q_4 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, OJ_1, SJ_1, NJ_1J_2, N_3, $COOJ_1$, CN, O-C(=O)NJ_1J_2, N(H)C(=NH)NJ_1J_2 o N(H)C(=X)N(H)J_2
en el que X es O ó S; y
cada J_1 y J_2 es, independientemente H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, aminoalquilo C_1-C_6; o un grupo protector.

En ciertas realizaciones, R es alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido. En ciertas realizaciones, R es alquilo C_1-C_3. En ciertas realizaciones, R es metilo. En ciertas realizaciones, R es alquilo C_1-C_3 sustituido. En cierta realización, R es -$(CH_2)_nO(CH_2)_mCH_3$, en la que n es de 1 a 3 y m es 0 ó de 1 a 3. En ciertas realizaciones, R es -$(CH_2)_2OCH_3$.

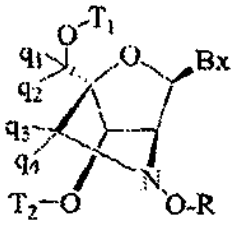
En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico de

Fórmula II en los que cada nucleósido adicional de Fórmula II tiene la configuración que se muestra en la Fórmula IIa:



IIa.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico de Fórmula II en los que cada nucleósido adicional de Fórmula II tiene la configuración que se muestra en la Fórmula IIb:



IIb.

En ciertas realizaciones, cada q_1 y q_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6 sustituido o alquinilo C_2-C_6 sustituido. En ciertas realizaciones, q_1 o cada q_2 es H. En ciertas realizaciones, cada q_1 y cada q_2 es H.

En ciertas realizaciones, cada q_3 y q_4 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6 sustituido o alquinilo C_2-C_5 sustituido. En ciertas realizaciones, cada q_3 o cada q_4 es H. En ciertas realizaciones, cada q_3 y cada q_4 es H.

En ciertas realizaciones, uno de cada q_1, q_2, q_3 o q_4 es CH_3 y los otros tres de cada q_1, q_2, q_3 o q_4 son cada uno H. En ciertas realizaciones, uno de cada q_1 o q_2 es CH_3 y uno de cada q_3 o q_4 es CH_3 y los otros dos de cada q_1, q_2, q_3 o q_4 son cada uno H.

En ciertas realizaciones, al menos uno de T_3 y T_4 es un grupo terminal 5' o 3'. En ciertas realizaciones, al menos uno de T_3 y T_4 es un grupo conjugado.

En ciertas realizaciones, cada grupo de unión internucleósido es, independientemente, un fosfodiéster o un fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada grupo de unión internucleósido es un fosfodiéster. En ciertas realizaciones, cada grupo de unión internucleósido es un fosforotioato.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula II. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula II en los que al menos una región se localiza bien en 3'-terminal o bien en 5'-terminal de los compuestos oligoméricos. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos Oligoméricos que comprenden al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula II en los que al menos una región se localiza bien en 3'-terminal o bien en 5'-terminal del compuesto oligomérico y al menos un nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II se localiza en la otra posición 3'-terminal o 5'-terminal del compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula II en los que al menos una región se localiza internamente en dicho compuesto oligomérico.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden cada uno al menos dos regiones de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula II en los que las dos regiones están separadas por al menos un nucleósido o un nucleósido modificado. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos con separación, cada uno de los cuales comprende al menos dos regiones externas de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula II, en los que una de las regiones externas se localiza en 5'-terminal, la otra de las regiones externas se localiza en 3'-terminal con una región interna que separa las dos regiones externas, región interna que comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas. En ciertas realizaciones la región interna comprende de 6 a

aproximadamente 14 subunidades monoméricas seleccionadas independientemente entre nucleósidos y nucleósidos modificados.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden cada uno al menos dos regiones de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula II en los que las dos regiones están separadas por una región interna en la que básicamente cada subunidad monomérica en la región interna es un β-D-2'-desoxirribonucleósido. En ciertas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 β-D-2'-desoxirribonucleósidos. En ciertas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 β-D-2'-desoxirribonucleósidos. En ciertas realizaciones, la región interna comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 β-D-2'-desoxirribonucleósidos.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos con separación en los que las regiones externas comprenden independientemente de 2 a aproximadamente 3 nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula II y la región interna comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas, en los que básicamente cada subunidad monomérica de la región interna es un β-D-2'-desoxirribonucleósido. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos con separación en los que las regiones externas comprenden independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula II y la región interna comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas, en los que básicamente cada subunidad monomérica en la región interna es un β-D-2'-desoxirribonucleósido. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos con separación en los que las regiones externas comprenden independientemente 2 nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula II y la región interna comprende 10 β-D-2'-desoxirribonucleósidos.

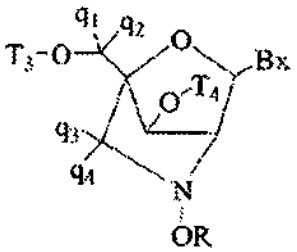
En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos dos regiones de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula IIa que comprenden un compuesto oligomérico con separación en los que una de dichas regiones de nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula II se localiza en 5'-terminal y la otra de dichas regiones se localiza externamente en 3'-terminal y en los que las dos regiones externas están separadas por una región interna que comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas, en los que básicamente cada subunidad monomérica en la región interna es un β-D-2'-desoxirribonucleósido.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden al menos dos regiones de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen Fórmula IIb que comprenden un compuesto oligomérico con separación en los que una de dichas regiones de nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula II se localiza en 5'-terminal y la otra de dichas regiones se localiza externamente en 3'-terminal y en los que las dos regiones externas están separadas por una región interna que comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas, en los que básicamente cada subunidad monomérica en la región interna es un β-D-2'-desoxirribonucleósido.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 12 a aproximadamente 16 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 monómeros de longitud.

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

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



II

en la que para cada uno de dichos al menos un nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II:

Bx es un resto de base heterocíclica;
T_3 y T_4 son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleósido que une el nucleósido bicíclico al compuesto oligomérico o uno de T_3 y T_4 es un grupo de unión internucleósido que une el nucleósido bicíclico al compuesto oligomérico y el otro de T_3 y T_4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo 5' o 3'-terminal;
R es alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;
q_1 y q_2 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
q_3 y q_4 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_5 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, OJ_1, SJ_1, NJ_1J_2, N_3, $COOJ_1$, CN, $O\text{-}C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=NH)NJ_1J_2$ o $N(H)C(=X)N(H)J_2$ en el que X es O ó S; y
cada J_1 y J_2 es, independientemente H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, aminoalquilo C_1-C_6 o un grupo protector; y
en los que dicho compuesto oligomérico comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 subunidades monoméricas y es complementario al ARN diana.

En determinadas realizaciones, la célula está en un animal. En determinadas realizaciones, la célula está en un ser humano. En determinadas realizaciones, el ARN diana se selecciona de ARNm, pre-ARNm y micro ARN. En determinadas realizaciones, el ARN diana es ARNm. En determinadas realizaciones, el ARN diana es ARNm humano.

En determinadas realizaciones, el ARN diana se escinde inhibiendo así su función. En determinadas realizaciones, los procedimientos comprenden evaluar la actividad antisentido de dicho compuesto oligomérico en dicha célula. En determinadas realizaciones, la etapa de evaluación comprende detectar los niveles del ARN diana. En determinadas realizaciones, la etapa de evaluación comprende detectar los niveles de una proteína. En determinadas realizaciones, la etapa de evaluación comprende la detección de uno o más efectos fenotípicos.

En determinadas realizaciones, los procedimientos para inhibir la expresión de genes comprenden poner en contacto una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico de la presente invención.

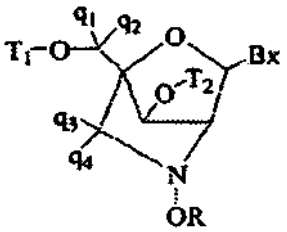
Los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tienen la fórmula II muestran buena actividad tanto *in vitro* como *in vivo* sin presentar hepatotoxicidad significativa. La actividad de los compuestos oligoméricos que tienen nucleósidos con fórmula II fue aproximadamente del 80% con respecto al compuesto oligomérico similar que tenía los BNA 4'-CH_2-O-2'. Los compuestos oligoméricos que tienen nucleósidos con Fórmula II no presentaron hepatotoxicidad significativa mientras que el compuesto oligomérico que tiene los BNA 4'-CH_2-O-2' presentaron hepatotoxicidad significativa a dosis más altas. Los compuestos oligoméricos que tienen nucleósidos con Fórmula II también muestran un aumento en la resistencia a nucleasas de aproximadamente 37 y 55 veces con respecto a los compuestos oligoméricos que tienen los BNA 4'-CH_2-O-2' o nucleósidos modificados con 2'-MOE, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan nucleósidos bicíclicos que comprenden grupos amino sustituidos en el puente, compuestos oligoméricos que tienen al menos uno de estos nucleósidos bicíclicos y procedimientos para el uso de los compuestos oligoméricos. También se proporcionan procedimientos para preparar los nucleósidos bicíclicos de la presente invención. En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos se diseñan para hibridarse con una parte de un ARN diana. En determinadas realizaciones, los

compuestos oligoméricos pueden usarse en el diseño de aptámeros en los que el compuesto oligomérico puede unirse a proteínas aberrantes en un entorno *in vivo*.

En ciertas realizaciones, cada uno de los nucleósidos bicíclicos tiene Fórmula I:



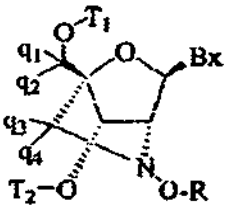
I

en la que:

Bx es un resto de base heterocíclica;
uno de T_1 y T_2 es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro de T_1 y T_2 es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo de fósforo reactivo;
R es alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;
q_1 y q_2 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_4 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_4 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
q_3 y q_4 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, OJ_1, SJ_1, NJ_1J_2, N_3, $COOJ_1$, CN, O-C(=O)NJ_1J_2, N(H)C(=NH)NJ_1J_2 o N(H)C(=X)N(H)J_2 en el que X es O ó S; y
cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, aminoalquilo C_1-C_6 o un grupo protector en el que el grupo fosforoso reactivo es un fosforamidito, H-fosfonato, triéster de fosfato o fósforo que contiene un auxiliar quiral.

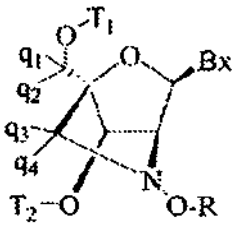
En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos se preparan en forma de fosforamiditos de nucleósidos bicíclicos protegidos para la incorporación en compuestos oligoméricos en los que T_1 es un grupo protector de hidroxilo tal como un grupo 4,4'-dimetoxitritilo y T_2 es un fosforamidito tal como -P(O-$(CH_2)_2$CN)[N$(CH(CH_3)_2)_2$]. En ciertas realizaciones, cada q es H y R es alquilo C_1-C_3 preferentemente metilo o alquilo C_1-C_3 sustituido preferentemente -$(CH_2)_2OCH_3$.

En ciertas realizaciones, cada uno de los nucleósidos bicíclicos tiene la configuración que se muestra en la Fórmula Ia:



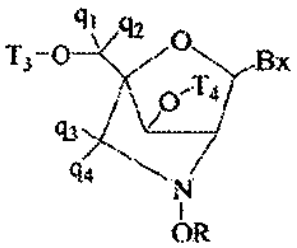
Ia.

En ciertas realizaciones, cada uno de los nucleósidos bicíclicos tiene la configuración que se muestra en la Fórmula Ib:



Ib.

Los monómeros de nucleósido bicíclico son especialmente útiles para su incorporación en compuestos oligoméricos. Se ha mostrado que tal incorporación potencia las propiedades deseadas del compuesto oligomérico resultante. Como se muestra en alguno de los ejemplos incluidos en el presente documento algunas de las propiedades que se han potenciado incluyen la resistencia a nucleasas, el perfil de toxicidad y la ventana terapéutica. Tales compuestos oligoméricos comprenden cada uno al menos un nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II:

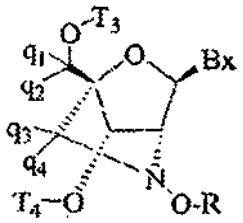


II

en la que para cada uno de dichos al menos un nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II:

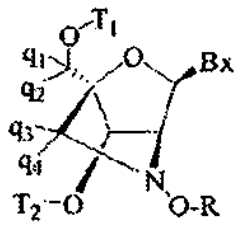
Bx es un resto de base heterocíclica;
T_3 y T_4 son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleósido que une el nucleósido bicíclico al compuesto oligomérico o uno de T_3 y T_4 es un grupo de unión internucleósido que une el nucleósido bicíclico al compuesto oligomérico y el otro de T_3 y T_4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo 5' o 3'-terminal;
R es alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;
q_1 y q_2 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
q_3 y q_4 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, OJ_1, SJ_1, NJ_1J_2, N_3, $COOJ_1$, CN, O-C(=O)NJ_1J_2, N(H)C(=NH)NJ_1J_2 o N(H)C(=X)N(H)J_2 en el que X es O ó S; y
cada J_1 y J_2 es, independientemente H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, aminoalquilo C_1-C_6 o un grupo protector.

En ciertas realizaciones, se preparan compuestos oligoméricos en los que cada uno de los nucleósidos bicíclicos tiene Fórmula IIa:



IIa.

En ciertas realizaciones, se preparan compuestos oligoméricos en los que cada uno de los nucleósidos bicíclicos tiene Fórmula IIb:



IIb.

También se proporcionan procedimientos de uso de los compuestos oligoméricos de la presente invención. En determinadas realizaciones, se proporcionan procedimientos en los que una célula se pone en contacto con un

compuesto oligomérico de la invención que es complementario a un ARN diana. La célula puede estar en un animal preferentemente en un ser humano. El ARN diana se selecciona de cualquier ácido nucleico de ARN que diera como resultado algún beneficio pero preferentemente se selecciona de ARNm, pre-ARNm y micro-ARN. En determinadas realizaciones, el ARN diana se escinde como resultado de interacción con un compuesto oligomérico inhibiendo por lo tanto su función. La eficacia de los procedimientos puede evaluarse buscando una diversidad de criterios o criterios de valoración tales como evaluación de la actividad antisentido detectando los niveles de un ARN diana, detectando el nivel de una proteína o detectando uno o más efectos fenotípicos.

Los compuestos oligoméricos que comprenden nucleósidos bicíclicos de Fórmula II se sometieron a ensayo para determinar la estabilidad a nucleasas (Ejemplo 35), para la actividad *in vitro* (ejemplo 32) y para la actividad *in vivo* (Ejemplos 33 y 34). Los compuestos oligoméricos que comprenden al menos un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula II mostraron buena actividad tanto *in vitro* como *in vivo*. La actividad observada fue aproximadamente del 80% con respecto a un compuesto oligomérico similar que tenía los BNA unidos por puentes 4'-CH_2-O-2'. Los compuestos oligoméricos que tienen nucleósidos con Fórmula II no mostraron hepatotoxicidad significativa mientras que los compuestos oligoméricos que tenían los BNA unidos por puentes 4'-CH_2-O-2' mostraron hepatotoxicidad significativa a dosis más elevadas. Los compuestos oligoméricos que tenían nucleósidos con Fórmula II también mostraron aproximadamente un aumento 37 y 55 veces en cuanto s resistencia a nucleasas con respecto a los compuestos oligoméricos que tenían los BNA unidos por puentes 4'-CH_2-O-2' o nucleósidos 2'-MOE modificados, respectivamente. Basándose en las similitudes entre los compuestos oligoméricos que tienen los nucleósidos bicíclicos de Fórmula II o los BNA unidos por puentes 4'-CH_2-O-2' la resistencia a nucleasa aumentada y la ausencia de hepatotoxicidad es inesperada.

Los nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula II (N-alcoxiamino o N-alcoxiamino sustituido) son útiles para modificar de otra manera compuestos oligoméricos no modificados en una o más posiciones. Dichos compuestos oligoméricos modificados pueden describirse por tener un motivo particular. Los motivos incluyen, pero sin limitación, un motivo con separación, un motivo hemimérico, un motivo en bloque, un motivo completamente modificado, un motivo posicionalmente modificado y un motivo alternante. Junto con estos motivos puede usarse una amplia diversidad de uniones internucleósido, incluyendo pero sin limitación, uniones fosfodiéster y fósforotioato internucleósido usadas uniformemente o en combinaciones. El número y posicionamiento de los nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II y el uso de diversas estrategias de unión internucleósido puede optimizarse fácilmente para preparar un compuesto oligomérico que proporcione la mejor actividad para una diana particular.

Las patentes de Estados Unidos representativas que instruyen acerca de la preparación de motivos representativos incluyen, pero sin limitación, 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922, algunas de las cuales son del mismo solicitante de la presente solicitud. Los motivos también se desvelan en las Solicitudes Internacionales PCT/US2005/019219, presentada el 2 de junio del 2005, y publicada como WO 2005/121371 el 22 de diciembre del 2005 y PCT/US2005/019220, presentada el 2 de junio del 2005 y publicada como WO 2005/121372 el 22 de diciembre, del 2005.

En determinadas realizaciones, se proporcionan compuesto oligoméricos con huecos que tienen uno o más nucleósidos bicíclicos de la fórmula II anterior en las posiciones 3' y 5' terminales flanqueando una región de nucleósidos interna. En determinadas realizaciones los nucleósidos internos son β-D-desoxirribonucleósidos. En una realización adicional estos son β-D-desoxirribonucleósidos en combinación con uno o más nucleósidos distintos modificados con azúcar.

Los términos "sustituyente" y "grupo sustituyente", como se usan en el presente documento, significan que incluyen grupos que se añaden típicamente a otros grupos o compuestos principales para potenciar las propiedades deseadas o para proporcionar los efectos deseados. Los grupos sustituyentes pueden estar protegidos o desprotegidos y se pueden añadir a un sitio disponible o a muchos sitios disponibles en el compuesto principal. Los grupos sustituyentes también pueden estar sustituidos de forma adicional con otros grupos sustituyentes y pueden estar directamente unidos al compuesto principal o a través de un grupo de unión tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo. Tales grupos incluyen sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo (-C(O)R_{aa}), carboxilo (-C(O)O-R_{aa}), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxi (-O-R_{aa}) sustituido, arilo, aralquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-$NR_{bb}R_{cc}$), imino (=NR_{bb}) sustituido, amido (-C(O)N-$R_{bb}R_{cc}$ o -N(R_{bb})C(O)R_{aa}), azido (-N_3), nitro (-NO_2), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)$NR_{bb}R_{cc}$ o ~N(R_{bb})C(O)OR_{aa}), ureido (~N(R_{bb})C(O)$NR_{bb}R_{cc}$), tioureido (-N(R_{bb})C(S)$NR_{bb}R_{cc}$), guanidinilo (-N(R_{bb})C(=NR_{bb})$NR_{bb}R_{cc}$), amidinilo (-C(=NR_{bb})$NR_{bb}R_{cc}$ o ~N(R_{bb})C(NR_{bb})R_{aa}), tiol (-SR_{bb}), sulfinilo (-S(O)R_{bb}), sulfonilo (-$S(O)_2R_{bb}$), sulfonamidilo (-$S(O)_2NR_{bb}R_{cc}$ o -N(R_{bb})-$S(O)_2R_{bb}$) y grupos conjugados. En los que cada R_{aa}, R_{bb} y R_{cc} es, independientemente, H, un grupo funcional químico unido opcionalmente o un grupo sustituyente adicional con una lista preferente que incluye, sin limitación, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo. Los sustituyentes seleccionados dentro de los compuestos descritos en el presente documento están presentes en grado recursivo.

En este contexto, "sustituyente recursivo" significa que un sustituyente puede enumerar otro caso de sí mismo. A causa de la naturaleza recursiva de tales sustituyentes se pueden presentar, teóricamente, un gran número en cualquier reivindicación determinada. Un experto habitual en la materia de la química médica y la química orgánica

comprende que el número total de tales sustituyentes está limitado de forma razonable por las propiedades deseadas del compuesto previsto. Tales propiedades incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, propiedades físicas tales como peso molecular, solubilidad o log P, propiedades de aplicación, tales como la actividad frente a la diana prevista, y propiedades prácticas tales como la facilidad de síntesis.

Los sustituyentes recursivos son un aspecto previsto de la presente invención. Un experto habitual en la materia de la química médica y orgánica entiende la versatilidad de tales sustituyentes. Desde el punto de vista en el que los sustituyentes recursivos están presentes en una reivindicación de la presente invención, se determinará el número total como se ha establecido anteriormente.

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

El término "alicíclico" o "aliciclilo" se refiere a un sistema anular cíclico en el que el anillo es alifático. El sistema anular puede comprender uno o más anillos en el que al menos un anillo es alifático. Los grupos alicíclicos preferentes incluyen anillos que tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo. Los alicíclicos como se usan en el presente documento pueden incluir de forma opcional grupos sustituyentes adicionales.

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

El término "alquenilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alquenilo incluyen típicamente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferente de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo como se usan en el presente documento pueden incluir de forma opcional uno o más grupos sustituyentes adicionales.

El término "alcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno en el que el átomo de oxígeno se usa para unir el grupo alcoxi a la molécula principal. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, *n*-pentoxi, neopentoxi, *n*-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi como se usan en el presente documento pueden incluir de forma opcional grupos sustituyentes adicionales.

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, *n*-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Los grupos alquilo incluyen típicamente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono (alquilo C_1-C_{12}) siendo más preferente de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. El término "alquilo inferior", como se usa en el presente documento, incluye de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo como se usan en el presente documento pueden incluir de forma opcional uno o más grupos sustituyentes adicionales.

El término "alquinilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Ejemplos de grupos al alquinilo incluyen, pero no se limitan a, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, y similares. Los grupos alquinilo incluyen típicamente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferente de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquinilo como se usan en el presente documento pueden incluir de forma opcional uno o más grupos sustituyentes adicionales.

El término "aminoalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a radicales alquilo sustituidos con un amino. Este término significa que incluye grupos alquilo C_1-C_{12} que tienen un sustituyente amino en cualquier posición y en el que el grupo alquilo une al grupo aminoalquilo a la molécula principal. Las partes alquilo y/o amino del grupo aminoalquilo pueden estar sustituidas de forma adicional con grupos sustituyentes.

Los términos "aralquilo" y "aril alquilo", como se usan en el presente documento, se refieren a un radical formado entre un grupo alquilo y un grupo arilo en el que el grupo alquilo se usa para unir el grupo aralquilo a la molécula principal. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir de forma opcional grupos sustituyentes adicionales unidos al alquilo, al arilo o a ambos grupos que forman el grupo radical.

Los términos "arilo" y "aromático", como se usan en el presente documento, se refieren a radicales de un sistema anular carbocíclico, monocíclico o policíclico, que tienen uno o más anillos aromáticos. Ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares. Los sistemas anulares arilo preferentes tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir de forma opcional grupos sustituyentes adicionales.

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

Los términos "heteroarilo" y "heteroaromático", como se usan en el presente documento, se refieren a un radical que comprende un anillo aromático monocíclico o policíclico, un sistema anular o un sistema anular condensado en el que al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo también significa que incluye sistemas anulares condensados que incluyen sistemas en los que uno o más de los anillos condensados no contienen ningún heteroátomo. Los grupos heteroarilo incluyen típicamente un átomo en el anillo seleccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzoimidazolilo, benzoxazolilo, quinoxalinilo, y similares. Los radicales heteroarilo se pueden unir a una molécula principal directamente o a través de un resto de enlace tal como un grupo alifático o un heteroátomo. Los grupos heteroarilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir de forma opcional grupos sustituyentes adicionales.

El término "heteroarilalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo como se ha definido previamente que tiene un radical alquilo que puede unir el grupo heteroarilalquilo a la molécula principal. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, piridinilmetilo, pirimidiniletilo, naftiridinilpropilo y similares. Los grupos heteroarilalquilo, como se usan en el presente documento, pueden incluir de forma opcional grupos sustituyentes adicionales en una o en ambas partes heteroarilo o alquilo.

El término "radical heterocíclico", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de un sistema anular monocíclico o policíclico que incluyen al menos un heteroátomo y está insaturado, parcialmente saturado o completamente saturado, incluyendo de esta manera los grupos heteroarilo. Heterocíclico también significa que incluye sistemas anulares condensados en los que uno o más de los anillos condensados contiene al menos un heteroátomo y los otros anillos pueden contener uno o más heteroátomos u opcionalmente no contener ningún heteroátomo. Un grupo heterocíclico incluye típicamente al menos un átomo seleccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen, [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y similares. Los grupos heterocíclicos, como se usan en el presente documento, pueden incluir de forma opcional grupos sustituyentes adicionales.

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

El término "estructura mono o policíclica", como se usa en el presente documento, incluye todos los sistemas anulares que son sencillos o policíclicos que tienen anillos que están condensados o unidos y significa que están incluidos los sistemas anulares sencillos y mixtos seleccionados individualmente entre alifático, alicíclico, arilo, heteroarilo, aralquilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroaromático y heteroarilalquilo. Tales estructuras mono y policíclicas pueden contener anillos que son uniformes o que tienen grados variables de saturación que incluyen completamente saturado, parcialmente saturado o completamente insaturado. Cada anillo puede comprender átomos en el anillo seleccionados entre C, N, O y S para dar lugar a anillos heterocíclicos así como anillos que comprenden solamente átomos de C en el anillo que se pueden presentar en un motivo mixto tal como, por ejemplo, benzoimidazol en el que un anillo tiene solamente átomos de carbono en el anillo y el anillo condensado tiene dos átomos de nitrógeno. Las estructuras mono o policíclicas pueden estar sustituidas de forma adicional con grupos sustituyentes tales como, por ejemplo, ftalimida que tiene dos grupos =O unidos a uno de los anillos. En otro aspecto, las estructuras mono o policíclicas se pueden unir a la molécula principal directamente a través de un átomo en el anillo, a través de un grupo sustituyente o a través de un resto de unión bifuncional.

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

Las expresiones “ácido nucleico bicíclico”, “BNA”, “nucleósido bicíclico” o “nucleótido bicíclico” se refieren a un

nucleósido o nucleótido en el que la parte furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos de carbono en el anillo de furanosa, formando así un sistema anular bicíclico.

El término “oligómero con hueco” (gapmer) o la expresión “compuesto oligomérico con hueco” se refiere a un compuesto oligomérico quimérico que comprende una región central (un “hueco”) y una región a cada lado de la región central (las “alas”), en el que el hueco comprende al menos una modificación que es diferente de la de cada ala. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de nucleobase, enlace monomérico, y modificaciones de azúcar así como la ausencia de modificación (no modificado). Por tanto, en determinadas realizaciones, los enlaces nucleotídicos en cada una de las alas son diferentes a los enlaces nucleotídicos en el hueco. En determinadas realizaciones, cada ala comprende nucleótidos con modificaciones de alta afinidad y el hueco comprende nucleótidos que no comprenden esta modificación. En determinadas realizaciones, los nucleótidos en el hueco y los nucleótidos en las alas comprenden modificaciones de alta afinidad, pero las modificaciones de alta afinidad en el hueco son diferentes de las modificaciones de alta afinidad en las alas. En determinadas realizaciones, las modificaciones en las alas son las mismas entre sí. En determinadas realizaciones, las modificaciones en las alas son diferentes entre sí. En determinadas realizaciones, los nucleósidos en el hueco son nucleósidos no modificados y los nucleósidos en las alas están modificados. En determinadas realizaciones, las modificaciones son nucleósidos bicíclicos N-alcoxiamino.

El término “motivo” se refiere al patrón de nucleótidos no modificados y modificados en un compuesto antisentido.

La expresión “compuesto oligomérico quimérico” u “oligonucleótido quimérico” se refiere a un compuesto oligomérico o a un oligonucleótido que tiene al menos un azúcar, una nucleobase o una unión internucleósido que está modificada con respecto a los nucleósidos unidos de manera natural. Los restantes azúcares, nucleobases y uniones internucleósido pueden modificarse o no independientemente, en el que cada nucleósido y unión puede ser el mismo o diferente.

Las expresiones “compuesto estable” y “estructura estable” quieren decir que indican un compuesto que es suficientemente fuerte para sobrevivir al aislamiento frente a un grado de pureza útil de una mezcla de reacción y formulación en un agente eficaz terapéutico. En el presente documento solo se contemplan compuestos estables.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos se modifican por unión covalente de uno o más grupos 5’ o 3’ terminales. La expresión “grupo terminal” como se usa en el presente documento quiere decir que incluye grupos útiles conocidos por el experto en la materia que puede colocarse en uno o en ambos extremos 3’ y 5’ de un compuesto oligomérico para diversos fines tales como permitir el rastreo del compuesto oligomérico (una marca fluorescente u otro grupo indicador), mejorando la farmacocinética o la farmacodinámica del compuesto oligomérico (un grupo para potenciar la captación y la administración) o potenciar una o más de otras propiedades deseables del compuesto oligomérico (grupo para mejorar la estabilidad a nucleasa o la afinidad de unión). En determinadas realizaciones, los grupos 3’ y 5’ terminales incluyen, sin limitación, uno o más nucleósidos modificados o no modificados, grupos conjugados, grupos de terminación, restos fosfato y grupos protectores.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos se modifican por unión covalente de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico unido incluyendo, pero sin limitación, farmacodinámica, farmacocinética, unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y eliminación. Los grupos conjugados se usan rutinariamente en la técnica química y están directamente unidos, o mediante un resto de unión opcional o un grupo de unión, a un precursor tal como un compuesto oligomérico. Una lista preferida de grupos conjugados incluye, sin limitación, intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolesteroles, restos de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenacina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y colorantes.

Los grupos de ligamiento y restos de ligamiento bifuncional, tales como los conocidos en la técnica, son útiles en el presente documento para la unión de grupos funcionales químicos, grupos conjugados, grupos indicadores y otros grupos a sitios selectivos en un precursor, tal como, por ejemplo, un compuesto oligomérico. En general un resto de unión bifuncional comprende un resto hidrocarbilo que tiene dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona para unirse a una molécula o compuesto primario de interés y el otro se selecciona para unirse esencialmente a cualquier grupo seleccionado tal como un grupo funcional químico o un grupo conjugado. En algunas realizaciones, el engarce comprende una estructura de cadena o un oligómero de unidades de repetición tal como unidades de etilenglicol o de aminoácidos. Los ejemplos de grupos funcionales que se usan rutinariamente en restos de unión bifuncionales incluyen, pero sin limitación, electrófilos para reaccionar con grupos nucleófilos y nucleófilos para reaccionar con grupos electrófilos. En algunas realizaciones, los restos de unión bifuncional incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo enlaces doble o triples) y similares. Algunos ejemplos no limitantes de restos de unión bifuncionales incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclobexano-1-carboxilato (SMCC) y ácido 6-amino-hexanoico (AHEX o AHA). Otros grupos de unión incluyen, pero sin limitación, alquilo C_1-C_{10} sustituido, alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido o alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, en los que una lista no limitante de grupos sustituyentes preferidos incluye hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenol, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alquenilo y alquinilo.

La expresión “grupo protector”, como se usa en el presente documento, se refiere a un resto químico lábil que en la técnica se sabe que protege grupos reactivos incluyendo, sin limitación, grupos hidroxilamino y tiol, contra reacciones no deseadas durante los procedimientos sintéticos. Los grupos de protección se usan típicamente de manera selectiva y/u ortogonal para proteger sitios durante las reacciones en otros sitios reactivos y después pueden eliminarse para dejar el grupo desprotegido como tal o disponible para reacciones posteriores. Los grupos protectores, como se conoce en la técnica, se describen en líneas generales en Green y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1999).

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

Ejemplos de grupos protectores de hidroxilo incluyen, pero no se limitan a, acetilo, 1-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropiranilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, bis(2-acetoxietoxi)metilo (ACE), 2-trimetilsililetilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, [(triisopropilsilil)oxi]metilo (TOM), benzoilformiato, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloílo, benzoílo, p-fenilbenzoílo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, trifenilmetilo (tritilo), monometoxitritilo, dimetoxitritilo (DMT), trimetoxitritilo, 1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo (FPMP), 9-fenilxantin-9-ilo (Pixilo) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX). En los que los grupos protectores de hidroxilo más preferentes, incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2,6-diclorobencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, benzoílo, mesilato, tosilato, dimetoxitritilo (DMT), 9-fenilxantin-9-ilo (Pixilo) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX).

Ejemplos de grupos protectores de amino incluyen, pero no se limitan a, grupos protectores carbamato, tales como 2-trimetilsililetoxicarbonilo (Teoc), 1-metil-1-(4-bifenilil)-etoxicarbonilo (Bpoc), t-butoxicarbonilo (BOC), aliloxicarbonilo (Aloc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), y benciloxicarbonilo (Cbz); grupos protectores amida, tales como formilo, acetilo, trihaloacetilo, benzoílo, y nitrofenilacetilo; grupos protectores sulfonamida, tales como 2-nitrobencenosulfonilo; y grupos protectores imina e imida cíclica, tales como ftalimido y ditiasuccinoílo.

Ejemplos de grupos protectores de tiol incluyen, pero no se limitan a, trifenilmetilo (tritilo), bencilo (Bn), y similares.

El término "ortogonalmente protegido" se refiere a grupos funcionales que están protegidos con diferentes clases de grupos protectores, en los que cada clase de grupo protector se puede eliminar en cualquier orden y en presencia de las otras clases (véase, Barany, G. y Merrifield, R.B., J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 7363: *idem,* 1980, 102, 3084.) La protección ortogonal se usa ampliamente, por ejemplo en la síntesis automatizada de oligonucleótidos. Un grupo funcional se desbloquea en presencia de uno o más de los otros grupos funcionales protegidos que no se ven afectados por el procedimiento de desprotección. Este grupo funcional desbloqueado reacciona de alguna manera y en un determinado momento se elimina un grupo protector ortogonal adicional en un conjunto diferente de condiciones de reacción. Esto permite un procedimiento químico selectivo para conseguir un compuesto deseado o un compuesto oligomérico.

En ciertas realizaciones se preparan compuestos oligoméricos mediante la conexión de nucleósidos con fósforo opcionalmente protegido que contiene uniones internucleósido. Los grupos protectores representativos para fósforo que contiene uniones internucleósido tales como uniones fosfodiéster y fosforotioato incluyen grupos β-cianoetilo, difenilsililetilo, δ-cianobutenilo, ciano p-xililo (CPX), *N*-metil-*N*-trifluoroacetil etilo (META), acetoxi fenoxi etilo (APE) y buten-4-ilo. Véanse por ejemplo los documentos de Patente de los Estados Unidos de América números 4.725.677 y Re. 34.069 (β-cvanoetilo); Beaucage, S.L. y Iyer, R.P., Tetrahedron, 49 Nº 10, pp. 1925-1963 (1993); Beaucage, S.L. y Iyer, R.P., Tetrahedron, 49 Nº 46, pp. 10441-10488 (1993); Beaucage, S.L. y Iyer, R.P., Tetrahedron, 48 Nº 12, pp. 2223-231 (1992).

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que tienen grupos de fósforo reactivo útiles para la formación de uniones internucleósido que incluyen por ejemplo uniones internucleósido fosfodiéster y fosforotioato. Tales grupos de fósforo reactivo se conocen en la técnica y contienen átomos de fósforo de valencia P^{III} o P^{V} y se limitan a, fosforamidito, H-fosfonato, triésteres de fosfato y fósforo que contiene auxiliares quirales. Una síntesis preferente en fase sólida sintética utiliza fosforamiditos (química del P^{III}) en forma de fosfitos reactivos. Los compuestos de fosfito intermedios se oxidan posteriormente al estado P^{V} usando procedimientos conocidos para producir, en ciertas realizaciones, uniones internucleótido fosfodiéster o fosforotioato. Fosfatos y fosfitos reactivos adicionales se desvelan en Tetrahedron Report Número 309 (Beaucage y Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311).

Como se usa en el presente documento el término "unión internucleósido" significa que incluye toda clase de grupos de unión internucleósido conocidos en la técnica que incluyen pero no se limitan a, grupos que contienen fósforo que contiene grupos de unión internucleósido tales como fosfodiéster y fosforotioato, grupos que no contienen fósforo que contienen grupos de unión internucleósido tales como formacetilo y metilenimino, y grupos de unión

internucleósido neutros no iónicos tales como amida-3 (3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5') y amida-4 (3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5').

Ejemplos específicos compuestos oligoméricos útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen por ejemplo uniones internucleósido modificadas que no ocurren de forma natural. Se definen dos clases principales de uniones internucleósido según la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Las uniones internucleósido modificadas que tienen un átomo de fósforo incluyen, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros grupos alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquileno, fosfonatos de 5'-alquileno y fosfonatos, fosfinatos, y fosforamidatos quirales que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos de los mismos con unión 2'-5', y los que tienen polaridad invertida en los que una o más uniones internucleósido es una unión 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos que tienen polaridad invertida pueden comprender una unión 3' a 3' sencilla en la mayoría 3' de las uniones internucleótido es decir un residuo nucleósido sencillo invertido que puede estar sin base (la base del nucleótido se ha perdido o contiene un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas ácidas libres.

Los documentos representativos de Patente de los Estados Unidos de América que ilustran la preparación de las uniones que contienen fósforo indicadas anteriormente incluyen, pero no se limitan a: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; z36.821; 5.541.306; 5.350.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050, algunas de las cuales pertenecen al mismo solicitante que el de la presente solicitud.

Las uniones internucleósido modificadas que no tienen un átomo de fósforo incluyen, pero no se limitan a, las que se forman por uniones internucleósido de cadena alquilo o cicloalquilo corta, uniones internucleósido de heteroátomos mixtos y alquilo o cicloalquilo, o uniones internucleósido de una o más cadenas heteroatómicas o heterocíclicas cortas. Éstas incluyen las que tienen una estructura siloxano; estructuras sulfuro, sulfóxido y sulfonato; estructuras formacetilo y tioformacetilo; estructuras metilenformacetilo y tioformacetilo; estructuras riboacetilo; estructuras que contienen alqueno; estructuras sulfamato; estructuras metilenimino y metilenhidrazino; estructuras sulfonato y sulfonamida; estructuras amida; y otras que tienen partes componentes N, O, S y CH_2 mixtas. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleósido" se refiere a una secuencia de dos o más nucleósidos que se unen mediante uniones internucleósido que no tienen átomos de fósforo.

Los documentos representativos de Patente de los Estados Unidos de América que ilustran la preparación de los oligonucleósidos indicados anteriormente incluyen, pero no se limitan a: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439, algunas de las cuales pertenecen al mismo solicitante que el de la presente solicitud.

Como se usa en el presente documento la expresión "unión internucleósido neutra" pretende incluir uniones internucleósido que no son iónicas. Las uniones internucleósido neutras incluyen, pero no se limitan a, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI (3'-CH_2-N(CH_3)-O-5'), amida-3 (3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5'), amida-4 (3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5'), formacetal (3'-O-CH_2-O-5'), y tioformacetal (3'-S-CH_2-O-5'). Uniones internucleósido neutras adicionales incluyen uniones no iónicas que comprenden siloxano (dialquilsiloxano), éster de carboxilato, carboxamida, sulfuro, éster de sulfonato y amidas (véase por ejemplo: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi y P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 y 4, (pp. 40-65)). Uniones internucleósido neutras adicionales incluyen uniones no iónicas que comprenden partes componentes de N, O, S y CH_2 mixtas.

Los nucleósidos bicíclicos que tienen Fórmula I, como se describen en el presente documento, se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas aplicables de síntesis orgánica como, por ejemplo, las que se ilustran en los ejemplos que se muestran posteriormente. Muchas de tales técnicas son bien conocidas en la técnica. Sin embargo, muchas de las técnicas conocidas se explican detalladamente en Compendium of Organic Synthetic Methods (John Wiley & Sons, New York) Vol. 1, Ian T. Harrison y Shuyen Harrison (1971); Vol. 2, Ian T. Harrison y Shuyen Harrison (1974); Vol. 3, Louis S. Hegedus y Leroy Wade (1977); Vol. 4, Leroy G. Wade Jr., (1980); Vol. 5, Leroy G. Wade Jr. (1984); y Vol. 6, Michael B. Smith; así como en March, J., Advanced Organic Chemistry, 3ª Edición, John Wiley & Sons, New York (1985); Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry. En 9 volúmenes, Barry M. Trost, editor en jefe, Pergamon Press, New York (1993); Advanced Organic Chemistry. Part B: Reactions y Synthesis, 4ª Ed.; Carey y Sundberg; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York (2001); Advanced Organic Chemistry, Reactions. Mechanisms, y Structure, 2ª Edición, March, McGraw Hill (1977); Protecting Groups in Organic Synthesis. 2ª Edición, Greene, T.W., y Wutz, P.G.M. John Wiley & Sons, New York (1991); y Comprehensive Organic Transformations, 2ª Edición Larock, R.C., John Wiley & Sons, New York (1999).

Los compuestos descritos en el presente documento contienen al menos un centro asimétrico y de esta manera dan lugar a enantiómeros, diastereómeros, y formas estereoisoméricas de éter que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-, α o β, o como (D)- o (L)- tales como para los aminoácidos. Se pretende que todos estos isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras se incluyan en el presente

documento. Los isómeros ópticos se pueden preparar a partir de sus respectivos precursores ópticamente activos mediante los procedimientos descritos anteriormente, o mediante la resolución de mezclas racémicas. La resolución se puede realizar en presencia de un agente de resolución, mediante cromatografía o mediante cristalización repetida o mediante alguna combinación de estas técnicas que se conocen por los expertos en la materia. Se pueden encontrar detalles adicionales con respecto a dichas resoluciones en Jacques, et al., Enantiomers, Racemates, y Resolutions (John Wiley & Sons, 1981). Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen dobles enlaces olefínicos, otros enlaces no saturados, u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique otra cosa, se entiende que los compuestos incluyen los isómeros geométricos E y Z o los isómeros cis y trans. De forma análoga, también se pretende incluir todas las formas tautoméricas. La configuración de cualquier doble enlace carbono-carbono que aparece en el presente documento se selecciona solamente por conveniencia y no pretende designar una configuración particular a menos que el texto así lo establezca; de esta manera un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-heteroátomo representado de forma arbitraria en el presente documento en la forma trans puede ser cis, trans, o una mezcla de los dos en cualquier proporción.

En determinadas realizaciones, la expresión “compuesto oligomérico” se refiere a un polímero que comprende subunidades monoméricas unidas que tienen al menos una región que es capaz de hibridarse con una molécula de ácido nucleico. La expresión “compuesto oligomérico” incluye polímeros que comprenden subunidades monoméricas unidas en las que las unidades monoméricas incluyen nucleósidos, nucleósidos modificados, análogos de nucleósidos, miméticos de nucleósidos así como componentes de ácidos no nucleicos tales como grupos conjugados. En determinadas realizaciones, mezclas de subunidades monoméricas tales como, pero sin limitación, las enumeradas, proporcionan compuestos oligoméricos que tienen propiedades potenciadas para usos tales como terapéuticos y de diagnóstico. Los nucleósidos bicíclicos que tienen la fórmula I se harán referencia como un nucleósido o nucleósido bicíclico modificado ya que el sistema anular de furanosa y la base heterocíclica permanecen intactos. Las subunidades monoméricas pueden unirse mediante uniones nucleosídicas fosfodiéster de origen natural o, como alternativa, mediante cualquiera de una pluralidad de uniones internucleósido desveladas en el presente documento, tales como, pero sin limitación, uniones internucleósido fósforotioato o sus mezclas.

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

Los compuestos oligoméricos se preparan linealmente de manera rutinaria aunque pueden unirse o preparase de otra manera para ser circulares y también pueden incluir ramificaciones. Los compuestos oligoméricos pueden combinarse para formar construcciones bicatenarias, tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridarse para formar composiciones bicatenarias. Las composiciones bicatenarias pueden unirse o separarse y pueden incluir proyecciones en los extremos.

Como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La parte base del nucleósido es normalmente un resto base heterocíclico. Las dos clases comunes de tales bases heterocíclicas son purinas y pirimidinas. Los nucleótidos y nucleósidos que adicionalmente incluyen un grupo fosfato se unen covalentemente a la parte de azúcar del nucleósido. Para estos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse al resto 2’, 3’ o 5’ hidroxilo del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato se unen covalentemente a nucleósidos adyacentes para entre sí formar un compuesto polimérico lineal. Las terminaciones respectivas de esta estructura polimérica lineal pueden unirse por hibridación o por formación de un enlace covalente para formar una estructura circular. Sin embargo, generalmente se desean estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura del oligonucleótido, normalmente se hace referencia a los grupos fosfatos para formar las uniones internucleósido del oligonucleótido. La unión internucleósido normal de ARN y ADN es una unión fosfodiéster de 3’ a 5’.

En el contexto de la presente invención, el término “oligonucleótido” se refiere al oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleico (ADN). Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases de origen natural, azúcares y uniones internucleósido covalentes. La expresión “análogo oligonucleotídico” se refiere a oligonucleótidos que tienen una o más partes de origen no natural. Tales oligonucleótidos de origen no natural a menudo se desean sobre las formas de origen natural debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada para el ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

En el contexto de la presente invención, el término “oligonucleósido” se refiere a una secuencia de nucleósidos que está unida por uniones internucleósido que no tienen átomos de fósforo. Las uniones internucleósido de este tipo incluyen alquilo, cicloalquilo, heteroátomo de alquilo mixto, heteroátomo de cicloalquilo mixto de cadena corta, uno o más heteroátomos de cadena corta y uno o más heterocíclicos de cadena corta. Estas uniones internucleósido incluyen, pero sin limitación, siloxano, sulfido, sulfóxido, sulfona, acetilo, formacetilo, tioformacetilo, metileno,

formacetilo, tioformacetilo, alquenilo, sulfamato, metilenimino, metilenhidracino, sulfonato, sulfonamida, amida y otros que tienen partes mixtas de componentes N, O, S y CH_2.

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

El término “nucleobase” o la expresión “resto base heterocíclico”, como se usa en el presente documento, pretende ser sinónimo de “base de ácido nucleico o mimético del mismo”. En general, una nucleobase es cualquier subestructura que contenga uno o más átomos o grupos de átomos que puedan unirse por hidrógeno a una base de un ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, las nucleobases “no modificadas” o “naturales” incluyen las bases purínicas de adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas de timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroxietil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil ($-C\equiv C-CH_3$) uracilo y citosina y otros derivados de alquinilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8 sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5 sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina, 3-deazaguanina y 3-deazaadenina, bases universales, bases hidrófobas, bases promiscuas, bases prolongadas por tamaño y bases fluoradas, como se define en el presente documento. Otras nucleobases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxacin citidina(1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiacin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiacin-2(3H)-ona), pinzamientos G, tales como, fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidin (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3’,2’:4,5]pirrolo [2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que las bases de purina y de pirimidina se reemplazan con otros heterociclos, por ejemplo 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras nucleobases incluyen las desveladas en la Patente de Estados Unidos Nº 3.687.808, las desveladas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las desveladas por Englisch y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y las desveladas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993.

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

Las patentes de Estados Unidos representativas que instruyen sobre la preparación de algunas de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, pero sin limitación, el documento de Estados Unidos indicado anteriormente 3.687.808, así como los documentos de Estados Unidos: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.396.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; y 5.681.941, algunos de los cuales pertenecen al mismo solicitante que el de la presente solicitud y la patente de Estados Unidos 5.750.692, que pertenece al mismo solicitante que el de la presente solicitud.

Los compuestos oligoméricos también pueden contener uno o más nucleósidos con restos de azúcar modificados. El anillo de azúcar furanosilo puede modificarse de diversas maneras incluyendo la sustitución con un grupo sustituyente (2’, 3’, 4’ o 5’), la formación de puentes para formar un BNA y la sustitución del 4’-O con un heteroátomo tal como S o N(R). Algunas patentes de Estados Unidos Representativas que instruyen sobre la preparación de tales azúcares modificados incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722: 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; 5.700.920; 6.600.032 y la Solicitud Internacional PCT/U-S2005/019219, presentada el 2 de junio del 2005 y publicada como WO 2005/121371 el 22 de diciembre del 2005, algunas de las cuales son propiedad del mismo solicitante que el de la presente solicitud. Una lista representativa de azúcares modificados preferidos incluye, pero sin limitación, azúcares sustituidos que tienen un grupo sustituyente 2’-F, 2’-OCH_2 o un 2’-$O(CH_2)_2$-OCH_3 (2’-MOE o simplemente MOE); azúcares modificados

bicíclicos y azúcares modificados 4'-tio.

Como se usa en el presente documento la expresión "mimético de nucleósido" o simplemente "mimético" pretende incluir aquellas estructuras usadas para sustituir el azúcar, el azúcar y al base o el azúcar, la base y la unión internucleósido. Un mimético de azúcar incluirá estructuras tales como, pero sin limitación, el anillo ciclohexitol o el anillo morfolino sustituyendo al anillo furanosa del azúcar pero conservando una base heterocíclica para la hibridación y está unido por unión internucleósido fosfodiéster. Un mimético de nucleótido incluiría estructuras tales como, sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos unidos por -N(H)-C(=O)-O- u otra unión no fosfodiéster) en la que el azúcar y la unión internucleósido se han sustituido. En general un mimético conserva una base heterocíclica para la hibridación con otra base heterocíclica pero el azúcar o el azúcar y el enlace unión se sustituyen por grupos que se espera que potencien una o más propiedades en el compuesto oligomérico resultante.

En determinadas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 subunidades monoméricas de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que la invención representa compuestos oligoméricos de 8, 9, 10, 11, 12, 1 3, 1 4, 1 5, 16, 17, 1 8, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, u 80 subunidades monoméricas de longitud, o cualquier intervalo en su interior.

En determinadas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de 8 a 40 subunidades monoméricas de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que esto representa compuestos oligoméricos de 8, 9, 10,11, 12,13, 14,15,16, 17,18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 subunidades monoméricas de longitud, o cualquier intervalo en su interior.

En determinadas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de 8 a 20 subunidades monoméricas de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que esto representa compuestos oligoméricos de 8, 9, 10,11,12, 13, 14, 15, 16, 17,18, 19 o 20 subunidades monoméricas de longitud, o cualquier intervalo en su interior.

En determinadas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de 10 a 16 subunidades monoméricas de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que esto representa compuestos oligoméricos de 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 subunidades monoméricas de longitud, o cualquier intervalo en su interior.

En determinadas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de 12 a 16 subunidades monoméricas de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que esto representa compuestos oligoméricos de 12, 13, 14,15 o 16 subunidades monoméricas de longitud, o cualquier intervalo en su interior.

En determinadas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de 10 a 14 subunidades monoméricas de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que esto representa compuestos oligoméricos de 10, 11, 12, 13 o 14 subunidades monoméricas de longitud, o cualquier intervalo en su interior.

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

En determinadas realizaciones, se proporcionan compuestos oligoméricos que comprenden de 8-16, 8-40, 10-12, 10-14, 10-16, 10-18, 10-20, 10-21, 12-14, 12-16, 12-18, 12-20 y 12-24 subunidades monoméricas unidas.

En determinadas realizaciones, se preparan compuestos oligoméricos de acuerdo con procedimientos bibliográficos

para ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217; Gait y col., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA:Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36; Galio y col.. Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713), según sea apropiado. Procedimientos adicionales para la síntesis en fase sólida pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos de Caruthers Nº 4.415.732; 4.458.066; 4.500.707; 4.668.777; 4.973.679; y 5.132.418; y en las Patentes de Estados Unidos de Koster Nº 4.725.677 y Re. 34.069.

El equipo disponible en el mercado, rutinariamente usado para la síntesis basada en medio de soporte de compuestos oligoméricos y compuestos relacionados se comercializada por diversos vendedores, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Adicionalmente, o como alternativa, para tal síntesis, puede emplearse cualquier otro medio conocido en la técnica. Las técnicas de fase sólida adecuadas, incluyendo técnicas de síntesis automatizadas, se describen en F. Eckstein (ed.), Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, Oxford University Press, Nueva York (1991).

La síntesis de ARN y análogos relacionados con respecto a la síntesis de ADN y análogos relacionados se ha aumentado a medida que aumentan los esfuerzos en ARNi. Las estrategias de síntesis de ARN primario que actualmente se usan en el comercio incluyen 5'-O-DMT-2'-O-t-butildimetilsilil (TBDMS), 5'-O-DMT-2'-O-[1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-il] (FPMP), 2'-O-[(triisopropilsilil)oxi]metil (2'-O-CH_2-O-Si(iPr)$_3$ (TOM) y 5'-O-silil éter-2'-ACE (5'-O-bis(trimetilsiloxi)ciclododeciloxisilil éter (DOD)-2'-O-bis(2-acetoxietoxi)metil (ACE). Una lista actual de algunas de las compañías principales que actualmente ofrecen productos de ARN incluyen Pierce Nucleic Acid Technologies, Dharmacon Research Inc., Ameri Biotechnologies Inc., e Integrated DNA Technologies, Inc. Una compañía, Princeton Separations, está comercializando un activador de síntesis de ARN aconsejada para reducir tiempos de acoplamiento especialmente con química TOM y TBDMS.

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

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

En determinadas realizaciones, en el presente documento, puede usarse cada una de las estrategias de síntesis de ARN mencionadas anteriormente. En el presente documento pueden ser también factibles estrategias que sean un híbrido de lo anterior, usando, por ejemplo, un grupo protector 5' de una estrategia con un grupo protector 2'-O de otra estrategia.

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

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

"Complementariedad", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento exacto de dos nucleobases independientemente de donde estén localizadas. Por ejemplo, si en una determinada posición una nucleobase de un compuesto oligomérico es capaz de unirse mediante hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, siendo el ácido nucleico diana ADN, ARN o una molécula oligonucleotídica, entonces la posición de la unión mediante hidrógeno entre el oligonucleótido matriz y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN o molécula oligonucleotídica adicional son complementarios entre sí cuando se ocupa un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula por nucleobases que pueden unirse entre sí mediante hidrógeno. Por tanto, las expresiones que "puede hibridarse específicamente" y "complementariedad" pueden usarse para identificar un grado suficiente de emparejamiento exacto o de complementariedad sobre un número suficiente de nucleobases de manera que se produce una unión estable y específica entre el oligonucleótido y un ácido nucleico diana.

En la técnica se entiende que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser al 100% complementaria con la de su ácido nucleico diana para poder hibridarse específicamente. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de tal manera que los segmentos que intervienen o los adyacentes no estén implicados en el suceso de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle o una estructura en horquilla). Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento pueden comprender una complementariedad de

secuencia de al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99%, con una región diana dentro de la secuencia de ácido nucleico diana a la cual se dirigen. Por ejemplo, un compuesto oligomérico en el que de 18 a 20 nucleobases del compuesto oligomérico son complementarias con una región diana, y por lo tanto podría hibridarse específicamente, representaría una complementariedad del 90 por ciento. En este ejemplo, las restantes nucleobases no complementarias pueden agruparse o entremezclarse con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o ser bases complementarias. Así pues, un compuesto oligomérico que tenga una longitud de 18 nucleobases que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que estén flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría una complementariedad global del 77,8% con el ácido nucleico diana y se incluiría así dentro de este alcance. El porcentaje de complementariedad de un compuesto oligomérico con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamiento local básico) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7,649-656).

Adicionalmente, en el presente documento, se incluyen compuestos oligoméricos tales como compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencias guiadas externamente (EGS, *external guide sequence*), empalmadores alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que se hibridan al menos con una parte del ácido nucleico diana. Así pues, estos compuestos oligoméricos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en orquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Una vez introducidos en un sistema, los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden suscitar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar modificaciones del ácido nucleico diana.

Un ejemplo no limitante de una enzima de este tipo es la RNAsa H, una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. En la técnica se sabe que los compuestos oligoméricos monocatenarios que son “de tipo ADN” suscitan RNAsa H. La activación de la RNAsa H, por lo tanto, da como resultado la escisión del ARN diana, potenciando así en gran medida la eficacia de la inhibición de la expresión de genes mediada por oligonucleótidos. Se han postulado funciones similares para otras ribonucleasas tales como las de la familia de enzimas RNasa III y ribonucleasa L.

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

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

Los segmentos diana adecuados también pueden combinarse con sus compuestos oligoméricos antisentido complementarios respectivos proporcionados en el presente documento para formar oligonucleótidos bicatenarios (dúplex) estabilizados. En la técnica se ha observado que dichos restos oligonucleotídicos bicatenarios modulan la expresión diana y regulan la traducción así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas (Fire y col., Nature, 1998, 391, 806-811; Timmons and Fire, Nature 1998, 395, 854; Timmons y col., Gene, 2001, 263, 103-112; Tabara y col., Science, 1998, 282, 430-431; Montgomery y col Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95,15302-15507; Tuschl y col., Genes Dev., 1999, 13, 3191-3197; Elbashir y col., Nature, 2001, 411, 494-498; Elbashir y col., Genes Dev. 2001, 15, 188-200). Por ejemplo, se ha observado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana mediante hibridación clásica de cadena antisentido del dúplex con la diana, desencadenando por tanto la degradación enzimática de la diana (Tijsterman y col., Science, 2002, 295, 694-697).

Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y variación de dianas. En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos y las dianas identificados en el presente documento pueden usarse en proyectos de descubrimiento de fármacos para aclarar las relaciones que existen entre las proteínas y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular un péptido diana que comprende poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de la diana y/o criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento

después del tratamiento y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o una muestra tratada con un compuesto oligomérico adicional de la invención. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación diana o para determinar la validez de un producto génico particular como una diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

Como se usa en el presente documento, el término “dosis” se refiere a una cantidad específica de un agente farmacéutico proporcionado en una sola administración. En determinadas realizaciones, una dosis puede administrarse en dos o más emboladas, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, cuando se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen no fácilmente adecuado para una sola inyección. En tales realizaciones, para conseguir la dosis deseada, pueden usarse dos o más inyecciones. En determinadas realizaciones, para minimizar la reacción en el sitio de inyección en un individuo, puede administrarse una dosis en dos o más inyecciones.

En determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención modificados químicamente tienen mayor afinidad por los ARN diana que por los ADN no modificados. En determinadas realizaciones de este tipo, esta mayor afinidad a su vez proporciona una fuerza aumentada deseada para la administración de dosis más bajas de tales compuestos, un potencial reducido para toxicidad y una mejora en el índice terapéutico y disminución global del coste de la terapia.

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

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

Como un ejemplo no limitante, los patrones de expresión dentro de células o de tejidos tratados con uno o más compuestos oligoméricos se comparan con células o tejidos control no tratados con compuesto oligoméricos y los patrones producidos se analizan para detectar niveles de expresión de genes diferenciales a los que pertenecen, por ejemplo, para asociación de enfermedades, ruta de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o no estimuladas y en presencia o en ausencia de otros compuestos y o compuestos oligoméricos que influyen en los patrones de expresión.

Los ejemplos de procedimientos de análisis de expresión de genes conocidos en la técnica incluyen técnicas de matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Cells, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16), SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*, análisis en serie de expresión de genes) (Madden, y col., Drug Discov. Today, 2000,5,415-425), READS (*Restriction Enzyme Amplification of Digested cDNAs*, amplificación con enzimas de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), TOGA (*Total Gene Expression Analysis*, análisis de expresión de genes total) (Sutcliffe, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000,97, 1976-81), matrices de proteína y proteómica (Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut, y col., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de marcador de secuencia expresada (EST, Expressed Secuence Tag) (Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson., y col.. J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas digitales de sustraccion de ARN (SuRF, S*ubtractive RNA Fingerprinting*) (Fuchs, y col.. Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson, y col., Cytometry, 2000, 41, 203-208), clonación de sustraccion, presentación diferencial (DD, *Differential Display*) (Jurecic y Belmont. Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3. 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, y col., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31 286-96), FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*, hibridación fluorescente *in situ*) (Going y Gusterson Eur. J. Cancer, 1999,35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3,235-41).

Aunque en determinadas realizaciones, los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento pueden utilizarse como se describe, los siguientes ejemplos sirven únicamente para ilustrar y no pretenden ser limitantes.

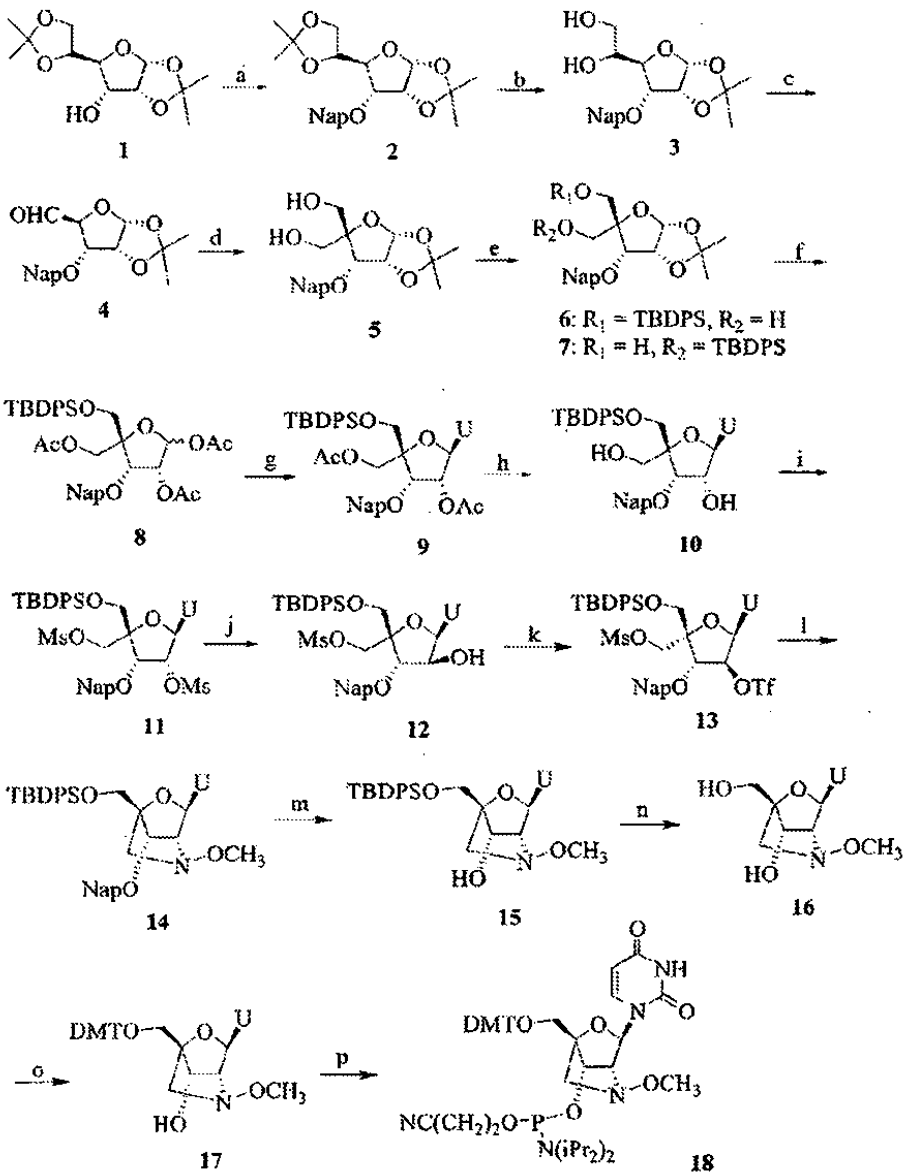
Ejemplos

General

En los ejemplos, se han anotado las secuencias enumeradas para indicar donde hay nucleósidos modificados o uniones internucleósido. Todos los nucleósidos no anotados son β-D-ribonucleósidos unidos por uniones fosfodiéster internucleósido. Las uniones fósforotioato internucleósido se indican subrayadas. Los nucleósidos modificados se indican mediante una letra subíndice después de la letra mayúscula que indica el nucleósido. En particular, el subíndice "m" indica 2'-O-metilo; el subíndice "n" indica N-metoxi-amino BNA; el subíndice "l" indica 4'-CH_2-O-2' BNA; y el subíndice "e" indica 2'-O-metoxietil (MOE). Por ejemplo U_n es una uridina modificada que tiene un *N*-metoxi amino BNA. ^{Mc}C y ^{Mc}U indican un ribonucleósido 5-metil citosina o un ribonucleósido 5-metil uracilo respectivamente.

Ejemplo 1

Preparación del Compuesto 18 (Esquema 1)



Esquema 1. (a) NaH, DMF, 2-(bromometil)-naftaleno; (b) AcOH, H_2O (c) $NaIO_4$, CH_2Cl_2; (d) HCHO, NaOH; (e) TBDPSCl, Et_3N, DMAP, CH_2Cl_2, ta; (f) Ac_2O, AcOH, Cat. H_2SO_4; (g) Uracilo, BSA, TMSOTf, CH_3CN, reflujo, 2h; (h) NH_3 7 M en MeOH, ta; (j) MsCl, Py, ta, 98%; (k) i) CH_3CN, DBU, ta, 95%, ii) NaOH acuoso 0,4 M, dioxano, ta, 85%; (l) $(CF_3SO_3)_2O$, DMAP, CH_2Cl_2, -15 a -10 °C, 58-64%; (m) *N*-metoxiamina, DMF, *i*Pr_2NEt, 60 °C, 18 h, 85%; (n) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O, 18 h, ta, 89%; (o) TEA.3HF, TEA, THF, 85%; (p) DMTCl, Py, ta, 97%; (q) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF, 94%.

a) Preparación del Compuesto 2

Se añadió NaH (al 60% en aceite mineral, 49,2 g, 1,6 equivalentes) a un matraz de fondo redondo de 2 L lavado abundantemente con nitrógeno y se lavó con hexanos (2 x 0,5 l) para retirar el aceite mineral. Después de decantar los hexanos, se añadió DMF (700 ml) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Se añadió a la reacción la 1,2:5,6-Di-*O*-isopropiliden-α-D-alofuranosa 1 (200 g, 0,77 moles, disponible en el mercado a partir de Pfanstiehl Laboratories, Inc.; artículo # D-126) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadió lentamente a la mezcla de reacción 2-(Bromometil)-naftaleno (187 g, 1,1 equivalentes) durante 30 minutos y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante otros 90 minutos. El análisis por TLC (30% de EtOAc/hexanos, visualizado con carbonización después de tratamiento de pulverización con reactivo de anisaldehído) en este momento indicó el consumo completo del material de partida del Compuesto 1. La reacción se vertió en agua fría (1,5 l), que estaba en un baño de hielo. La mezcla acuosa resultante se extrajo con EtOAc (250 ml x 2) y se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con agua (1 l) y salmuera (1 l) y se concentraron a presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 500 ml. A continuación se añadió agua a la fase orgánica y la mezcla bifásica resultante se evaporó a presión reducida (50 °C) hasta que se observaron los primeros signos de precipitado en la fase acuosa. En este momento se retiró el matraz del evaporador rotatorio y se agitó vigorosamente usando un agitador mecánico durante 1 hora. El precipitado de color amarillo claro obtenido de esta manera se recogió por filtración usando un filtro de tela. A continuación se suspendió el sólido en hexanos (1 l), se filtró, se aclaró con una cantidad adicional de hexanos (500 ml) y se secó para proporcionar el Compuesto 2 (276 g, 90%) en forma de un sólido de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,85 (m, 4H), 7,48 (m, 3H), 5,74 (s, 1H), 4,92 (d, 1H, *J* = 11,7), 4,75 (d, 1H, *J* = 11,6), 4,58 (m, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,03-3,86 (m, 3H), 1,61 (s, 3H), 1,36 (s, 9H).

b) Preparación del Compuesto 3

Se añadió el Compuesto 2 (115 g, 0,287 moles) en pequeñas porciones a una solución de ácido acético (958 ml) y agua (383 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas después de lo cual el análisis por TLC (30% de EtOAc/hexanos) indicó el consumo completo del Compuesto 2. A continuación se concentró la reacción a presión reducida hasta que se retiró la mayoría del ácido acético. La solución resultante se vertió, en pequeñas porciones, en una mezcla en agitación de EtOAc (1 l) y solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (1 l). A continuación se añadió bicarbonato sódico sólido a la mezcla anterior hasta que cesó el desprendimiento de gas. A continuación se separó la fase orgánica, se lavó con agua (1 l x 2) y salmuera (1 l), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el Compuesto 3 (102 g) en forma de una espuma de color amarillo, que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

c) Preparación del Compuesto 4

Se disolvió el Compuesto 3 en bruto (102 g) en dioxano (862 ml) y se añadió una solución de $NaIO_4$ (64 g) en agua (2,18 l) durante 40 minutos. Después de 90 minutos la mezcla de reacción se vertió en EtOAc (1 l) y se separó la fase orgánica, se lavó con agua (1 l) y salmuera (1 l), se secó (Na_2SO_4) y se concentró para proporcionar el Compuesto 4 en forma de un sólido de color blanco, que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

d) Preparación del Compuesto 5

Se disolvió el Compuesto 4 (en bruto, de la etapa C anterior) en una mezcla de THF (287 ml) y agua (287 m) y la reacción se enfrió en un baño de hielo. Se añadieron a la reacción NaOH 10 N (200 ml) y formaldehído (283 ml de una solución acuosa al 37%) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. Después, la reacción se vertió en EtOAc (500 ml) y se lavó con agua (1 l) y salmuera (1 l) y se evaporó a presión reducida hasta que quedaron aproximadamente 100 ml de EtOAc (se formó un precipitado de color blanco en el procedimiento). Se añadió Et_2O (200 ml) al precipitado y la mezcla se agitó durante 10 minutos y se filtró para proporcionar el Compuesto 5 en forma de un sólido de color blanco (60 g, 60% a partir de 2). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85 (m, 4H), 7,48 (m, 3H), 5,75 (d, 1H, *J* = 3,9), 4,96 (d, 1H. *J* = 11,8), 4,75 (d, 1H, *J* = 11,8), 4,66 (m, 1H), 4,26 (d, 1H, *J* = 5,2), 3,95 (m, 2H), 3,79 (m, 1H), 3,63 (m, 1H), 2,39 (m, 1H, OH), 1,66 (s, 3H), 1,34 (s, 3H).

e) Preparación de los Compuestos 6 y 7

Se añadió *terc*-Butildifenilclorosilano (45,0 ml, 170 mmol) a una solución fría (0 °C) en agitación del Compuesto 5 (50 g, 138 mmol) y trietilamina (27,00 ml, 190 mmol) en diclorometano (666 ml). Después de completarse la adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 16 h. Se añadió a la reacción MeOH (50 ml) (para inactivar el exceso de TBDPSCl) y se continuó la agitación durante otras 2 h a temperatura ambiente. A continuación se diluyó la reacción con acetato de etilo (300 ml) y la fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (200 ml) y salmuera (200 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO_2, 15% a 50% de EtOAc: en hexanos) para proporcionar el Compuesto 6 (45,2 g, 64%, sólido de color blanco), el Compuesto 7 (18,8 g, 26%, aceite viscoso) y material de partida del Compuesto 5 sin reaccionar (5,11 g, 10%). Compuesto 6: RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 (m, 4H), 7,56 (m, 7H), 7,30 (m, 6H), 5,80 (s, 1H). 4,97 (d, 1H, *J* = 11,4), 4,70 (m, 2H), 4,46 (m, 1H), 3,92-3,66 (m, 4H), 2,39 (m, 1H, OH), 1,67 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 0,92 (s, 9H). Compuesto 7: RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,9-7,3 (m, 17H), 5,71 (d, 1H, *J* = 3,9), 4,86 (d, 1H, *J* = 12,2), 4,74 (d, 1H, *J* = 12,2), 4,56 (m, 1H), 4,22 (d, 1H, *J* = 11,1), 4,18 (m, 1H), 4,07 (d, 1H, *J* = 11,1), 4,02 (dd, 1H, *J*

= 4,2, 12,0), 3,64 (dd, 1H, *J* = 9,4, 11,9), 1,89 (m, 1H), 1,25 (s, 6H), 1,05 (s, 9H).

f) Preparación del Compuesto 8

Se añadió H_2SO_4 concentrado (2 gotas) a una solución del Compuesto 6 (18 g, 30,06 mmol) en ácido acético glacial (88 ml) y anhídrido acético (22 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (300 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (200 ml), $NaHCO_3$ saturado (200 ml) y salmuera (200 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna (SiO_2, eluyendo con 20% a 33% de acetato de etilo/hexanos) proporcionó el Compuesto 8 (18,53 g, 90%, mezcla α/β, 4:1). RMN ^{1}H (isómero mayoritario, 300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85-7,31 (m, 17H), 6,19 (s, 1H), 7,30 (m, 6H), 5,43 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 4,978-4,68 (m, 2H), 4,56-4,51 (m, 3H), 3,68 (m, 2H), 2,12 (s, 3H), 1,96 (s, 3H), 1,04 (s, solapado con el otro isómero, 9H,); MS (ES) *mlz* 707,1 [M + Na].

g) Preparación del Compuesto 9

Se mezcló el Compuesto 8 (18 g, 26,30 mmol) con uracilo (5,90 g, 52,6 mmol) y se secó sobre P_2O_5 a presión reducida durante una noche. La mezcla de reacción se suspendió en CH_3CN anhidro (113 ml) y se añadió *N,O*-Bis(trimetilsilil)acetamida (38,58 ml, 117,80 mmol). Después de calentar a 67 °C durante 1,5 h para obtener una solución transparente, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. A esto se añadió triflato de trimetilsililo (9,52 ml, 52,60 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 15 min a continuación se calentó a 70 °C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en acetato de etilo (200 ml). La fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ saturado (100 ml) y salmuera (100 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 5% de metanol en CH_2Cl_2 para proporcionar el Compuesto 9 (16,85 g, 87%). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8,22 (s a, 1H), 7,63-7,08 (m, 18H), 5,98 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 5,22 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 5,14 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 4,54 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 4,38-4,26 (m, 3H), 3,87 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 3,70 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 3,49 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 1,88 (s, 3H), 1,70 (s, 3H), 0,82 (s, 9H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170,6, 170,3, 162,91, 150,2, 140,2, 134,6, 133,4, 132,8, 132,1, 130,5, 130,4, 128,6, 128,2, 128,0, 127,0, 126,6, 126,5, 125,8, 103,1, 87,5, 87,0, 77,4, 77,1, 74,9, 65,0, 63,3, 27,2, 20,9, 19,5: MS (ES) *m/z* 735,1 $[M-H]^-$.

h) Preparación del Compuesto 10

Se disolvió el Compuesto 9 (16,7 g, 22,66) en amoniaco metanólico (7 M, 123 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Se retiró el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna y se eluyó con 5% de metanol en diclorometano para producir el Compuesto 10 (14,18 g, 96%). RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,35 (s, 1H), 7,94-7,89 (m, 4H), 7,59-7,30 (m, 14H), 5,95 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 5,74 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 5,17 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,04 (t, *J* = 5,9 y 5,1 Hz, 1H), 4,97 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,69 (d, *J* = 12,1 Hz, 1R), 4,4-4,38 (m, 1H), 4,26 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 3,81-3,69 (m, 3H) 3,59-3,53 (m, 1 H), 0,93 (s, 9H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 163,7, 151,2, 140,3, 135,7, 135,5, 134,9, 133, 4, 133,3, 132,9, 132,2, 130,3, 130,2, 128,6, 128,2, 128,1, 127,9, 127,2, 126,4, 126,3, 126,1, 102,7, 91,4, 89,2, 76,4, 75,0, 73,5, 65,1, 63,0, 27,1, 19,5; MS (ES) *m/z* 650,9 $[M -H]^-$.

i) Preparación del Compuesto 11

Se secó el Compuesto 10 (14 g, 21,46 mmol) sobre P_2O_5 a presión reducida. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (7,51 ml, 96,68 mmol) a una solución fría (0 °C) del Compuesto 10 en piridina anhidra (118 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, la mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo y la fase orgánica se lavó de forma secuencial con $NaHCO_3$ saturado (400 ml) y salmuera (400 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró al vacío. El residuo obtenido se purificó usando cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 5% de MeOH en CH_2Cl_2 para proporcionar el Compuesto 11 (16,21 g, 93% de rendimiento). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8,33 (s, 1H), 7,86-7,79 (m, 4H), 7,58-7,28 (m, 14H), 6,13 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 5,38 (m, 1H), 5,31 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 4,96 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 4,65 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 4,57-4,53 (m, 2H), 4,23 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 3,98 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H) 3,77 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 3,18 (s, 3H), 2,84 (s, 3H), 1,05 (s, 9H); MS (ES) *m/z* 806,9 $[M-H]^-$.

j) Preparación del Compuesto 12

A una solución del Compuesto 11 (16,00 g, 19,74 mmol) en CH_3CN anhidro (135 ml) se añadió 1,8-diazabiciclo[5,4.0]undec-7-eno (5,46 ml, 39,48 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, la mezcla se diluyó con EtOAc (300 ml), se lavó con ácido acético acuoso al 1% (v/v) (1 x 400 ml) y salmuera (2 x 400 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se evaporó hasta conseguir una espuma. La espuma se disolvió de nuevo en 1,4-dioxano (216 ml) y se añadió NaOH acuosa 2 M (54 ml). Después de 45 min, la mezcla se neutralizó con AcOH, se diluyó en acetato de etilo (400 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (1 x 300 ml) y salmuera (300 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se evaporó. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (5% de MeOH en CH_2Cl_2) proporcionó el Compuesto 12 (12,25 g, 84,8% de rendimiento) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,33 (s, 1H), 7,91 (s a, 4H), 7,59-7,34 (m, 14H), 6,22 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 6,02 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 5,16 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,97 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H), 4,79 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H), 4,58-4,50 (m, 2H), 4,40 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 4,34 (s a, 1H) 3,84 (m, 2H), 3,16 (s, 3H), 0,85 (s, 9H); MS (ES) *mlz* 731,2 $[M + H]^+$.

k) Preparación del Compuesto 13

Se mezcló el Compuesto 12 (11,76 g, 16,11 mmol) con *N,N*-dimetilaminopiridina (11,79 g, 96,62 mmol) y se secó sobre P_2O_5 a presión reducida durante una noche. La mezcla seca se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (94 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 15 °C (baño de hielo seco/etanol). A la solución enfriada se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (6,59 ml, 32,22 mmol) en forma de una solución en CH_2Cl_2 anhidro (70 ml). Después de agitar de -15 a -10 °C durante 1,5 h en atmósfera de argón, la mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (200 ml) enfriado en hielo. La solución resultante se lavó con $NaHCO_3$ acuoso saturado (200 ml) enfriado en hielo y salmuera (200 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se evaporó para obtener un aceite de color amarillo pálido. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (1:1 de hexanos:acetato de etilo) proporcionó el Compuesto 13 (8,26 g, 59,5%) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8,19 (s, 1H), 7,85-7,78 (m, 4H), 7,56-7,21 (m, 14H), 6,36 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 5,57 (m, 1H), 5,50 (s a, 1H), 4,98 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H), 4,70-4,56 (m, 3H), 4,40 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H), 3,81 (d, *J* =10,6 Hz, 1H) 3,66 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H), 2,87 (s, 3H), 0,89 (s, 9H); RMN ^{19}F (282 MHz, $CDCl_3$) δ -74,22; HRMS (TOF MS ES) Calc. para $C_{39}H_{41}F_3N_2O_{11}S_2Si\ Na^+$ 885,1771, encontrado 885,1769; MS (ES) *m/z* 863,0 $[M+H]^+$.

l) Preparación del Compuesto 14

Se añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (15,66 ml, 89,90 mmol) y *N*-metoxiamina (4,23 g, 90 mmol) al Compuesto 13 (7,86 g, 9,12 mmol) disuelto en DMF anhidra (12 ml) en un frasco de presión. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (300 ml) y se lavó de forma secuencial con $NaHCO_3$ acuoso (5% en peso, 2 x 300 ml) y salmuera (300 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (1:1 de hexanos : EtOAc) para producir el Compuesto 14 (5,09 g, 85% de rendimiento) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,39 (s, 1H), 7,93-7,81 (m, 4H), 7,73-7,32 (m, 14H), 5,98 (s a, 1H), 5,15 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,86-4,69 (m, 2H), 4,31 (s, 1H), 4,17 (s, 1H), 3,96-3,86 (m, 2H), 3,53 (s, 3H), 3,47 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H), 2,94 (s a, 1H), 0,95 (s, 9H); HRMS (TOF MS ES) Calc. para $C_{33}H_{41}N_3O_5Si\ Na^+$ 686,2662, encontrado 686,2657; MS (ES) *m/z* 664,2 $[M+H]^+$.

m) Preparación del Compuesto 15

A una solución del Compuesto 14 (4,98 g, 7,5 mmol) en diclorometano (77 ml) se añadieron agua (0,3 ml, 16,54 mmol) y 2,4-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (9,76 g, 43 mmol). La solución de color marrón oscuro se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó de forma secuencial con $NaHCO_3$ acuoso (5% en peso, 2 x 200 ml) y salmuera (200 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 5% de MeOH y 0,5% de trietilamina en CH_2Cl_2 para producir el Compuesto 15 (3,36 g, 85,5% de rendimiento) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,37 (s, 1H), 7,79 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,70-7,42 (m, 10H), 5,95 (s a, 1H), 5,61 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H), 5,29 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,09 (s a, 1H), 3,89 (s a, 2H), 3,85 (s, 1H), 3,49 (s, 3H), 3,43 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H) 2,83 (s a, 1H), 1,03 (s, 9H); RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ 166,4, 151,8, 1141,8, 137,0, 136,7, 134,4, 133,9, 131,3, 129,2, 101,8, 89,9, 83,5, 71,7, 68,5, 61,3, 61,2, 54,9, 27,5, 20,3; HRMS(TOF MS ES) Calc. para $C_{27}H_{33}N_3O_6Si\ Na^+$ 546,2036, encontrado 546,2029; MS (ES) *m/z* 524,1 $(M + H]^+$.

n) Preparación del Compuesto 16

A una solución en agitación del Compuesto 15 (3,30 g, 6,31 mmol) en THF (63 ml), se añadieron trietilamina (2,18 ml, 15,66 mmol) y trihidrofluoruro de trietilamina (5,10 ml, 31,31 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El disolvente se retiró a presión reducida para obtener un aceite y este residuo aceitoso se cargó sobre una columna de gel de sílice y se eluyó con de 5% MeOH y 1% de trietilamina en CH_2Cl_2 para producir el Compuesto 16 (1,53 g, 85%) en forma de un sólido de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,32 (s, 1H), 7,82 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,89 (s a, 1H), 5,62 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 5,45 (d, *J* = 4,35 Hz, 1H), 5,09 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 3,93 (s a, 1H), 3,79 (s, 1H), 3,70-3,57 (m, 2H), 3,48 (s, 3H), 3,41 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 2,78 (s a, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ 166,6, 151,9, 141,9, 101,9, 90,1, 83,4, 71,7, 68,6, 61,2, 58,8; HRMS (TOF MS ES) Calc. para $C_{11}H_{16}N_3O_6^+$ 286,1039, encontrado 286,1046; MS (ES) *m/z* 286 $[M + H]^+$.

o) Preparación del Compuesto 17

Se mezcló el Compuesto 16 (1,48 g, 5,19 mmol) con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (2,50 g, 7,38 mmol) y se secó sobre P_2O_5 a presión reducida durante una noche. Se disolvió la mezcla seca en piridina anhidra (14 ml) y se agitó la solución resultante a temperatura ambiente durante 8h en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se vertió en CH_2Cl_2 (150 ml) y se lavó de forma secuencial con $NaHCO_3$ acuoso (5% en peso, 150 ml) y salmuera (150 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 0-5% de MeOH en CH_2Cl_2 conteniendo un 1% de trietilamina para producir el Compuesto 17 (3,02 g, 99% de rendimiento) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,38 (s, 1H), 7,8) (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,41-7,25 (m, 9H), 6,91 (d, *J* = 8,5 Hz, 4H), 5,94 (s a, 1H), 5,59 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 5,41 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 4,15 (s a, 1H), 3,84 (s, 1H), 3,75 (s, 6H), 3,48 (s,

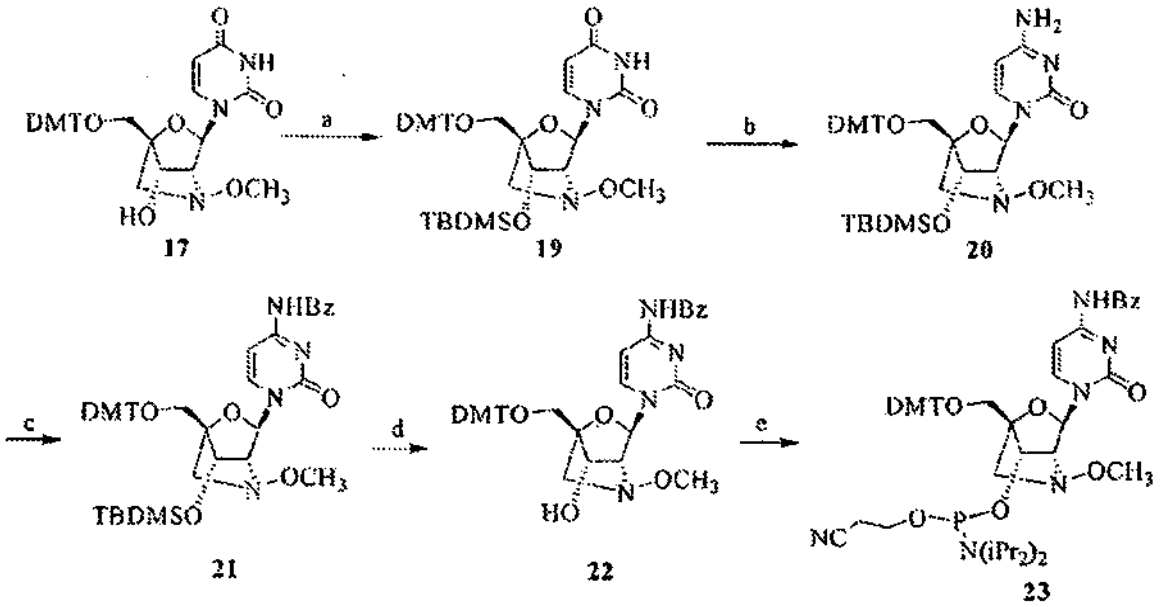
3H), 3,40-3,29 (m, 2H), 3,21 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 2,87 (s a, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ, 166,5, 160,4, 151,7, 150,2, 146,3, 141,9, 137,1, 136,8, 131,5, 129,5, 129,0, 128,2, 114,4, 101,9, 88,9, 88,1, 83,6, 72,2, 68,4, 61,2, 60,5, 55,9; HRMS (TOF MS ES) Calc. para $C_{32}H_{32}N_3O_8$ 586,2189, encontrado 586,2190; MS (ES) *m/z* 585,7 $[M - H]^-$.

p) Preparación del Compuesto 18

Una mezcla del Compuesto 17 (1,31 g, 2,22 mmol) y 1H-tetrazol (0,14 g, 2,00 mmol) se secó sobre P_2O_5 durante una noche a presión reducida. A la solución de la mezcla en DMF anhidra (5,44 ml), se añadieron fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo (1,03 ml, 3,25 mmol) y 1-metilimidazol (0,052 ml, 0,65 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (50 ml) y la fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ acuoso (5% en peso, 100 ml) y salmuera (60 ml), se secó (Na_2SO_4) y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:1 de acetato de etilo/hexano) para producir el Compuesto 18 (1,57 g, 89% de rendimiento) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{31}P (121 MHz, $CDCl_3$) δ 148,57, 48,00; HRMS (FAB) Calc. para $C_{41}H_{51}N_5O_9P^+$ 788,3424, encontrado 788,3428.

Ejemplo 2

Preparación del Compuesto 23 (Esquema 2)



Esquema 2. (a) DMF, imidazol, cloruro de *terc*-butildimetilsililo, ta, 86%; (b) i) 1,2,4-triazol, $POCl_3$, trietilamina, CH_3CN, 0 °C a ta, ii) amoniaco acuoso, dioxano; (c) anhídrido benzoico, DMF, ta, 98%; (d) trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina, THF, ta, 86%; (e) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF, 84%.

a) Preparación del Compuesto 19

A una solución del Compuesto 17 (1,4 g, 2,38 mmol) e imidazol (1,62 g, 23,8) en DMF anhidra (5,3 ml), se añadió cloruro de *terc*-butildimetilsililo (1,79 g, 11,90 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h en atmósfera de argón. La reacción se interrumpió con $NaHCO_3$ acuoso (60 ml) y se realizó la extracción con acetato de etilo (2 x 50 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la evaporación, el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 80% de acetato de etilo en hexano para producir el Compuesto 19 (1,43 g, 85,4%) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,39 (s, 1H), 7,89 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,39-7,251 (m, 9H), 6,91 (d, *J* = 8,9 Hz, 4H), 5,92 (s a, 1H), 5,44 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H) 4,27 (s, 1H), 3,86 (s, 1H), 3,74 (s, 6H), 3,45 (s, 3H), 3,32-3,29 (m, 2H), 3,22 (d, *J* = 11,7 Hz ,1H), 2,92 (s a, 1H) 0,71 (s, 9H), 0,03 (s, 3H), -0,06 (s, 3H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 163,7, 159,0, 149,9, 144,6, 140,4, 135,6, 135,5, 130,3, 128,3, 128,2, 127,3, 113,5, 101,7, 88,3, 86,8, 83,4, 71,7, 67,0, 61,0, 60,6, 58,9, 55,5, 25,7, 18,1, -4,6, -5,0; MS (ES) *m/z* 699,8 [M - H].

b) Preparación del Compuesto 20

Una suspensión de 1,2,4-triazol (4,65 g, 67,27 mmol) en CH_3CN anhidro (25,4 ml) se enfrió en un baño de hielo durante 5 a 10 min en atmósfera de argón. A esta suspensión fría, se añadió lentamente $POCl_3$ (1,47 ml, 60 mmol) durante 10 min y se continuó la agitación durante un período adicional de 5 min. Se añadió lentamente trietilamina

(11,00 ml, 79,20 mmol) durante 30 min, manteniendo la temperatura del baño alrededor de 0 - 2 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 - 2 °C durante un período adicional de 30 min. Se añadió el Compuesto 19 (1,39 g, 1,98 mmol) en CH_3CN anhidro (12,7 ml) en una porción y se agitó durante 10 minutos y la mezcla de reacción se retiró del baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h en atmósfera de argón. La mezcla se concentró hasta una tercera parte de su volumen, se diluyó con acetato de etilo (100 ml), y se lavó con agua (2 x 100 ml) y salmuera (100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en una solución de NH_3 acuoso (12,7 ml, 28-30% en peso) y dioxano (30,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche en un frasco de presión. El disolvente se retiró al vacío y el residuo resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 5% de MeOH en CH_2Cl_2 para producir el Compuesto 24 (1,32 g, 95%) en forma de una espuma de color blanco. MS (ES) *m/z* 699,9 $[M - H)^-$, HRMS (TOF ES MS) Calc. para $C_{38}H_{49}N_4O_7Si^+$701,3356, encontrado 701,3356.

c) Preparación del Compuesto 21

Se disolvió el Compuesto 20 (1,34 g, 1,9.1 mmol) en DMF anhidra (5 ml) y se añadió anhídrido benzoico (0,65 g, 2,88 mmol) con agitación a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (100 ml). La fase orgánica resultante se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2 x 100 ml) y salmuera (100 ml). La fase de acetato de etilo se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 80% de acetato de etilo en hexano para producir el Compuesto 21 (1,52 g, 99%) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,33 (s, 1H), 8,43 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H) 8,02 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,65-7,24 (m, 13H), 6,92 (d, *J* = 8,7 Hz, 4H), 6,02 (s a, 1H), 4,31 (s, 1H), 3,98 (s, 1H), 3,76 (s, 6H), 3,50 (s, 3H), 3,39-3,25 (m, 3H), 2,96 (s a, 1H) 0,70 (s, 9H), -0,01 (s, 3H), -0,09 (s, 3H); RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3CN) δ 168,4, 164,0, 160,0, 155,4, 146,0, 145,6, 136,8, 136,6, 134,6, 134,0, 131,2, 130,7, 129,7, 129,6, 129,0, 128,2, 114,3, 97,0, 88,9, 87,4, 84,6, 72,6, 67,2, 61,7, 61,3, 60,1, 56,0, 26,1, 18,6, -4,3, - 4,7; MS (ES) *m/z* 802,9 $[M - H]^-$.

d) Preparación del Compuesto 22

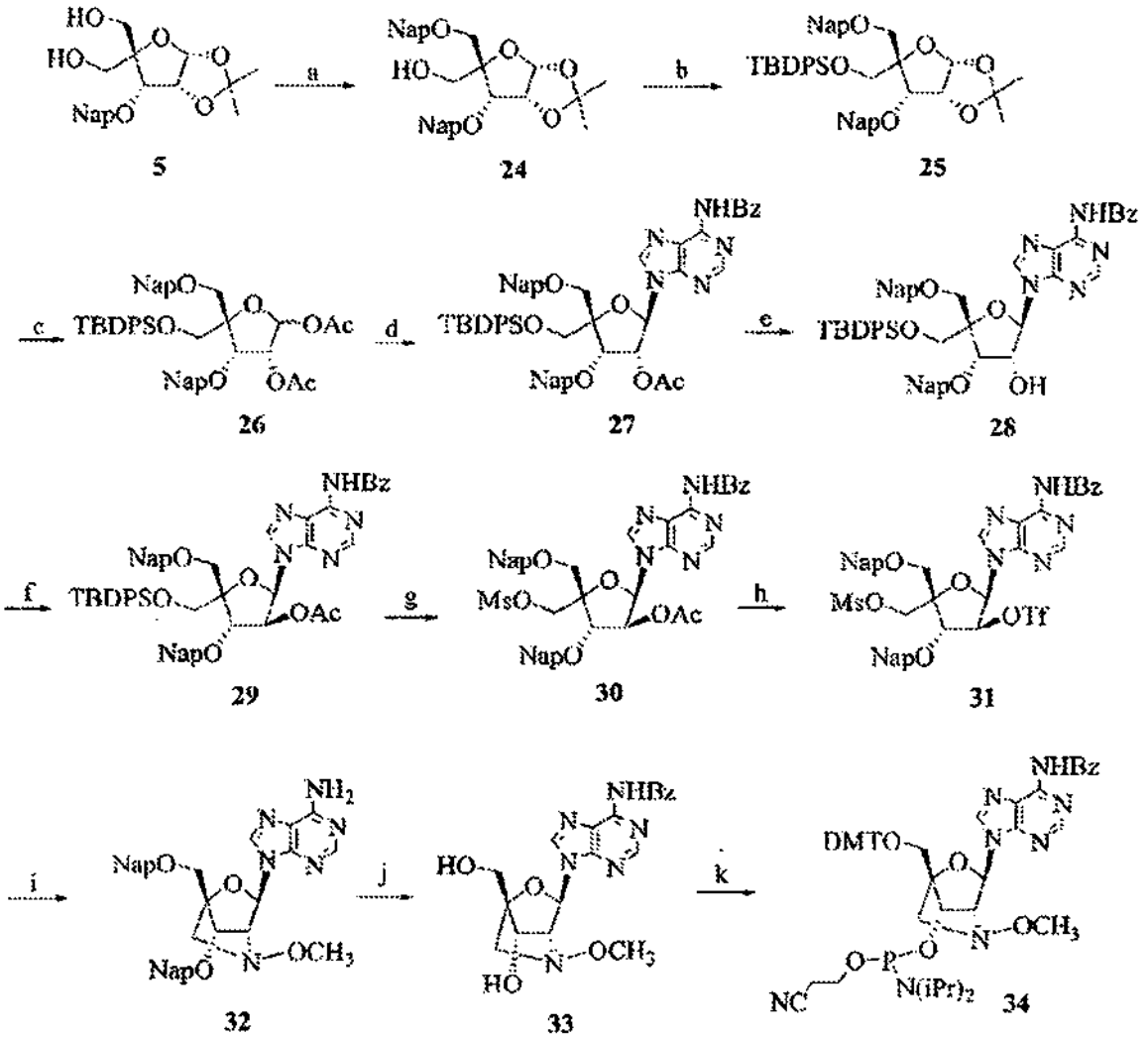
En un matraz de fondo redondo de 100 ml, se disolvió trihidrofluoruro de trietilamina (1,52 ml, 9,33 mmol) en THF anhidro (18,7 ml). Se añadió trietilamina (0,65 ml, 4,67 mmol) a esta solución, y la mezcla se vertió rápidamente sobre el Compuesto 21 (1,5 g, 1,87 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. La mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (50 ml). La fase orgánica se lavó de forma secuencial con agua (50 ml), $NaHCO_3$ acuoso al 5% (50 ml) y salmuera (50 ml). La fase de acetato de etilo se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró al vacío a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 50% de acetato de etilo en hexano para proporcionar el Compuesto 22 (1,17 g, 86%) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,32 (s, 1H), 8,36 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H) 8,02 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,66-7,25 (m, 13H), 6,93 (d, *J* = 8,9 Hz, 4H), 6,05 (s a, 1H), 5,61 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H), 4,20 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 3,96 (s, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,53 (s, 3H), 3,43-3,23 (m, 3H), 2,90 (s a, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3CN) δ 168,0, 163,7, 159,6, 155,3, 145,8, 145,5, 136,8, 136,5, 134,3, 133,7, 130,9, 130,8, 129,5, 129,0, 128,9, 128,8, 127,9, 114,0, 96,7, 88,4, 87,2, 84,0, 71,8, 67,1, 61,1, 60,8, 60,0, 55,8; MS (ES) *m/z* 691,2 $[M+H]^+$, HRMS (TOF ES MS) Calc. para $C_{39}H_{38}N_4O_8Na^+$ 713,2587, encontrado 713,2573.

e) Preparación del Compuesto 23

Una mezcla del Compuesto 22 (1,08 g, 1,57 mmol) y 1H-tetrazol (0,1 g, 1,4 mmol) se secó sobre P_2O_5 durante una noche a presión reducida. A la solución de la mezcla en DMF anhidra (4,3 ml), se añadieron fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo (0,75 ml, 2,35 mmol) y 1-metilimidazol (0,032 ml, 0,47 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (40 ml) y la fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ acuoso (5% en peso, 100 ml) y salmuera (50 ml), se secó (Na_2SO_4) y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:1 de acetato de etilo/hexano) para producir el Compuesto 23 (1,17 g, 84% de rendimiento) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{31}P (121 MHz, $CDCl_3$) δ 149,91, 149,00; HRMS (TOF MS ES) Calc. para $C_{48}H_{56}N_6O_6P^+$ 891,3846, encontrado 891,3832.

Ejemplo 3

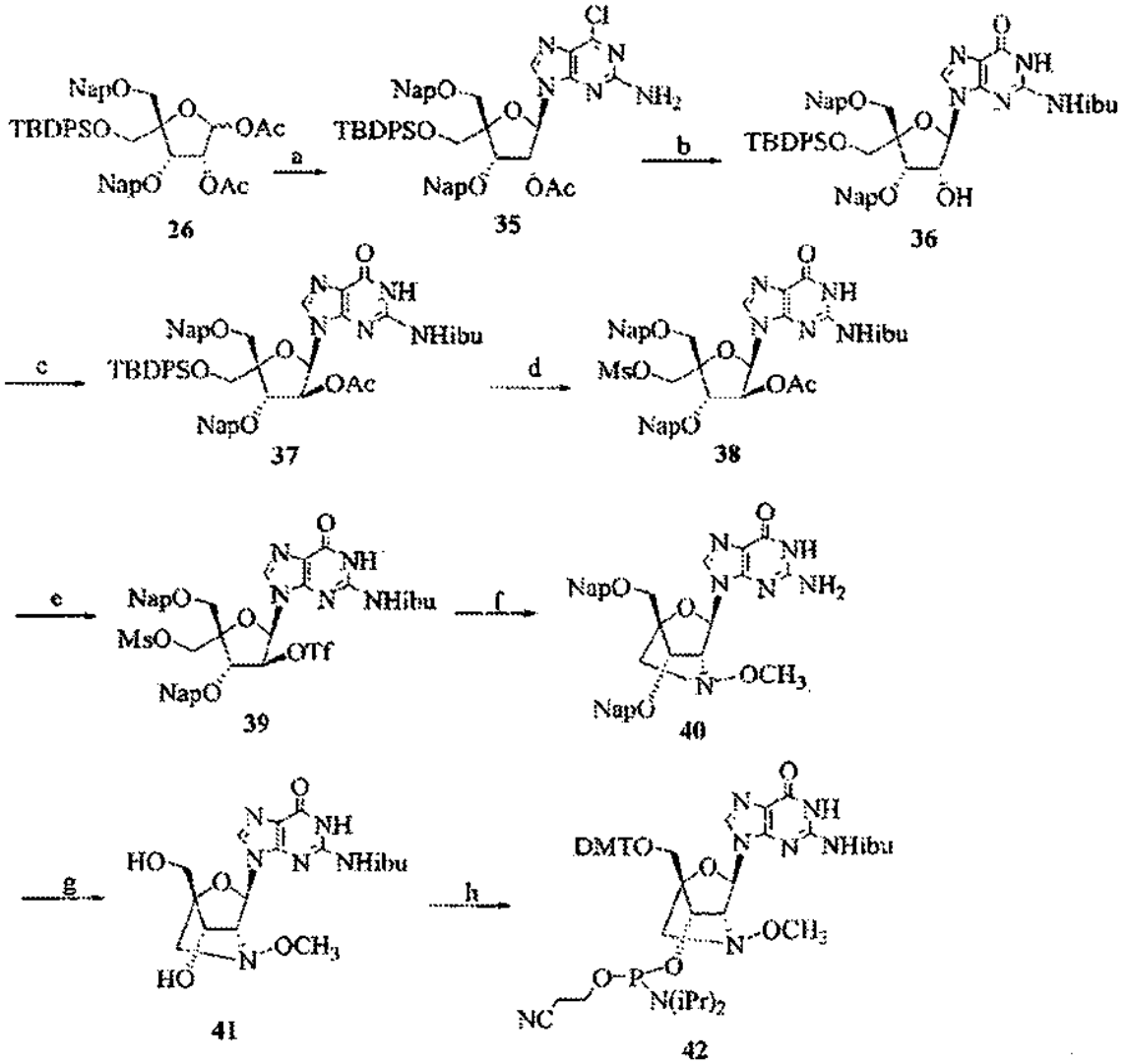
Preparación del Compuesto 34 (Esquema 3)



Esquema 3. (a) NaH, DMF, 2-(bromometil)-naftaleno; (b) cloruro de *terc*-butildifenilsililo, imidazol, DMF; (c) Ac_2O, AcOH, H_2SO_4; (d) 6-*N*-benzoiladenina, $SnCl_4$, CH_3CN, ta; (e) NH_3 7 M en MeOH, 0 °C: (f) i) Tf_2O, DMAP, CH_2Cl_2, -30 a -10 °C ii) KOAc, 18-corona-6, tolueno, 80 °C; (g) i) TEA.3HF, TEA, THF ii) MsCl, Et_3N, DMAP, CH_2Cl_2, ta; (h) i) NH_3 7 M en MeOH, 0 °C ii) Tf_2O, DMAP, CH_2Cl_2, -30 a -10 °C (i) *N*-metoxiamina , DMF, iPr_2NEt, 60 °C (j) i) benzoil tetrazol, DMF, 40 °C; ii) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O; (k) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 4

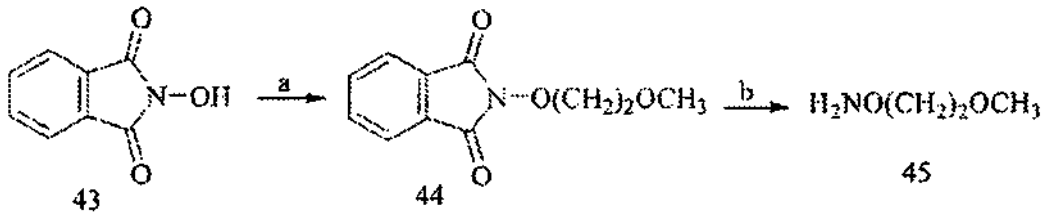
Preparación del Compuesto 42 (Esquema 4)



Esquema 4. (a) 2-amino-6-cloropurina, *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida, Triflato de TMS, 1,2-dicloroetano; (b) i) $HOCH_2CH_2CN$, NaH ii) TMSCl, Piridina, cloruro de isobutirilo, amoniaco, H_2O; (c) i) Tf_2O, DMAP, CH_2Cl_2, -30 a -10 °C ii) KOAc, 18-corona-6, tolueno, 80 °C (d) i) TEA.3HF, TEA, THF ii) MsCl, Et_3N, DMAP, CH_2Cl_2, ta; (e) i) NH_3 7 M en MeOH, 0 °C ii) Tf_2O, DMAP, CH_2Cl_2, -30 a -10 °C (f) *N*-metoxiamina, DMF, iPr_2NEt, 60 °C (g) Piridina, cloruro de isobutirilo, ta; ii) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O; (g) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 5

Preparación del Compuesto 45 (Esquema 5)



Esquema 5- Etapa a DBU, CH_3CN, bromuro de (2-metoxi)etilo, ta; etapa b *N*-metilhidrazina, CH_2Cl_2, -10 °C.

a) Preparación del Compuesto 44

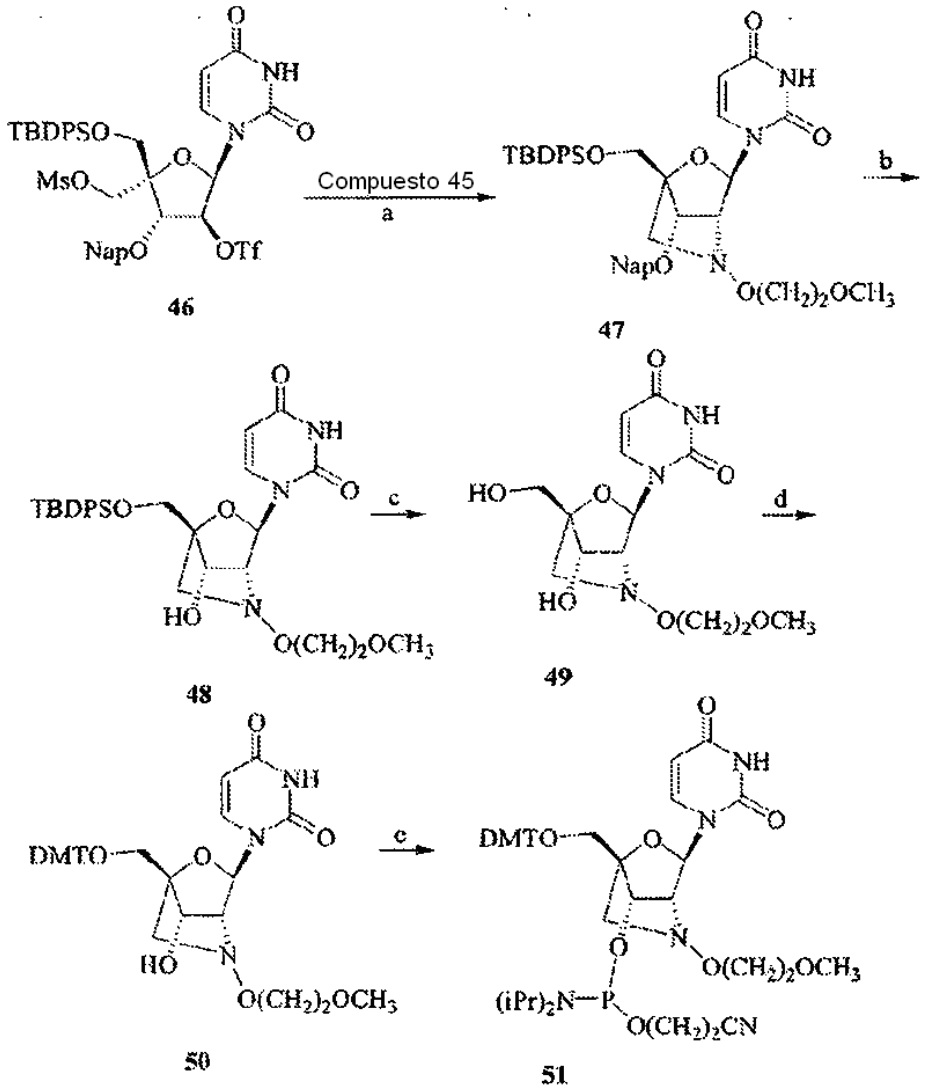
Se disolvió el Compuesto 43 (13,15 g, 96,60 mmol) en acetonitrilo anhidro (40 ml) y se añadió 1,8-diazabiciclo[5,4.0]undec-7-eno (21,7 ml, 145,00 mmol). Después de 5 minutos se añadió 2-(bromo)etil metil éter (13,63 ml, 145 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se retiró el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice mediante la elución con 30% de acetato de etilo en hexano para producir el Compuesto 44 (110,23 g, 48%) en forma de un sólido de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,86-7,73 (m, 4H), 4,37 (m, 2H), 4,76 (m, 2H), 3,39 (s, 3H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 163,6, 134,6, 129,1, 123,6, 77,2, 70,6, 59,2; ES MS *m/z* 222,0 $[M + H]^-$.

b) Preparación del Compuesto 45

Se disolvió el Compuesto 44 (9,2 g, 41,60 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml) con refrigeración a -10 °C y se añadió *N*-metilhidrazina (2,94 ml, 55,20 mmol) con agitación durante 2 horas manteniendo la temperatura a -10 °C. El precipitado formado se filtró y el disolvente se concentró a presión reducida para producir el Compuesto 45 (2,93 g, 77%) en forma de un aceite incoloro. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3,83 (m, 2H), 3,57 (m, 2H), 3,39 (s, 3H); RMN ^{13}C RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 74,5, 70,7, 59,3.

Ejemplo 6

Preparación del Compuesto (Esquema 6)



Esquema 6. (a) *N*-(2-metoxi)etoxiamina 3, DMA, *i*Pr_2NEt, 60 °C, 18 h, 64%; (b) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O, 18 h, ta, 98%; (c) TEA.3HF, TEA, THF, 92%; (d) DMTCl, Py, ta, 90%; (e) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF, 82%.

a) Preparación del Compuesto 47

Se añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (4,02 ml, 23,20 mmol) y *N*-(2-metoxi)etoxiamina (Compuesto 45, 2,11 g, 23,20 mmol) al Compuesto 46 (2,00 g, 2,32 mmol) disuelto en *N,N*-dimetilacetamida anhidra (DMA, 3,3 ml) en un frasco de presión. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 18 horas y se vertió en acetato de etilo (50 ml) y se lavó de forma secuencial con $NaHCO_3$ anhidro (5% en peso, 2 x 50 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (1:1 de hexanos : EtOAc) para producir el Compuesto 47 (1,04 g, 64% de rendimiento) en forma de una espuma. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,38 (s, 1H), 7,93-7,81 (m, 4H), 7,72 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,62-7,31 (m, 14H), 5,98 (s a, 1H), 5,16 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,86-4,68 (m, 2H), 4,26 (s, 1H), 4,16 (s, 1H), 3,96-3,76 (m, 4H), 3,66-3,40 (m, 3H), 3,26 (s, 3H), 3,0 (s a, 1H), 0,95 (s, 9H); MS (ES) *m/z* 708,3 $[M + H]^+$

b) Preparación del Compuesto 48

A una solución del Compuesto 47 (0,6 g, 0,85 mmol) en diclorometano (9,2 ml) se añadió agua (0,04 ml, 2,22 mmol) y 2,4-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (1,11 g, 4,87 mmol). La solución de color marrón oscuro se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, se diluyó con acetato de etilo (60 ml) y se lavó de forma secuencial con $NaHCO_3$ acuoso (5% en peso, 2 x 60 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice mediante la elución con 5% de MeOH y 0,5% de trietilamina en CH_2Cl_2 para producir el Compuesto 48 (0,47 g, 98% de rendimiento) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,38 (s, 1H), 7,79 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,70-7,60 (m, 4H), 7,48-7,41 (m, 6H), 5,97 (s a, 1H), 5,60 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 5,29 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,08 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 3,89 (s a, 2H), 3,81-3,74 (m, 3H), 3,63-3,42 (m, 3H), 3,28 (s, 3H) 2,91 (s a, 1H), 1,04 (s, 9H); MS (ES) *m/z* 568,2 $[M+H]^+$.

c) Preparación del Compuesto 49

A una solución en agitación del Compuesto 48 (0,46 g, 0,82 mmol) en THF (63 ml) se añadió trietilamina (0,28 ml, 2,03 mmol) y trihidrofluoruro de trietilamina (0,66 ml, 4,05 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se evaporó a presión reducida para obtener un aceite. El aceite se cargó sobre una columna de gel de sílice y se eluyó con 5% de MeOH y 1% de trietilamina en CH_2Cl_2 para producir el Compuesto 49 (0,26 g, 99%) en forma de un sólido de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,29 (s, 1H), 7,82 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,90 (s a, 1H), 5,61 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,44 (s a, 1H), 5,09 (s a, 1H), 3,93 (s a, 1H), 3,83-3,72 (m, 3H), 3,64 (d, *J* = 4,1 Hz, 2H), 3,58-3,39 (m, 3H), 3,31 (s, 3H), 2,85 (s a, 1H); MS (ES) *m/z* 330,1 $[M+ H]^+$.

d) Preparación del Compuesto 50

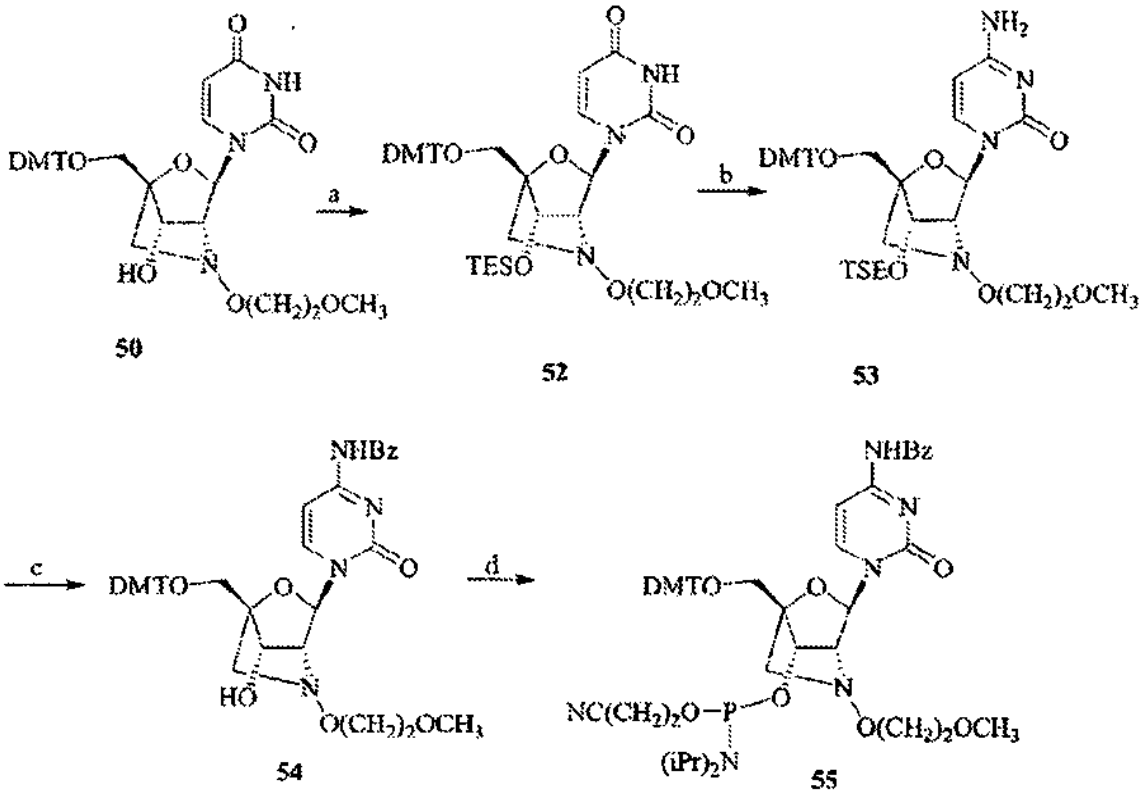
Una mezcla del Compuesto 49 (0,21 g, 0,64 mmol) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,31 g, 0,92 mmol) se secó sobre P_2O_5 a presión reducida durante una noche y a continuación se disolvió en piridina anhidra (1,8 ml) con agitación a temperatura ambiente durante 6 horas en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se vertió en CH_2Cl_2 (30 ml) y se lavó de forma secuencial con $NaHCO_3$ anhidro (5% en peso, 30 ml) y salmuera (30 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se evaporó. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice mediante la elución con 0-5% de MeOH en CH_2Cl_2 que contenía un 1% de trietilamina para producir el Compuesto 50 (0,36 g, 90% de rendimiento) en forma de una espuma. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,36 (s, 1H), 7,81 (d, *J* =8,1 Hz, 1H), 7,51-7,12 (m, 9H), 6,91 (d, *J* = 8,5 Hz, 4H), 5,95 (s a, 1H), 5,57 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 5,41 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H) 4,13 (s a, 1H), 3,81-3,78 (m, 3H), 3,75 (s, 6H), 3,58-3,43 (m, 2H), 3,40-3,20 (m, 3H), 3,26 (s, 3H), 2,87 (s a, 1H); MS (ES) *m/z* 632,2 $[M + H]^+$.

e) Preparación del Compuesto 51

Una mezcla del Compuesto 50 (0,12 g, 0,19 mmol) y 1H-tetrazol (0,012 g, 0,17 mmol) se secó sobre P_2O_5 durante una noche a presión reducida. La mezcla seca se disolvió en DMF anhidra (0,53 ml) y se añadieron fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo (0,09 ml, 0,29 mmol) y 1-metilimidazol (0,005 ml, 0,06 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (30 ml) y la fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ acuoso (5% en peso, 30 ml) y salmuera (30 ml), se secó (Na_2SO_4) y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:1 de acetato de etilo/hexano) para producir el Compuesto 51 (0,13 g, 82% de rendimiento) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{31}P (121 MHz, $CDCl_3$) δ 149,10, 148,10; MS (FAB) *m/z* 832,4 $[M + H]^+$.

Ejemplo 7

Preparación del Compuesto 55 (Esquema 7)



Esquema 7. (a) DMF, imidazol, cloruro de trietilsililo, ta, y 92%; (b) i) 1,2,4-triazol, $POCl_3$, trietilamina, CH_3CN, 0 °C a ta, ii) NH_3 acuoso, dioxano; (c) anhídrido benzoico, DMF, ta, 98%; (d) trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina, THF, ta, 82%; (e) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

a) Preparación del Compuesto 52

A una solución del Compuesto 50 (0,15 g, 0,24 mmol) e imidazol (0,07 g, 0,96) en DMF anhidra (0,6 ml) se añadió cloruro de trietilsililo (0,08 ml, 0,48 mmol) y la mezcla estuvo a temperatura ambiente durante 6 horas en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se inactivó con $NaHCO_3$ acuoso (20 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (200 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la evaporación, el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y eluyendo con 0~5% de MeOH y 1% de trietilamina en CH_2Cl_2 para producir el Compuesto 52 (0,17 g, 92%) en forma de una espuma de color blanco. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,36 (s, 1H), 7,90 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,50-7,11 (m, 9H), 6,90 (d, *J* = 10,3 Hz, 4H), 5,96 (s a, 1H), 5,45 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H) 4,25 (s, 1H), 3,83 (s, 1H), 3,81-3,74 (m, 2H), 3,74 (s, 6H), 3,55-3,42 (m, 2H), 3,40-3,20 (m, 3H), 3,25 (s, 3H), 2,89 (s a, 1H), 0,89-0,76 (m, 9H), 0,60-0,31 (m, 6H); MS (ES) *m/z* 746,3 $[M+H]^+$.

b) Preparación del Compuesto 53

Una suspensión de 1,2,4-triazol (0,64 g, 9,27 mmol) en CH_3CN anhidro (3,6 ml) se enfrió en un baño de hielo durante 5 a 10 minutos en atmósfera de argón. A esta suspensión fría, se añadió lentamente $POCl_3$ (0,20 ml, 2,16 mmol) con agitación continua durante un período adicional de 15 minutos. Se añadió lentamente trietilamina (1,51 ml, 10,84 mmol) manteniendo la mezcla de reacción a 0 - 2 °C con agitación durante un período adicional de 30 minutos tras la adición. Se añadió en una porción el Compuesto 52 (0,20 g, 0,27 mmol) en CH_3CN anhidro (1,8 ml) y se agitó durante 10 minutos con agitación continua en atmósfera de argón durante 3 horas tras la retirada del baño de hielo. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (30 ml), y se lavó con agua (2 x 30 ml) y salmuera (30 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo que se disolvió en una solución de NH_3 acuoso (1,55 ml, 28-30% en peso) y dioxano (3,9 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche en un frasco de presión. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice (5% de MeOH y 1% de trietilamina en CH_2Cl_2) para producir el Compuesto 53 (0,17 g, 82%) en forma de una espuma de color blanco. MS (ES) *m/z* 745,3 $[M + H]^+$

c) Preparación del Compuesto 54

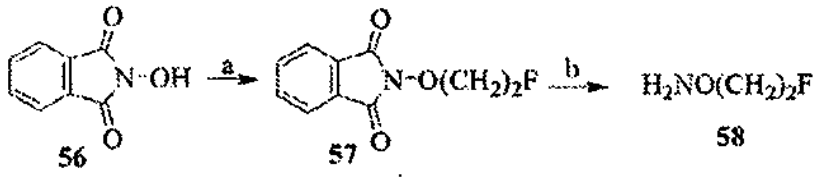
Se disolvió el Compuesto 53 (0,16 g, 0,22 mmol) en DMF anhidra (0,6 ml) y se añadió anhídrido benzoico (0,08 g, 0,35 mmol) con agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (40 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2 x 30 ml) y salmuera (30 ml). La fase de acetato de etilo se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Se añadió al residuo una solución de trihidrofluoruro de trietilamina (0,18 ml, 1,08 mmol) y trietilamina (0,08 ml, 0,57 mmol) en THF anhidro (2,2 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se vertió en acetato de etilo (30 ml). La fase orgánica se lavó de forma secuencial con agua (30 ml), $NaHCO_3$ acuoso al 5% (30 ml) y salmuera (30 ml). La fase de acetato de etilo se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (5% de MeOH y 1% de trietilamina en CH_2Cl_2) para proporcionar el Compuesto 54 (0,14 g, 89%) como una forma. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11,31 (s, 1H), 8,36 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H) 8,02 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,87 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 7,66-7,26 (m, 13H), 6,94 (d, *J* = 8,9 Hz, 4H), 6,03 (s a, 1H), 5,59 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,18 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 3,92 (s, 1H), 3,86-3,68 (m, 2H), 3,77 (s, 6H), 3,61-3,47 (m, 2H), 3,45-3,23 (m, 2H), 3,27 (s, 3H), 2,94 (s a, 1H); MS (ES) *m/z* 735,3 $[M + H]^+$.

d) Preparación del Compuesto 55

Una mezcla del Compuesto 54 (0,13 g. 0,17 mmol) y 1H-tetrazol (0,0 1 g, 0,15 mmol) se secó durante una noche a presión reducida sobre P_2O_5. La mezcla seca se disolvió en DMF anhidra (0,5 ml) y se añadieron fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo (0,08 ml, 0,26 mmol) y 1-metilimidazol (0,004 ml, 0,05 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (20 ml) y la fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ acuoso (5% en peso, 20 ml) y salmuera (20 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró en a presión reducida. El material en bruto se purifica.

Ejemplo 8

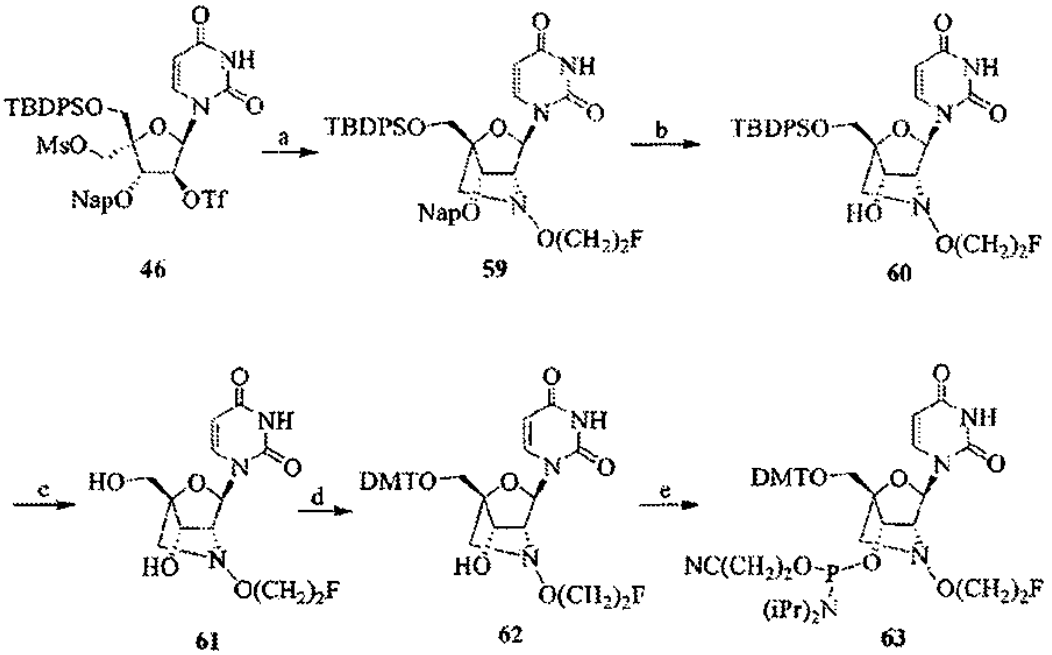
Preparación del Compuesto 58 (Esquema 8)



Esquema 8. (a) Ph_3P, THF, (2-fluoro)etanol, DEAD, ta; (b) *N*-metilhidrazina, CH_2Cl_2, -10 °C.

Ejemplo 9

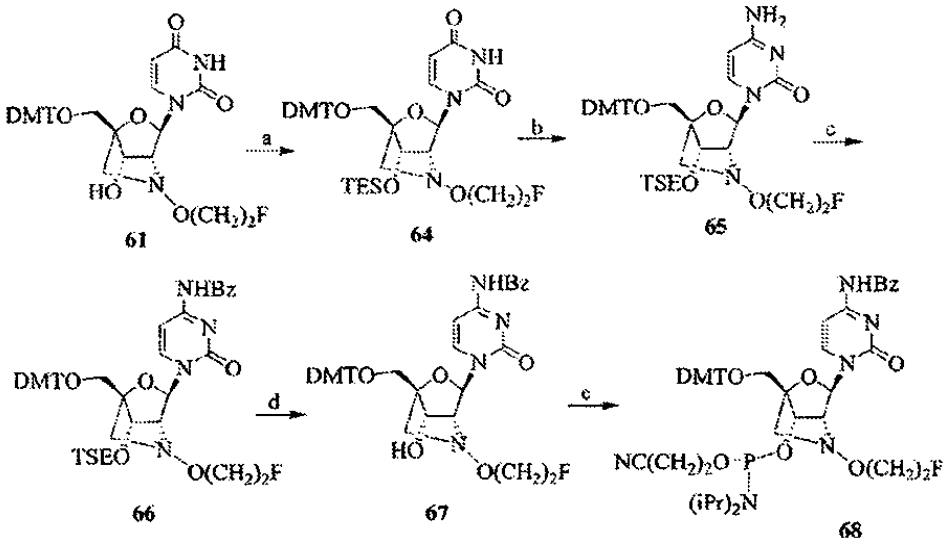
Preparación del Compuesto 63 (Esquema 9)



Esquema 9. (a) *N*-(2-fluoroetoxi)amina (Compuesto 58), DMA, *i*Pr_2NEt, 60 °C, 18 h; (b) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O, 18 h, ta; (c) TEA.3HF, TEA, THF; (d) DMTCl, piridina, ta; (e) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 10

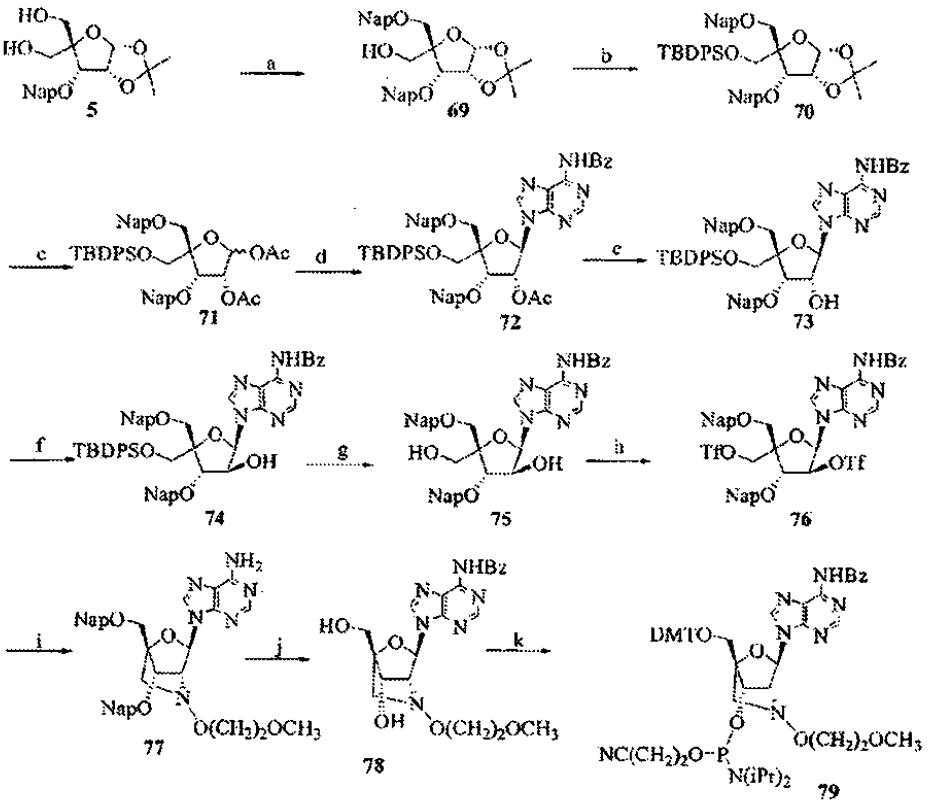
Preparación del Compuesto 68 (Esquema 10)



Esquema 10. (a) DMF, imidazol, cloruro de trietilsililo, ta; (b) i) 1,2,4-triazol, $POCl_3$, trietilamina, CH_3CN, 0 °C a ta, ii) NH_3 acuoso, dioxano; (c) anhídrido benzoico, DMF, ta; (d) trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina, THF, ta; (e) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 11

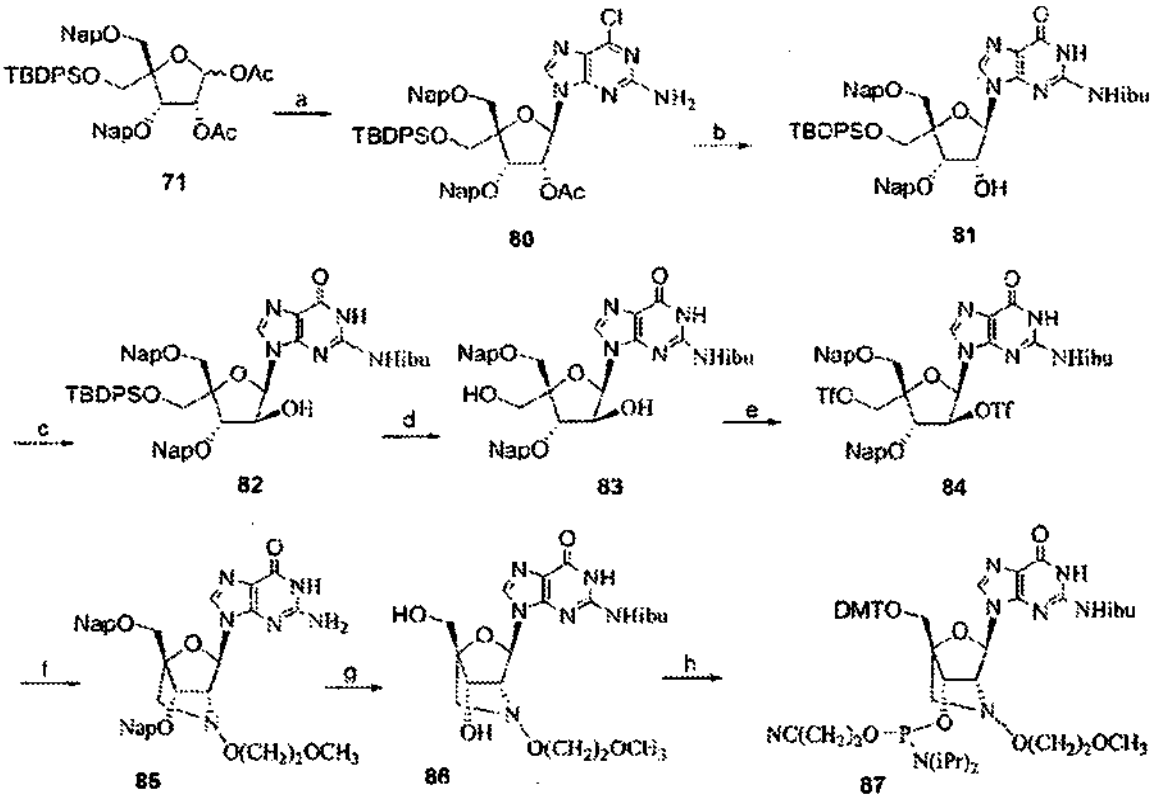
Preparación del Compuesto 79 (Esquema 11)



Esquema 11. (a) NaH, DMF, 2-(bromometil)-naftaleno; (b) cloruro de *terc*-butildifenilsililo, imidazol, DMF; (c) Ac_2O, AcOH, H_2SO_4; (d) 6-*N*-benzoiladenina, $SnCl_4$, CH_3CN, ta; (e) NH_3 7 M en MeOH, 0 °C; (f) i) DMSO, cloruro de oxalilo, TEA, -78 °C ii) $NaBH_4$; (g) i) TEA.3HF, TEA, THF (h) Tf_2O, DMAP, CH_2Cl_2, -30 a -10 °C (i) *N*-(2-metoxi)etoxiamina 3, DMF, *i*Pr_2NEt, 60 °C (j) i) benzoil tetrazol, DMF, 40 °C; ii) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O; (k) i) DMTCl, piridina, ta, ii) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 12

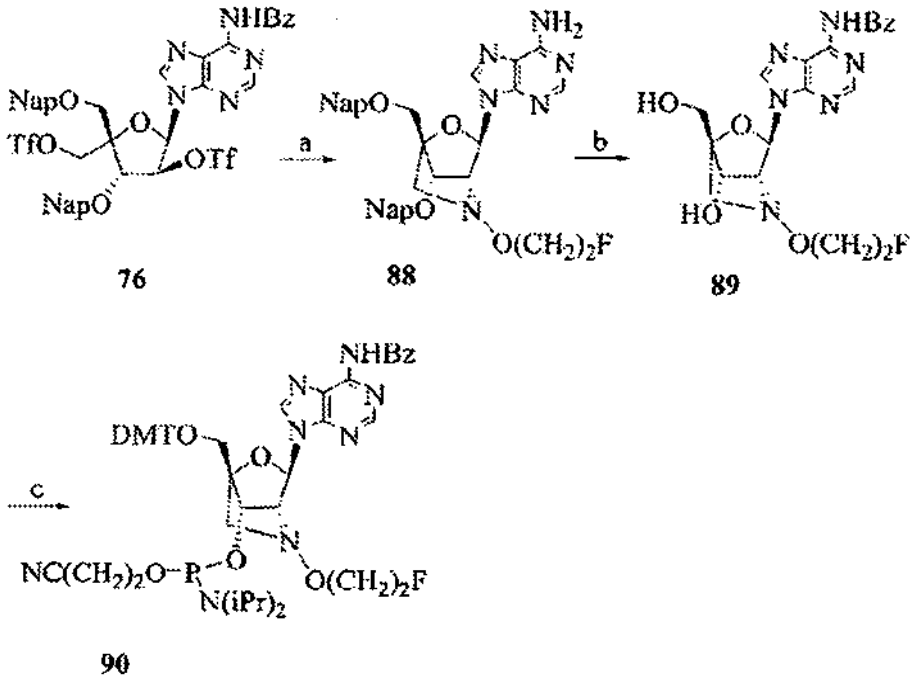
Preparación del Compuesto 87 (Esquema 12)



Esquema 12. (a) 2-amino-6-cloropurina) *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida, Triflato de TMS, 1,2-dicloroetano; (b) i) NaOH 1 N, 1,4-dioxano, 55 °C. ii) TMSCl, Piridina, cloruro de isobutirilo, amoniaco, H_2O; (c) i) DMSO, cloruro de oxalilo, TEA, -78 °C, ii) $NaBH_4$ (d) TEA.3HF, TEA, THF; (e) Tf_2O, DMAP, CH_2Cl_2, -30 a -10 °C (f) *N*-(2-metoxi)etoxiamina 3 , DMA, *i*Pr_2NEt, 60 °C (g) i) piridina, cloruro de isobutirilo, ta ii) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O; (h) i) DMTCl, piridina ii) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 13

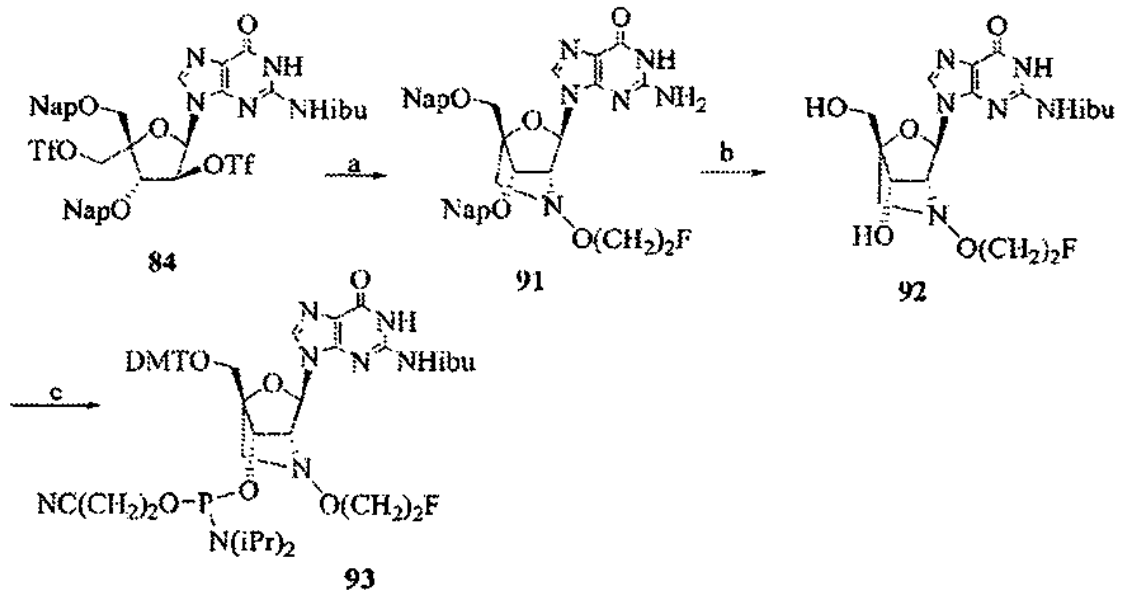
Preparación del Compuesto 90 (Esquema 13)



Esquema 13. (a) *N*-(2-metoxi)etoxiamina **16**, DMA, *i*Pr_2NEt, 60 °C (h) i) benzoil tetrazol, DMF, 40 °C; ii) DDQ, CH_2Cl_2, H_20; (c) i) DMTCl, piridina, ta, ii) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 14

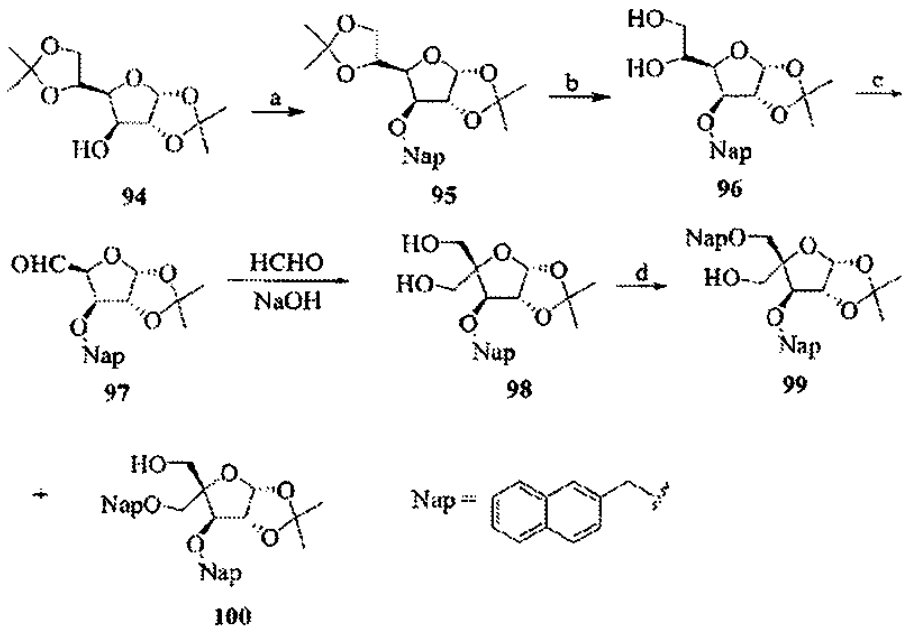
Preparación del Compuesto 93 (Esquema 14)



Esquema 14. (a) *N*-2-(fluoro)etoxiamina **16** , DMA, *i*Pr_2NEt, 60 °C (b) i) Piridina, cloruro de isobutirilo, ta; ii) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O; (c) i) DMTCl, piridina, ii) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 15

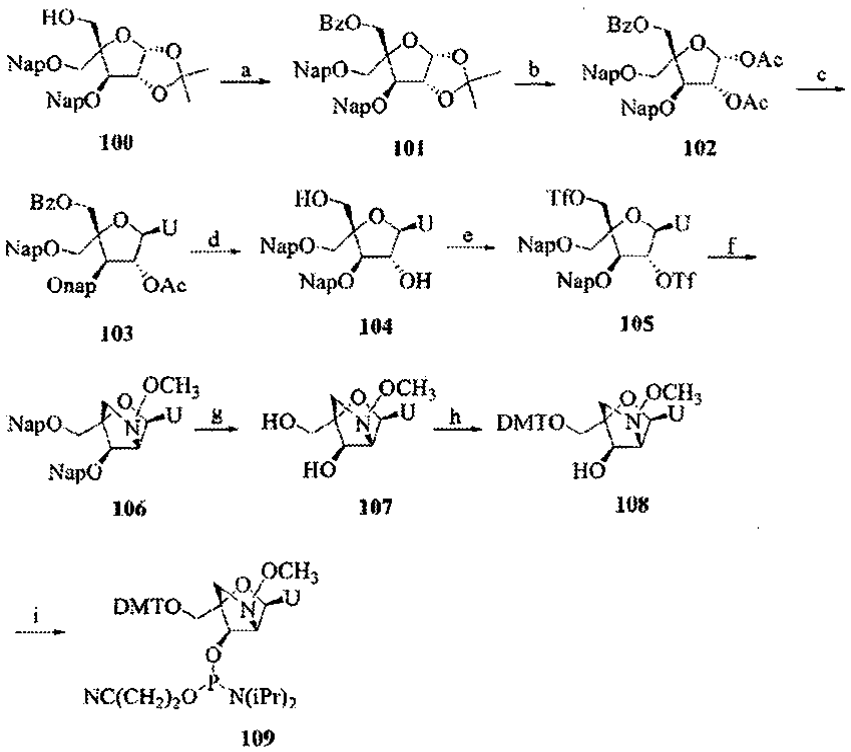
Preparación del Compuesto 100 (Esquema 15)



Esquema 15. (a) NaH, DMF, 2-(Bromometil)naftaleno; (b) AcOH, H_2O; (c) $NaIO_4$, dioxano, H_2O; (c) HCHO, NaOH; (d) NaH, DMF, 2-(Bromometil)naftaleno (el Compuesto 51 es un azúcar disponible en el mercado, 1,2:5,6-Di-O-alfa-D-glucofuranosa).

Ejemplo 16

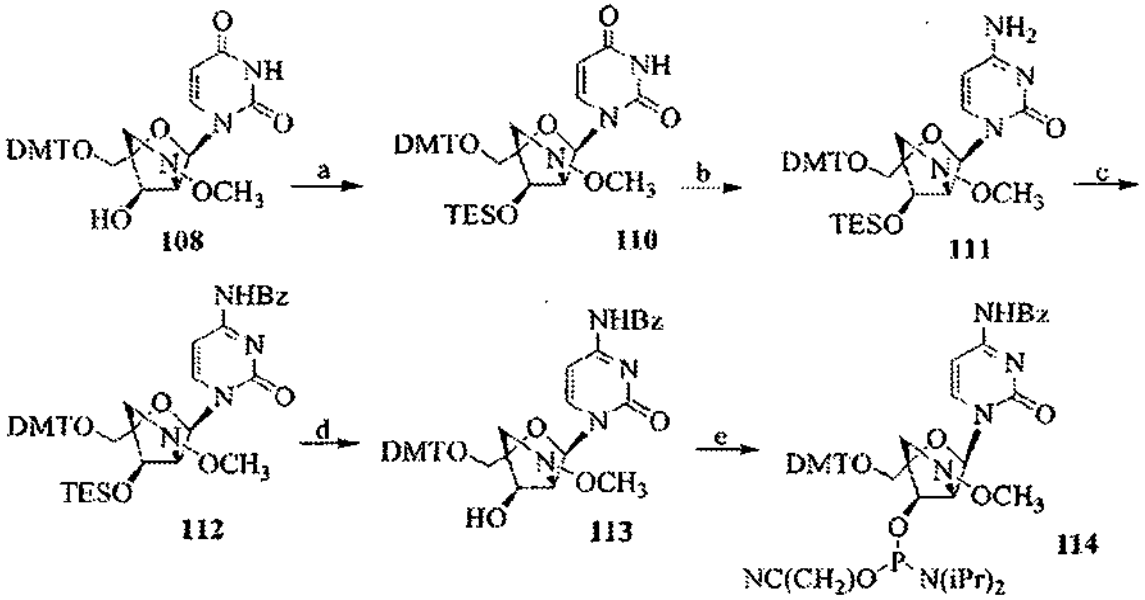
Preparación del Compuesto 109 (Esquema 16)



Esquema 16. (a) Bz_2O, piridina, ta; (b) anhídrido acético, ácido acético, H_2SO_4; (c) uracilo, BSA, TMSOTf; CH_3CN, reflujo, 2 h (d) MeOH, NH_3, ta; (e) anhídrido trifluorometanosulfónico, CH_2Cl_2, DMAP, -10 °C; (t) *N*-metoxiamina, DMA, *i*Pr_2NEt 60 °C, 18 h; (g) DDQ, H_2O, CH_2Cl_2; (h) DMTCl, piridina, ta; (i) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 17

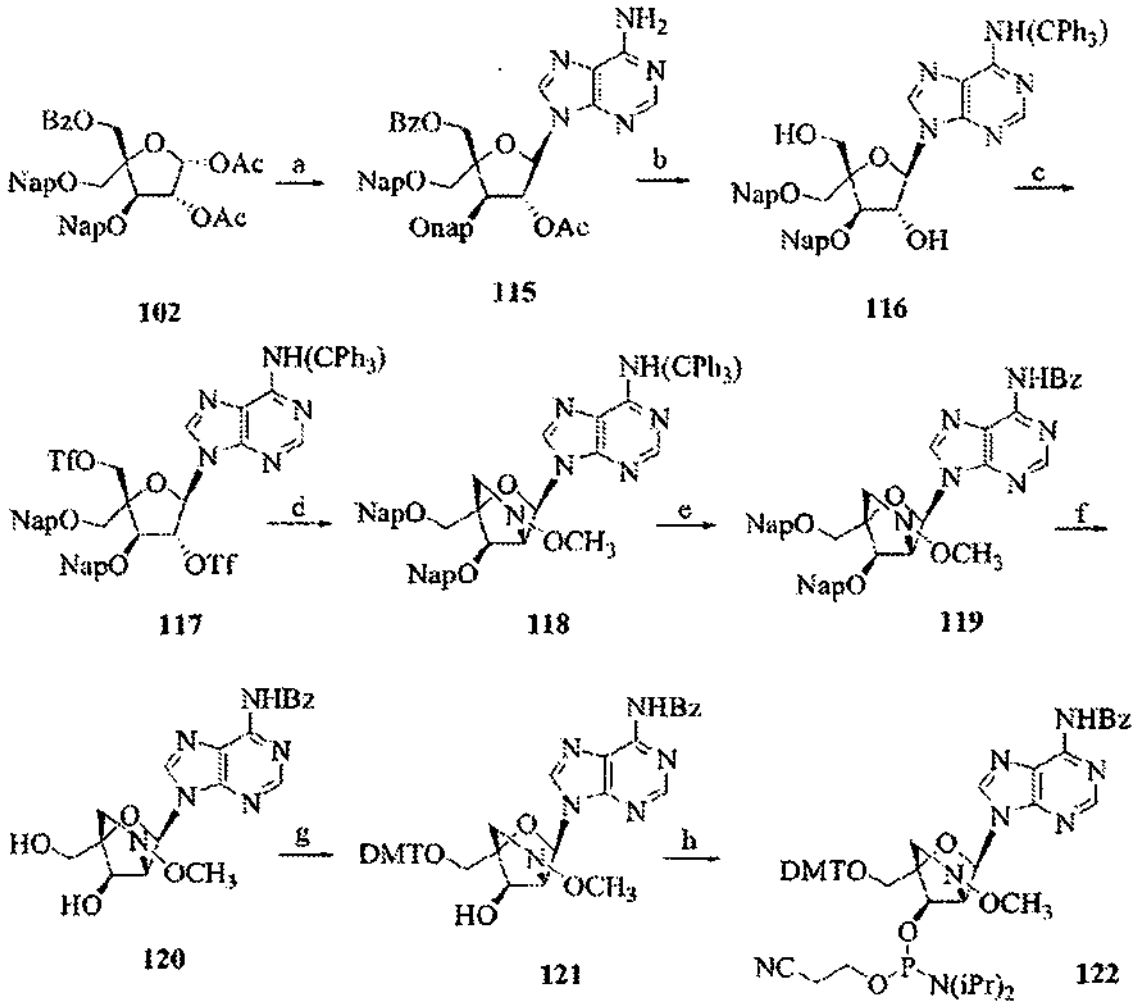
Preparación del Compuesto 114 (Esquema 17)



Esquema 17. (a) DMF, imidazol, cloruro de trietilsililo, ta; (b) i) 1,2,4-triazol, $POCl_3$, trietilamina, CH_3CN, 0 °C a ta, ii) NH_3 acuoso, dioxano: (c) anhídrido benzoico, DMF, ta; (d) trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina, TMF, ta; (c) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 18

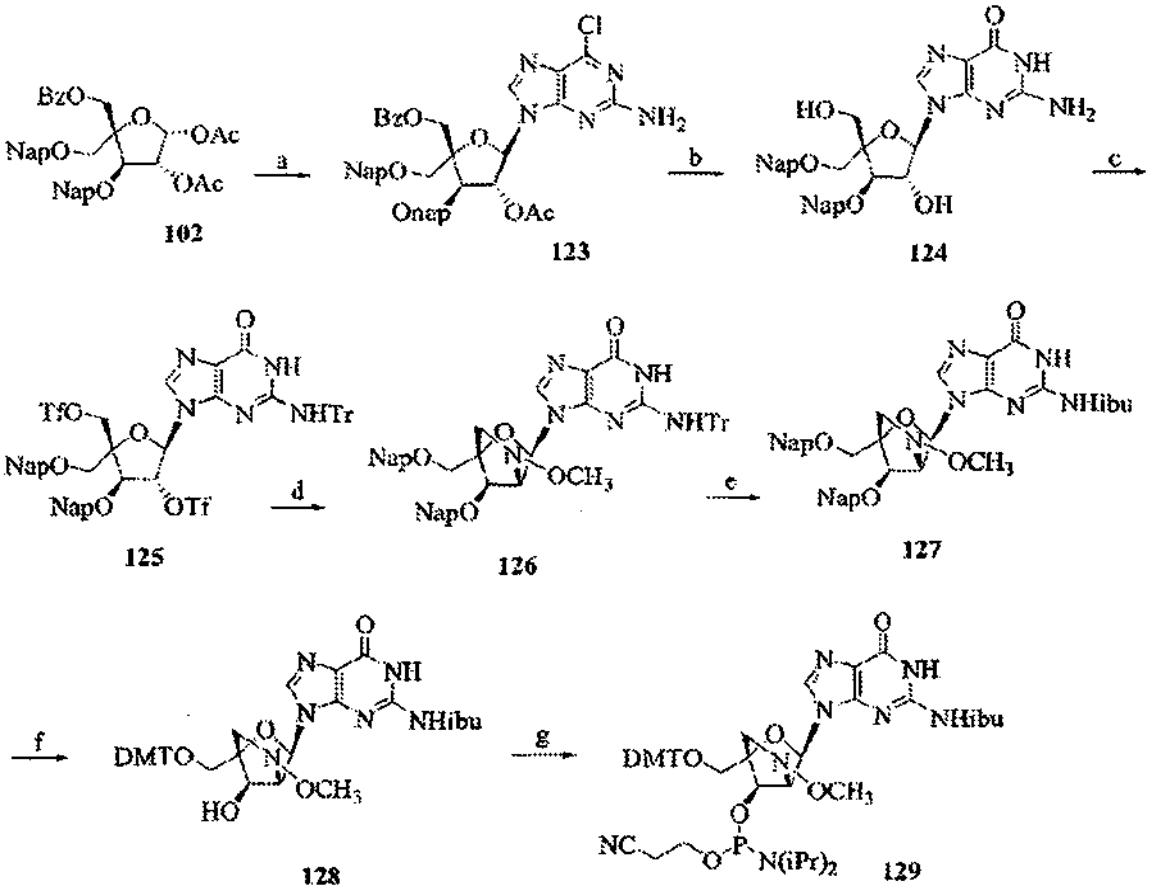
Preparación del Compuesto 122 (Esquema 18)



Esquema 18. (a) adenina, $SnCl_4$, CH_3CN, ta; (b) i) cloruro de tritilo piridina, 100 °C, ii) MeOH, NH_3, ta; (c) anhídrido trifluorometanosulfónico, CH_2Cl_2, DMAP, -10 °C; (f) *N*-metoxiamina, DMA, *i*Pr_2NEt, 60 °C, 18 h; (e) i) ácido dicloroacético al 3% en CH_2Cl_2, ii) benzoil tetrazol, DMF, 40 °C, iii) DDQ, H_2O, CH_2Cl_2; (g) DMTCl, piridina, ta; (h) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF.

Ejemplo 19

Preparación del Compuesto 129 (Esquema 19)



Esquema 19. (a) 2-amino-6-cloropurina, *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida, Triflato de TMS, 1,2-dicloroetano; (b) NaOH acuoso, dioxano; (c) i) cloruro de trietilsililo, DMF, imidazol, ii) cloruro de tritilo, DMAP, trietilamina, DMF, ii) TEA.3HF, TEA, THF, ta, iii) anhídrido trifluorometanosulfónico, piridina, 0 °C; (d) *N*-metoxiamina, DMA, *i*Pr_2NEt, 60 °C, 18 h; (e) i) ácido dicloroacético al 3% en CH_2Cl_2, ii) cloruro de isobutirilo, piridina, ta; (f) i) DDQ, H_2O, CH_2Cl_2, ii) DMTCl, piridina, ta; (g) fosforodiamidito de *N,N*-diisopropilo y 2-cianoetilo, *N*-metilimidazol, 1-H-tetrazol, DMF, ta.

Ejemplo 20

Síntesis de Fosforamiditos de Nucleósido

La preparación de fosforamiditos de nucleósido se realiza siguiendo procedimientos que se ilustran en el presente documento y en la técnica tales como, pero no limitados a, el documento de Patente de los Estados Unidos de América Nº 6.426.220 y el documento de publicación de Patente PCT WO 02/36743.

Ejemplo 21

Síntesis de oligonucleótidos y de oligonucleósidos

Los compuestos oligoméricos usados de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse de manera conveniente o rutinaria mediante técnicas bien conocidas de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis se comercializa por diversos proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Para tal síntesis también pueden emplearse, de manera adicional o alternativa, cualquier otro medio conocido en la técnica Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los derivados de fósforotioatos y alquilados.

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

Los fósforotioatos (P=S) se sintetizan de manera similar a los oligonucleótidos fosfodiéster con las siguientes excepciones: la tionación se efectúa utilizando una sección de fenilacetil disulfuro 0,2 M en 3-picolina al 50% en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces de fosfida. El tiempo de la etapa de reacción de la tionación aumenta a 180 s y comienza por la etapa de protección normal. Después de la escisión de la columna de CPG y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 ºC (12-16 h), los oligonucleótidos se recuperan por precipitación con volúmenes de etanol mayores de 3 a partir de una solución de NH_4OAc 1 M. Los oligonucleótidos fosfinato pueden prepararse como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.508.270.

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

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

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

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

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

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

Los oligonucleótidos borano fosfato pueden prepararse como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.130.302 y 5.177.198.

Oligonucleósidos: Los oligonucleósidos unidos a metilenmetilimino, identificados también como oligonucleósidos unidos a MMI, oligonucleósidos unidos a metilendimetilhidrazo, identificados también como oligonucleósidos unidos a MDH y los oligonucleósidos unidos a metilencarbonilamino, identificados también como oligonucleósidos unidos a amida-3 y los oligonucleósidos unidos a metilenaminocarbonilo, identificados también como oligonucleósidos unidos a amid-4, así como los compuestos oligoméricos de estructura mixta que tienen, por ejemplo, enlaces MMI y P=O o P=S alternos pueden prepararse como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5,378,825; 5.386.023; 5.489.677; 5.602.240 y 5.610.289.

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

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

Ejemplo 22

Aislamiento de oligonucleótidos

Después de la escisión desde el soporte sólido de vidrio de poro controlado y del desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 ºC durante 12-16 horas, los oligonucleótidos o los oligonucleósidos se recuperan por precipitación de NH_4OAc 1 M con >3 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados se analizan por espectroscopia de masas por electro pulverización (determinación del peso molecular) y electroforesis en gel capilar. Las cantidades relativas de enlaces fósforotioato y fosfodiéster obtenidas en la síntesis se determina mediante la proporción del peso molecular correcto con respecto al producto -16 uma (unidad de masa atómica) (+/-32 +/-48). Para algunos oligonucleótidos del estudio se realizó purificación mediante HPLC, como describen Chiang y col., J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con material purificado por HPLC son generalmente similares a los obtenidos con material no purificado por HPLC.

Ejemplo 23

Síntesis de oligonucleótidos usando Formato de Placa de 96 Pocillos

Los oligonucleótidos pueden sintetizarse mediante química de fósforoamidita en fase sólida P(III) en un sintetizador automático capaz de ensamblar simultáneamente 96 secuencias en un formato de 96 pocillos. Las uniones fosfodiéster internucleósido se consiguen por oxidación con yodo acuoso. Las uniones fósforotioato internucleósido se generan por sulfurización utilizando 1,1 dióxido de 3,H-1,2 benzoditiol-3-ona (Reactivo de Beaucage) en acetonitrilo anhidro. Las fósforoamiditas beta-cianoetil-diisopropil con base protegida convencionales se adquieren de proveedores comerciales (por ejemplo, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, or Pharmacia, Piscataway, NJ). Los nucleósidos no convencionales se sintetizan por procedimientos convencionales o patentados. Estos se utilizan como fósforoamiditas beta-cianoetil-diisopropil con base protegida.

Los oligonucleótidos se escinden desde el soporte y se desprotegen con NH_4OH concentrado a temperatura elevada (55-60 ºC) durante 12-16 horas y después el producto liberado se seca al vacío. Después, el producto seco se re-suspende en agua estéril para conseguir una placa maestra muestra a partir de la cual todas las muestras analíticas y de placa de ensayo se diluyen después utilizando pipetas robóticas.

Ejemplo 24

Análisis de oligonucleótidos usando Formato de Placa de 96 pocillos

La concentración de oligonucleótidos en cada pocillo se valoró por dilución de muestras y espectroscopía de absorción UV. La integridad de la longitud completa de los productos individuales se evaluó por electroforesis capilar (EC) en el formato de 96 pocillos (Beckman P/ACE™ MDQ) o, para muestras preparadas individualmente, en un aparato de EC comercial (por ejemplo Beckman P/ACE™ 5000, ABI 270). La composición de bases y la estructura se confirmó por análisis de masa de los compuestos oligoméricos utilizando espectroscopia de masa por electro pulverización. Todas las placas de ensayo valoradas se diluyeron de la placa maestra usando pipetas robóticas sencillas y multicanal. Se consideró que las placas eran aceptables si al menos el 85% de los compuestos oligoméricos en la placa tenían al menos una longitud completa del 85%.

Ejemplo 25

Cultivo celular y tratamiento de oligonucleótidos

El efecto de los compuestos oligoméricos sobre la expresión de ácido nucleico diana puede someterse a ensayo en cualquiera de una diversidad de tipos celulares siempre que el ácido nucleico diana esté presente a niveles que puedan medirse. Esto puede determinarse rutinariamente usando, por ejemplo, análisis por PCR o por transferencia de Northern. Las líneas celulares derivadas de tejidos y especies múltiples pueden obtenerse a partir de la Colección Amerinana de Cultivos Tipo (ATCC, por las siglas en inglés *American Type Culture Collection*, Manassas, VA).

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

Células B.END: La línea celular endotelial cerebral b.END (brain ENDothelial) de ratón se obtuvo prodecente de Or. Werner Risau en el Max Plank Institute (Bad Nauheim, Alemania). Las células b.END se cultivaron rutinariamente en DMEM, alto contenido en glucosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se sometieron rutinariamente a pases de digestión con tripsina y a dilución cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente 90%. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primarìa Nº 353872, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de aproximadamente 3000 células/pocillo para usos que incluyen, pero sin limitación, experimentos de transfección de compuestos oligoméricos.

Los experimentos implican el tratamiento de las células con compuestos oligoméricos:

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

LIPOFECTIN™

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

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

Ejemplo 26

Análisis de inhibición de oligonucleótidos de una expresión diana

La modulación antisentido de una expresión diana puede evaluarse de diversas maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm diana pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real. La PCR cuantitativa en tiempo real se desea actualmente. El análisis de ARN puede realizarse sobre ARN celular total o ARNm poli(A)+. Un procedimiento de análisis de ARN es el uso de ARN celular total como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los procedimientos de aislamiento de ARN se conocen bien en la técnica. El análisis de transferencia de Northern es también rutinario en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real puede realizarse convenientemente usando el Sistema de Detección de Secuencia AB1 PRISM™ 7600, 7700 o 7900, disponible en el mercado de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles de proteína de una diana pueden cuantificarse de diversas maneras bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia de Western (inmunotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por las siglas en inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) o separación de células activadas por fluorescencia (FACS, por la siglas en inglés *Fluorescence Activated Cell Sorting*). Pueden identificarse anticuerpos dirigidos contra una diana y obtenerse a partir de diversas fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse mediante procedimientos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales bien conocidos en la técnica. Se enseñan procedimientos para la preparación de antisuero policlonal, por ejemplo, en Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, volumen 2, páginas 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997. La preparación de anticuerpos monoclonales se enseña, por ejemplo, en Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, volumen 2, páginas 11.4. 1-11.11.5. John Wiley & Sons, Inc., 1997.

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

Ejemplo 27

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

Ensayos fenotípicos

Una vez identificados los inhibidores diana mediante los procedimientos descritos en el presente documento, los compuestos oligoméricos se investigan adicionalmente en uno o más ensayos fenotípicos, teniendo cada uno criterios de valoración que pueden medirse que predicen la eficacia en el tratamiento de una patología o afección particular.

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

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

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

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

Estudios in vivo

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

Ejemplo 28

Aislamiento de ARN

Aislamiento de ARNm poli(A)+

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

Las células que se cultivan en placas de 100 mm u otras placas convencionales pueden tratarse de manera similar usando volúmenes apropiados de todas las soluciones.

Aislamiento de ARN total

Se aisló ARN total usando un kit RNEASY 93™ y tampones adquiridos en Qiagen Inc. (Valencia, CA) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. En resumen, para células que se cultivan en placas de 96 pocillos, el medio de cultivo se retira de las células y cada pocillo se lava con PBS 20 μl enfriado. A cada pocillo se añaden 150 μl de tampón RLT y la placa se agita enérgicamente durante 20 segundos. Después, a cada pocillo, se añaden 150 μl de etanol al 70% y el contenido se mezcla pipeteando tres veces hacia arriba y hacia abajo. Después, las muestras se transfieren a la placa con pocillos RNEASY 96™ acoplada a un colector QIAVAC™ equipado con una bandeja de recogida de desechos y acoplado a una fuente de vacío. Se aplica vacío durante 1 minuto. A cada pocillo de la placa RNEASY 96™ se añaden 500 μl de tampón RW1, se incuba durante 15 minutos y se aplica de nuevo vacío durante 1 minuto. A cada pocillo de la placa RNEASY 96™ se añaden 500 μl más de tampón RWI y se aplica vacío durante 2 minutos, después se añade 1 ml de tampón RPE a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplica vacío durante un periodo de 90 segundos. El lavado con tampón RPE se repite después y se aplica vacío durante 3 minutos más. La placa se retira después del colector QIAVAC™ y se seca en toallitas de papel. Después la placa se vuelve a acoplar al colector QIAVAC™ equipado con una rejilla de tubos de recogida que contiene tubos de recogida de 1,2 ml. Después, el ARN se eluye pipeteando en cada pocillo 140 μl de agua sin RNAsa, se incuba durante 1 minuto y después se aplica vacío durante 3 minutos.

Las etapas de pipeteo y de elución repetitivas pueden automatizarse usando un Bio-Robot 9604 de QIAGEN (Qiagen, Inc., Valencia CA). Esencialmente, después del lisado de las células sobre la placa de cultivo, la placa se transfiere a la plataforma robótica donde se realizan las etapas de pipeteo, tratamiento con DNasa y elución.

Ejemplo 29

Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm diana

La cuantificación de los niveles de ARNm diana se realizó por PCR cuantitativa en tiempo real usando el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM™ 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se trata de un sistema de detección por fluorescencia, no basado en geles, de tubo cerrado que permite la cuantificación de alto rendimiento de los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. A diferencia de la PCR convencional, en la que los productos de amplificación se cuantifican después de completar la PCR, los productos de la PCR cuantitativa en tiempo real se cuantifican a medida que se acumulan. Esto se consigue incluyendo en la reacción PCR una sonda oligonucleotídica que se hibrida específicamente ente los cebadores directo e inverso de la PCR, y contiene dos colorantes fluorescentes. Un colorante indicador (por ejemplo FAM o JOE, obtenido en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon

Technologies Inc., Alameda, CA o en integrated ADN Technologies Inc., Coralville, IA) se une al extremos 5' de la sonda y un colorante inactivador (por ejemplo, TAMRA, obtenido en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o en Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) se une al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y el colorante están intactos, la emisión del colorante indicador se inactiva debido a la cercanía del colorante inactivador en el extremo 3'. Durante la amplificación, la hibridación de la sonda con la secuencia diana crea un sustrato que puede escindirse por la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa. Durante la fase de prolongación del ciclo de amplificación PCR, la escisión de la sonda por la Taq polimerasa libera el colorante indicador del resto de la sonda (y por lo tanto del resto inactivado) y se genera una señal fluorescente específica de secuencia. Con cada ciclo, otras moléculas de colorante indicadoras se escinden de sus sondas respectivas y la intensidad de fluorescencia se controla a intervalos regulares por óptica láser creada en el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM™. En cada ensayo, una serie de reacciones en paralelo que contienen diluciones en serie de ARNm a partir de muestras de control no tratadas genera una curva patrón que se usa para cuantificar el porcentaje de inhibición de las muestras de ensayo tras el tratamiento con el oligonucleótido antisentido.

Antes del análisis de la PCR cuantitativa, los conjuntos de cebador-sonda, específicos para el gen diana que va a medirse, se evalúan para determinar su capacidad de formar complejos múltiples con una relación de amplificación GAPDH. En la formación de complejos múltiples, tanto el gen diana como el gen convencional interno GAPDH se amplifican conjuntamente en una sola muestra. En este análisis, el ARNm aislado de las células no tratadas se diluye en serie. Cada dilución se amplifica en presencia de conjuntos cebador-sonda específicos solo para GADPH, solo para el gen diana ("formación de complejo sencillo") o ambos (formación de complejos múltiples). Después de la amplificación por PCR, se generan curvas patrón de señal GAPDH y señal de ARNm diana en función de la dilución a partir de muestras de complejo sencillo y de complejos múltiples. Si tanto la pendiente como el coeficiente de correlación de la señal GAPDH y la señal diana generados de las muestras de complejos múltiples se encuentran dentro del 10% de sus valores correspondientes generados a partir de las muestras de complejo sencillo, el conjunto cebador- sonda específico para esta diana se considera complejo múltiple. En la técnica también se conocen otros procedimientos de PCR.

Los reactivos RT y PCR se obtuvieron a partir de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La PCR en tiempo real, RT se realizó añadiendo 20 μl de cóctel PCR (tampón PCR 2,5x sin $MgCl_2$, $MgCl_2$ 6,6 mM, 375 μM de cada uno de dATP, dCTP, dCTP y dGTP, 375 nM de cada uno de cebador directo y cebador inverso, 125 nM de sonda, 4 Unidades de inhibidor RNAsa, 1,25 Unidades de PLATINUM® Taq. 5 Unidades de transcriptasa inversa MuLV y colorante ROX 2,5x) a las placas de 96 pocillos que contenían 30 μl de solución de ARN total (20-200 ng). La reacción RT se realizó incubando durante 30 minutos a 48 ºC. Después una incubación de 10 minutos a 95 ºC para activar la Taq PLATINUM®, se realizaron 40 ciclos de un protocolo PCR de dos etapas: 95 ºC durante 15 segundos (desnaturalización) seguido por 60 ºC durante 1,5 minutos (hibridación/prolongación).

Las cantidades diana de gen obtenido por PCR en tiempo real, RT, se normalizaron usando los niveles de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante o cuantificando el ARN total usando RIBOGREEN™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH se cuantificó por RT-PCR en tiempo real, procesándose simultáneamente con la diana, formando complejos o por separado. El ARN total se cuantificó usando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Los procedimientos de cuantificación de ARN por RIBOQREEN™ se enseñan en Jones, L. J., y col, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374).

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

Ejemplo 30

Cebadores y sondas específicos de diana

Los cebadores y las sondas pueden diseñarse para hibridarse con una secuencia diana, usando información de secuencia publicada.

Por ejemplo, para PTEN de ser humano, se diseñó el siguiente conjunto de cebador-sonda usando información de secuencia publicada (número de acceso a GENBANK™ U92436.1, SEC ID Nº: 01).

Cebador directo; AATGGCTAAGTGAAGATGACAATCAT (SEC ID Nº: 02)

Cebador inverso: TGCACATATCATTACACCAGTTCGT (SEC ID Nº: 03)

Y para la sonda PCR:

FAM-TTGCAGCAATTCACTGTAAAGCTOGAAAGG-TAMRA (SEC ID Nº: 04),

en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador.

Ejemplo 31

Análisis de transferencia de Western de niveles de proteína diana

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

Ejemplo 32

Estudio *in vitro* de los efectos de los compuestos antisentido que dirigen PTEN

En determinadas realizaciones, se sintetizaron compuestos oligoméricos y se sometieron a ensayo para detectar su capacidad para reducir la expresión de PTEN a lo largo de un intervalo de dosis, se trataron células B.END con N-metoxilamino BNA (403045), 4'-CH_2-O-2' BNA (392743 y 392063) y oligómeros modificados con 2'-MOE (392753) a concentraciones de 0,625, 1,2,5, 5, 10, 20 o 40 nM utilizando procedimientos descritos en el presente documento. Los niveles de expresión de PTEN se determinaron usando PCR en tiempo real y se normalizaron frente a RIBOGREN™ como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Se determinó el porcentaje de inhibición del ARNm de PTEN. Las curvas resultantes de respuesta a la dosis se usaron para determinar la CT_{50} y las Tm se evaluaron en tampón fosfato 100 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7, a 260 nm usando oligómeros modificados 4 μM y ARN complementario de igual longitud. Las actividades se indican a continuación.

SEC ID Nº /ISIS Nº	Composición (5' a 3')
05/403045	$C_nU_nTAGCACTGGCC_nU_n$
05/392745	$C_1U_1TGCACTGGCC_1U_1$
05/392063	$^{Mc}C_1T_1TAGCACTGGC^{Mc}C_1T_1$
05/392753	$C_cU_cTAGCACTGGCC_cU_c$

Cada grupo de unión internucleósido es un fósforotioato: el subíndice n indica que el nucleósido anterior es un nucleósido bicíclico N-metoxi amino; el subíndice 1 indica que el nucleósido anterior es un nucleósido bicíclico que tiene un puente 4'-CH_2-O-2'; el subíndice e indica que el nucleósido anterior es un nucleósido modificado con 2'-$(CH_2)_2OCH_3$ (MOE); el subíndice Me indica que el nucleósido siguiente es un nucleósido modificado con base 5-metilo y cada nucleósido no indicado de otra manera es un 2-desoxirribonucleósido.

% de Inhibición de Dosis de ARNm de PTEN

SEC ID Nº/ISIS Nº	0,625 nM	1,25 nM	2,5 nM	5 nM	10 nM	20 nM	40 nM
05/392063	0	34	55	65	84	88	92
05/392745	10	40	59	71	85	92	93
05/392753	0	0	8	22	50	67	84
05/403045	4	31	55	71	80	80	92

SEC ID Nº/ISIS Nº	CI_{50}	Tm ºC
05/92063	2,7	60,6
05/392745	2,1	58,9
05/392753	11,6	51,3
05/403045	2,7	57,7

Ejemplo 33

Estudio in vivo de los efectos de los compuestos antisentido que dirigen PTEN

Durante tres semanas, a ratones Balb/c macho de seis semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), se les inyectó dos veces por semana *N*-metoxil-amino-BNA (403045) y oligómeros modificados con 4'-CH_2-O-2' BNA (392063) dirigidos contra PTEN a una dosis de 3,2, 1,0, 0,32 o 0m1 μmol/kg. Los ratones se sacrificaron 48 horas después de la administración final. Los tejidos hepáticos se homogeneizaron y los niveles de ARNm de PTEN se cuantificaron usando PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) con el protocolo convencional. Los niveles de ARNm de PTEN se determinaron con respecto al ARN total (usando Ribogreen), antes de la normalización frente al control tratado con solución salina. La siguiente tabla muestra comparaciones de los compuestos antisentido que dirigen el ácido nucleico de PTEN para determinar su efecto sobre la reducción de ARNm diana. Los resultados se presentan como el % de inhibición promedio de la expresión de ARNm para cada compuesto antisentido, normalizado frente a control inyectado con solución salina.

		% de Inhibición de Dosis de ARNm de PTEN (μmol/kg)			
SEC ID Nº/ ISIS Nº	**Composiciones (5' a 3')**	**0,1**	**0,32**	**1,0**	**3,2**
05/403045	$C_nU_nTAGCACTGOCC_nU_n$	0	2	29	75
05/392063	$^{Me}C_1T_1TAGCACrGGC^{Me}C_1T_1$	4	16	70	93

Cada grupo de unión internucleósido es un fósforotioato; el subíndice n indica que el nucleósido anterior es un nucleósido bicíclico N-metoxi-amino; el subíndice 1 indica que el nucleósido anterior es un nucleósido bicíclico que tiene un puente 4'-CH_2-O-2'; el subíndice Me indica que el nucleósido siguiente es un nucleósido modificado con base 5-metilo y cada nucleósido no indicado de otra manera es 2'-desoxirribonucleósido.

Como se ha observado anteriormente, cada compuesto antisentido demostró una reducción dependiente de la dosis en los niveles de ARNm de PTEN. Los resultados demuestran que el oligómero con separación (gapmer) de ARN *N*-metoxi amino 401045 es aproximadamente 2,5 veces menos activo que el oligómero con separación 4'-CH_2-O-2' BNA 392063.

El valor de la DE_{50} para 403045 y 392063 se determinó comparando la concentración de oligonucleótido en el hígado con respecto a la inhibición del ARNm de PTEN. Se descubrió que los oligómeros antisentido 403045 y 392063 presentaban una DE_{50} de 7,9 mg/kg (1,71 μmol/kg) y de 3,1 mg/kg (0,68 μmol/kg) respectivamente. La DE_{50} se define como la dosis eficaz necesaria que presenta el 50% de reducción en ARNm de PTEN.

Los niveles de transaminasa hepáticos, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), en suero se midieron con respecto a los ratones a los que se les inyectó solución salina. Los niveles aproximados de transaminasa hepática se indica en la siguiente tabla.

SEC ID Nº/ ISIS Nº	**Dosis (μmol/kg)**	**ALT (UI/L)**	**AST (UI/L)**
Solución salina N/A	24,8	62	
05/403045	0,1	30,8	85,8
	0,32	21,3	62,5
	1	17	55,8
	3,2	16,5	60,3
05/392063	0,1	23,8	53
	0,32	27,8	110,5
	1	38,5	80
	3,2	321,8	265,8

En los ratones tratados con 302063 Se observó una ligera disminución en el peso corporal total en comparación con los ratones tratados sólo con solución salina. No hubo cambios significativos en los pesos corporales totales para los ratones tratados con 403045 en comparación con los pesos corporales totales de los ratones tratados solo con solución salina.

Ejemplo 34

Estudio in vivo de los efectos de los compuestos antisentido que dirigen PTEN

A ratones macho Balb/c de seis semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) se les inyectó una vez oligómeros modificados con 2'-MOE (394424), 4'-CH_2-O-2' BNA (392056) y *N*-metoxilamino (403747) dirigidos contra PTEN a una dosis de 2,5, 5, 10 o 20 μmol/kg. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración final. Los tejidos hepáticos se homogeneizaron y los niveles de ARNm de PTEN se cuantificaron usando PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con el protocolo convencional. Los niveles de ARNm de PTEN se determinaron con respecto al ARN total (usando Ribogreen), antes de la normalización frente a control tratado con solución salina. Las actividades relativas de los compuestos antisentido se muestran a continuación presentando los resultados como el % de inhibición promedio de la expresión de ARNm para cada compuesto antisentido, normalizado frente a control inyectado con solución salina.

		% de Inhibición de PTEN (dosis μmol/kg)			
SEC ID Nº/ ISIS Nº	**Secuencia**	**2,5**	**5,0**	**10**	**20**
06/394424	$T_c^{Me}C_eATGGCTGCAG^{Me}C_eT_e$	n/a	n/a	n/a	29
06/392056	$T_1^{Me}C_1ATGGCTGCAG^{Me}C_1T_1$	42	61	82	n/a
07/403747	$U_nC_nATGGGTGCAGC_nU_n$	34	52	68	79

Cada grupo de unión internucleósido es un fósforotioato; el subíndice n indica que el nucleósido anterior es un nucleósido bicíclico N-metoxi-amino; el subíndice 1 indica que el nucleósido anterior es un nucleósido bicíclico que tiene un puente 4'-CH_2-O-2'el subíndice e indica que el nucleósido anterior es un nucleósido modificado con 2'-$(CH_2)_2OCH_3$ (MOE); el subíndice Me indica que el nucleósido siguiente es un nucleósido modificado con base 5-metilo y cada nucleósido no indicado de esta manera es un 2'-desoxirribonucleósido.

En determinadas realizaciones, se midieron los niveles de ALT y AST en ratones tratados con oligómeros antisentido 394424, 392056 y 403747. El centro LabCorp Testing (San Diego, CA) analizó el suero y los niveles de ALT y AST en suero se midieron con respecto a los ratones a los que se inyectó solución salina. Los niveles aproximados de ALT y AST se indican en la siguiente tabla.

SEC ID Nº/ ISIS Nº	**Dosis (μmol/kg)**	**ALT (UI/L)**	**AST(UI/L)**
Salina	N/A	33	70
06/394424	20	26	49
06/392036	2,5	39	62
	5	319	181
	10	890	593
07//403747	2,5	31	65
	5	37	55
	10	91	84
	20	348	281

Ejemplo 35

Estabilidad a nucleasa, tratamiento con fosfodiesterasa de veneno de serpiente

Se determinó las estabilidad a nucleasa de un oligómero de ADN en comparación con oligómeros modificados que tenían *N*-metoxiamino BNA, 4'-CH_2-O-2' BNA y nucleósidos modificados con 2'-MOE después de tratamiento con fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD, por las siglas in inglés Sake Venom PhosphoDiesterase). Cada uno

de los oligómeros del ensayo se incubó con SVPD (0,0005 U/ml) en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 8 mM a 37 ºC a una concentración final de 5 μM en un volumen total de 100-150 μl. A cada momento, se puso una alícuota de 10 μl y un tampón de inactivación (Urea 8 M, EDTA 50 mM) en un tubo de microcentrifugación de 500 μl. Los momentos cinéticos se tomaron a 0, 1, 2 y 4 minutos para 7153; 0, 5, 10 y 15 minutos para 395421 y 395423; y 0, 30, 60, 120, 240 y 480 minutos para 403872. Después, las muestras se enfriaron en hielo y se centrifugaron en una microcentrifugadora para llevar todo el volumen al fondo del tubo. Las muestras se conservaron congeladas hasta estar listas para análisis LC/MS.

Para cada muestra el oligómero y los metabolitos se separaron y se analizaron usando técnicas IP-HPLC/MS. Las muestras se diluyeron a una concentración de 1 μM con tampón de inactivación en un vial de micromuestreo y se inyectaron 50 μl de las muestras en la columna IP-HPLC (YMC ODS-AQ™ 1,0 mm x 150 mm, 3 μm, 1,20 Aº). El tampón de carga usado fue TBAA (acetato de tributil amonio) 25 mM en acetonitrilo al 25%. La fase móvil “A” fue TBAA 5 mM en acetonitrilo al 20% y la fase móvil “B” fue TBAA 5 mM en acetonitrilo al 90%. Condiciones: 0-4 min B al 10 %, 4-26 min B al 65%, 26-32 min B al 75%; flujo 0,1 ml primario^{-1}; longitud de onda 260 nm. Los porcentajes de los oligómeros de longitud completa se calcularon integrando usando el programa informático Caesar v. 6 (Programa Informático Senetec, Nueva Jersey) y las semividas de los oligonucleótidos se calcularon usando GraphPad Prism 4.

SEC ID Nº/ISIS Nº	Composición (5’ a 3’)	modificación	Semivida (min)
08/7157	TTTTTTTTTTTT	BNA no modificado (2’.H)	0,6
08/395421	$TTTTTTTTTTTT_eT_e$	2’-MOE	3,4
09/395423	$TTTTTTTTTTTU_1U_1$	4’-CH_2O’2’BNA	5,0
09/403872	$TTTTTTTTTTTU_nU_n$	*N*-Metoxiamino BNA	188,0

Cada grupo de unión internucleósido es un fósforotioato; el subíndice n indica que el nucleósido anterior es un nucleósido bicíclico N-metoxi-amino; el subíndice 1 indica que el nucleósido anterior es un nucleósido bicíclico que tiene un puente 4’-CH_2-O-2’el subíndice e indica que el nucleósido anterior es un nucleósido modificado con 2’-$(CH_2)_2OCH_3$ (MOE); y cada nucleósido no indicado de otra manera es un 2’-desoxirribonucleósido.

Como se muestra, la semivida del oligómero modificado con N-metoxiamino BNA (403872) aumentó en comparación con las semividas calculadas para los oligómeros modificados con 2’-MOE (395423) y 4’-CH_2-O-$_2$’ BNA (395421).

Aunque en la anterior memoria descriptiva, la presente invención se ha descrito en relación a determinadas realizaciones de la misma, y se han expuesto muchos detalles con fines ilustrativos, será evidente para los expertos en la materia que la invención sea susceptible a realizaciones adicionales y que algunos de los detalles descritos en el presente documento puedan variar considerablemente sin alejarse de los principios básicos de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceutical, Inc

Thazha P. Prakash

Bal Bhat

Eric E. Swayze

<120> ANÁLOGOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS BICÍCLICOS N-ALCOXIAMINO

<130> CHEM0033WO

<150> 60/940.835

<151> 30-05-2007

<160> 9

<170> FastSEC para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 3160

<212> ADN

<213> H. sapiens

<400> 1

```
cctcccctcg cccggcgcgg tcccgtccgc ctctcgctcg cctcccgcct cccctcggtc 60
ttccgaggcg cccgggctcc cggcgcggcg gcggaggggg cgggcaggcc ggcgggcggt 120
gatgtggcag gactctttat gcgctgcggc aggatacgcg ctcggcgctg ggacgcgact 180
gcgctcagtt ctctcctctc ggaagctgca gccatgatgg aagtttgaga gttgagccgc 240
tgtgaggcga ggccgggctc aggcgaggga gatgagagac ggcggcggcc gcggcccgga 300
gcccctctca gcgcctgtga gcagccgcgg gggcagcgcc ctcggggagc cggccggcct 360
gcggcggcgg cagcggcggc gtttctcgcc tcctcttcgt cttttctaac cgtgcagcct 420
cttcctcggc ttctcctgaa agggaaggtg gaagccgtgg gctcgggcgg gagccggctg 480
aggcgcggcg gcggcggcgg cggcacctcc cgctcctgga gcgggggggga gaagcggcgg 540
cggcggcggc cgcggcggct gcagctccag ggagggggtc tgagtcgcct gtcaccattt 600
ccagggctgg gaacgccgga gagttggtct ctccccttct actgcctcca acacggcggc 660
ggcggcggcg gcacatccag ggacccgggc cggttttaaa cctcccgtcc gccgccgccg 720
cacccccgt ggcccgggct ccggaggccg ccggcggagg cagccgttcg gaggattatt 780
cgtcttctcc ccattccgct gccgccgctg ccaggcctct ggctgctgag gagaagcagg 840
cccagtcgct gcaaccatcc agcagccgcc gcagcagcca ttacccggct gcggtccaga 900
gccaagcggc ggcagagcga ggggcatcag ctaccgccaa gtccagagcc atttccatcc 960
tgcagaagaa gccccgccac cagcagcttc tgccatctct ctcctccttt ttcttcagcc 1020
acaggctccc agacatgaca gccatcatca aagagatcgt tagcagaaac aaaaggagat 1080
atcaagagga tggattcgac ttagacttga cctatattta tccaaacatt attgctatgg 1140
gatttcctgc agaaagactt gaaggcgtat acaggaacaa tattgatgat gtagtaaggt 1200
ttttggattc aaagcataaa aaccattaca agatatacaa tctttgtgct gaaagacatt 1260
atgacaccgc caaatttaat tgcagagttg cacaatatcc ttttgaagac cataacccac 1320
cacagctaga acttatcaaa cccttttgtg aagatcttga ccaatggcta agtgaagatg 1380
acaatcatgt tgcagcaatt cactgtaaag ctggaaaggg acgaactggt gtaatgatat 1440
gtgcatattt attacatcgg ggcaaatttt taaaggcaca agaggcccta gatttctatg 1500
gggaagtaag gaccagagac aaaaagggag taactattcc cagtcagagg cgctatgtgt 1560
attattatag ctacctgtta aagaatcatc tggattatag accagtggca ctgttgtttc 1620
acaagatgat gtttgaaact attccaatgt tcagtggcgg aacttgcaat cctcagtttg 1680
tggtctgcca gctaaaggtg aagatatatt cctccaattc aggacccaca cgacgggaag 1740
acaagttcat gtactttgag ttccctcagc cgttacctgt gtgtggtgat atcaaagtag 1800
agttcttcca caaacagaac aagatgctaa aaaaggacaa aatgtttcac ttttgggtaa 1860
atacattctt cataccagga ccagaggaaa cctcagaaaa agtagaaaat ggaagtctat 1920
gtgatcaaga aatcgatagc atttgcagta tagagcgtgc agataatgac aaggaatatc 1980
tagtacttac tttaacaaaa aatgatcttg acaaagcaaa taaagacaaa gccaaccgat 2040
acttttctcc aaattttaag gtgaagctgt acttcacaaa aacagtagag gagccgtcaa 2100
atccagaggc tagcagttca acttctgtaa caccagatgt tagtgacaat gaacctgatc 2160
attatagata ttctgacacc actgactctg atccagagaa tgaacctttt gatgaagatc 2220
agcatacaca aattacaaaa gtctgaattt ttttttatca agagggataa aacaccatga 2280
aaataaactt gaataaactg aaaatggacc tttttttttt taatggcaat aggacattgt 2340
gtcagattac cagttatagg aacaattctc ttttcctgac caatcttgtt ttaccctata 2400
catccacagg gttttgacac ttgttgtcca gttgaaaaaa ggttgtgtag ctgtgtcatg 2460
tatatacctt tttgtgtcaa aaggacattt aaaattcaat taggattaat aaagatggca 2520

ctttcccgtt ttattccagt tttataaaaa gtggagacag actgatgtgt atacgtagga 2580
atttttcct tttgtgttct gtcaccaact gaagtggcta aagagctttg tgatatactg 2640
gttcacatcc tacccctttg cacttgtggc aacagataag tttgcagttg gctaagagag 2700
gtttccgaaa ggttttgcta ccattctaat gcatgtattc gggttagggc aatggagggg 2760
aatgctcaga aaggaaataa ttttatgctg gactctggac catataccat ctccagctat 2820
ttacacacac ctttctttag catgctacag ttattaatct ggacattcga ggaattggcc 2880
gctgtcactg cttgttgttt gcgcattttt ttttaaagca tattggtgct agaaaaggca 2940
gctaaaggaa gtgaatctgt attggggtac aggaatgaac cttctgcaac atcttaagat 3000
ccacaaatga agggatataa aaataatgtc ataggtaaga aacacagcaa caatgactta 3060
accatataaa tgtggaggct atcaacaaag aatgggcttg aaacattata aaaattgaca 3120
atgatttatt aaatatgttt tctcaattgt aaaaaaaaaa                       3160
```

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 2

aatggctaag tgaagatgac aatcat 26

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 3

tgcacatatc attacaccag ttcgt 25

<210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 4

ttgcagcaat tcactgtaaa gctggaaagg 30

<210> 5

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<220>

<221> misc_feature

<222> 2, 14

<223> Las bases en estas posiciones son ARN

<400> 5

cutagcactg gccu 14

<210> 6

<211> 14

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 6

tcatggctgc agct 14

<210> 7

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<220>

<221> misc_feature

<222> 1, 14

<223> Las bases en estas posiciones son ARN

<400> 7

ucatggctgc agcu 14

<210> 8

<211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 8

tttttttttt tt 12

<210> 9

<211> 12

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<220>

<221> misc_feature

<222> 11, 12

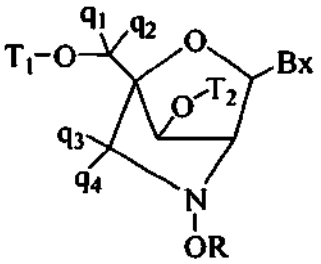
<223> Las bases en estas posiciones son ARN

<400> 9

tttttttttt uu 12

REIVINDICACIONES

1. Un nucleósido bicíclico que tiene Fórmula I:



I

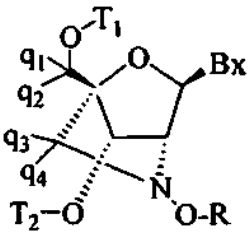
en la que:

Bx es un resto de base heterocíclica;
uno de T_1 y T_2 es H o un grupo protector de hidroxilo y el otro de T_1 y T_2 es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo de fósforo reactivo;
R es alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;
q_1 y q_2 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
q_3 y q_4 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;
en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, OJ_1, SJ_1, NJ_1J_2, N_3, $COOJ_1$, CN, O-C(=O)NJ_1J_2, N(H)C(=NH)NJ_1J_2 o N(H)C(=X)N(H)J_2 en el que X es O ó S; y
cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, aminoalquilo C_1-C_6 o un grupo protector en el que
el grupo fosforoso reactivo es un fosforamidito, H-fosfonato, triéster de fosfato o fósforo que contiene un auxiliar quiral.

2. El nucleósido bicíclico de la reivindicación 1 en el que R es alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido.

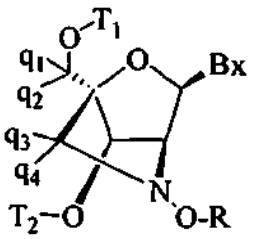
3. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 en el que R es metilo, -$(CH_2)_2OCH_3$ o -$(CH_2)_2F$.

4. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene Fórmula I y que tiene de forma adicional la configuración de la Fórmula Ia:



Ia.

5. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene Fórmula I y que tiene de forma adicional la configuración de la Fórmula Ib:



Ib.

6. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que uno de q_1, q_2, q_3 y q_4 es CH_3 y los otros tres de q_1, q_2, q_3 y q_4 son independientemente H.

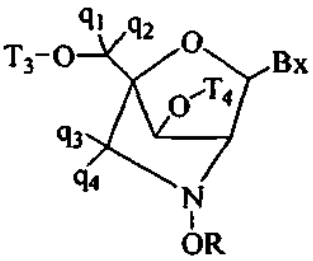
7. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que uno de q_1 y q_2 es CH_3 y uno de q_3 y q_4 es CH_3 y los otros dos de q_1, q_2, q_3 y q_4 son independientemente H.

8. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que T_1 es H o 4,4'-dimetoxitritilo y T_2 es H, cianoetoxifosforamidito de diisopropilo y o H-fosfonato.

9. El nucleósido bicíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que T_1 es 4,4'-dimetoxitritilo y T_2 es cianoetoxifosforamidito de diisopropilo.

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

11. Un compuesto oligomérico que comprende al menos un nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II:



II

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

Bx es un resto de base heterocíclica;

T_3 y T_4 son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleósido que une el nucleósido bicíclico al compuesto oligomérico o uno de T_3 y T_4 es un grupo de unión internucleósido que une el nucleósido bicíclico al compuesto oligomérico y el otro de T_3 y T_4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo 5' o 3'-terminal;

R es alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;

q_1 y q_2 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;

q_3 y q_4 son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;

en la que cada grupo sustituido está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, OJ_1, SJ_1, NJ_1J_2, N_3, $COOJ_1$, CN, O-C(=O)NJ_1J_2, N(H)C(=NH)NJ_1J_2 o N(H)C(=X)N(H)J_2 en el que X es O ó S; y

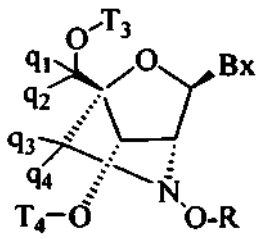
cada J_1 y J_2 es, independientemente H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, aminoalquilo C_1-C_6; o un grupo protector, en el que

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

12. El compuesto oligomérico de la reivindicación 11 en el que para cada nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II R es alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido.

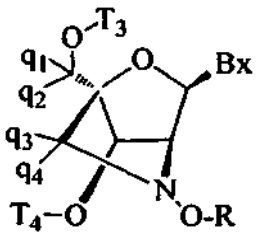
13. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12 en el que para cada nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II R es metilo, $-(CH_2)_2OCH_3$ o $-(CH_2)_2F$.

14. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que cada nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II tiene la configuración de la Fórmula IIa:



IIa.

15. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que cada nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II tiene la configuración de la Fórmula IIb:



IIb.

16. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en el que independientemente para cada nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II uno de q_1, q_2, q_3 y q_4 es CH_3 y los otros tres de q_1, q_2, q_3 y q_4 son independientemente H.

17. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en el que independientemente para cada nucleósido bicíclico que tiene Fórmula II uno de q_1 y q_2 es CH_3 y uno de q_3 y q_4 es CH_3 y los otros dos de q_1, q_2, q_3 y q_4 son independientemente H.

18. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 en el que cada grupo de unión internucleósido es, independientemente, un fosfodiéster o un fósforotioato.

19. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18 que comprende al menos una región de al menos dos nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula II, situada en el extremos 3' o 5' del compuesto oligomérico.

20. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18 que comprende un compuesto oligomérico separado que tiene al menos dos regiones, comprendiendo cada región de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos bicíclicos contiguos que tienen la Fórmula II, en el que una de dichas regiones de nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II se sitúa externamente en el extremo 5' y la otra región se sitúa externamente en el extremo 3' y en el que las dos regiones externas están separados por una región interna que comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 subunidades monoméricas seleccionadas independientemente de nucleósidos y nucleósidos modificados.

21. El compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20 que comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 monómeros de longitud.

22. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de genes que comprende poner en contacto una o más células o un tejido con un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21.

23.Un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21 para su uso en un procedimiento *in*

vivo para inhibir la expresión de genes comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21.

24. Un compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21 para su uso en terapia médica.