

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 815**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/04** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2007 E 10176867 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2314594**

54 Título: **Análogos de ácidos nucleicos bicíclicos modificados en la posición 6**

30 Prioridad:

**27.01.2006 US 762722 P**

**23.06.2006 US 805660 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**31.10.2014**

73 Titular/es:

**ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**

**2855 Gazelle Court  
Carlsbad, CA 92010, US**

72 Inventor/es:

**SWAYZE, ERIC E. y  
SETH, PUNIT P.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 516 815 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 modificados en la posición 6****REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

5 Esta solicitud reivindica los beneficios de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 60/762.722, presentada el 27 de Enero de 2006 y titulada, "Substituted Bicyclic Nucleic Acid Analog" y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 60/805,660, presentada el 23 de Junio de 2006 y titulada, "6-Substituted Bicyclic Nucleic Acid Analogs".

**10 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente solicitud describe nucleósidos bicíclicos modificados en la posición 6 y la presente invención proporciona compuestos oligoméricos y composiciones preparados de allí. Más concretamente, la presente invención proporciona oligómeros y composiciones preparados de nucleósidos que tienen un puente de 2'-O-C(H)(R)-4'. En una realización preferida, R está en una configuración particular que proporciona el isómero (R) o (S). En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos y las composiciones de la presente invención hibridan con una porción de un ARN diana dando como resultado la pérdida de la función normal del ARN diana.

**20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La tecnología antisentido es un medio eficaz para reducir la expresión de uno o más productos génicos específicos y por lo tanto se puede probar que sólo es útil en algunas aplicaciones terapéuticas, diagnósticas, y de investigación. Los nucleósidos modificados químicamente se utilizan rutinariamente para su incorporación a secuencias antisentido para potenciar una o más propiedades tales como por ejemplo la resistencia a nucleasas. Uno de tales grupos de modificaciones químicas incluye nucleósidos bicíclicos donde la porción furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos del anillo de furanosa formando de este modo un sistema anular bicíclico. Tales nucleósidos bicíclicos tienen diversos nombres incluyendo BNA y LNA para ácidos nucleicos bicíclicos o ácidos nucleicos bloqueados respectivamente.

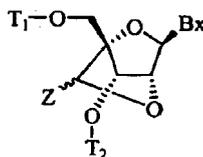
Se han preparado y se ha informado de algunos BNA en la literatura de patentes así como en la literatura científica, véanse por ejemplo: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 633-638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Wengel et al., Solicitud Internacional PCT WO 98-DK393 19980914; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039, incorporándose el texto de cada una de ellas como referencia en la presente memoria, en su totalidad. Los ejemplos de las patentes y solicitudes publicadas de los Estados Unidos presentadas incluyen por ejemplo: las Patentes de los Estados Unidos Núms. 7.053.207, 6.770.748, 6.268.490 y 6.794.499 y las solicitudes de los Estados Unidos Publicadas Núms. 20040219565, 20040014959, 20030207841, 20040192918, 20030224377, 20040143114 y 20030082807.

Muchos LNA son tóxicos. Véase, p. ej., Swayze, E. E.; Siwkowski, A. M.; Wanciewicz, E. V.; Migawa, M. T.; Wyrzykiewicz, T. K.; Hung, G.; Monia, B. P.; Bennett, C. F. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. Nucl. Acids Res., doi: 10.1093/nar/gkl1071 (Dic. 2006, publicación en línea avanzada).

En consecuencia, persiste una necesidad sentida desde hace mucho tiempo de agentes que regulen específicamente la expresión génica vía mecanismos antisentido. En la presente memoria se describen BNA sustituidos en la posición 6 y compuestos antisentido preparados de allí útiles para modular las rutas de expresión génica, incluyendo aquellos que dependen de mecanismos de acción tales como enzimas ARNasaH, ARNi y ARNdH, así como otros mecanismos antisentido basados en la degradación de la diana o la ocupación de la diana. Un experto en la técnica, una vez equipado con esta descripción será capaz, sin experimentación indebida, de identificar, preparar y explotar compuestos antisentido para estos usos.

**BREVE RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente solicitud proporciona un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula:



donde:

Bx es un radical alcalino heterocíclico;

T<sub>1</sub> es H o un grupo protector de hidroxilo;

T<sub>2</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo como se define en la reivindicación 1;

Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tio sustituido.

5

En una realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes protegidos opcionalmente seleccionados independientemente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> y CN, donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>,

10

En una realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, y NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y X es O o NJ<sub>1</sub>,

15

En una realización, Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido. En otra realización, Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. En otra realización, Z es metilo (CH<sub>3</sub>-). En otra realización, Z es etilo (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-). En otra realización, Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido. En otra realización, Z es metilo sustituido. En otra realización, Z es etilo sustituido.

20

En una realización, el grupo sustituyente es Alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (p. ej., Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>). En otra realización, el grupo sustituyente alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> es CH<sub>3</sub>O- (p. ej., Z es CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-). En otra realización, el grupo sustituyente alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> puede estar sustituido adicionalmente tal como N(J<sub>1</sub>J<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>O- (p. ej., Z es N(J<sub>1</sub>J<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-). En otra realización, el grupo sustituyente es halógeno (p. ej., Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más halógenos). En otra realización, el grupo halógeno sustituyente es flúor (p. ej., Z es CH<sub>2</sub>FCH<sub>2</sub>-, CHF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- o CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-). En otra realización, el grupo sustituyente es hidroxilo (p. ej., Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más hidroxilo). En otra realización, Z es HOCH<sub>2</sub>-. En otra realización, Z es CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F o HOOCH<sub>2</sub>-.

25

En una realización, el grupo Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es independientemente OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, el grupo Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es independientemente halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-), alcoxi sustituido o azido.

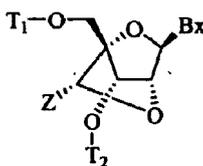
30

En una realización, el grupo Z es -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde X<sup>x</sup> es OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, el grupo Z es -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde X<sup>x</sup> es halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

35

En una realización, el grupo Z está en configuración (R):

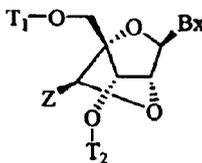
40



45

En otra realización, el grupo Z está en configuración (S):

50



55

En una realización, cada uno de T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> es un grupo protector de hidroxilo. Una lista preferida de grupos protectores de hidroxilo incluye bencilo, benzoilo, 2,6-diclorobencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, mesilato, tosilato, dimetoxitritilo (DMT), 9-fenilxantin-9-ilo (Pixilo) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX). En una realización T<sub>1</sub> es un grupo protector de hidroxilo seleccionado entre acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo y dimetoxitritilo donde un grupo protector de hidroxilo más preferido es T<sub>1</sub> es 4,4'-dimetoxitritilo.

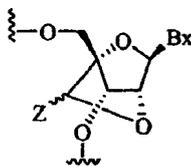
60

En una realización, T<sub>2</sub> es un grupo fósforo reactivo donde los grupos fósforo reactivos preferidos incluyen diisopropilcianoetoxi-fosforamidita y H-fosfonato. En una realización preferida T<sub>1</sub> es 4,4'-dimetoxitritilo y T<sub>2</sub> es diisopropilcianoetoxi-fosforamidita.

65

La presente invención también proporciona compuestos oligoméricos que tienen al menos un monómero de fórmula:

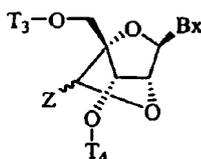
5



10

o de fórmula:

15



20

donde

Bx es un radical alcalino heterocíclico;

25

T<sub>3</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado conectado o un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

30

T<sub>4</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado conectado o un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

35

donde al menos uno de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> es un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico; y Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tío o tio sustituido.

40

En una realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes protegidos opcionalmente seleccionados independientemente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> y CN, donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>,

45

En una realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, y NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O o NJ<sub>1</sub>,

50

En una realización, al menos un Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido. En otra realización, cada Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido. En otra realización, al menos un Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. En otra realización, cada Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. En otra realización, al menos un Z es metilo. En otra realización, cada Z es metilo. En otra realización, al menos un Z es etilo. En otra realización, cada Z es etilo. En otra realización, al menos un Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido. En otra realización, cada Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido. En otra realización, al menos un Z es metilo sustituido. En otra realización, cada Z es metilo sustituido. En otra realización, al menos un Z es etilo sustituido. En otra realización, cada Z es etilo sustituido.

55

En una realización, al menos un grupo sustituyente es alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (p. ej., al menos un Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>). En otra realización, cada grupo sustituyente es, independientemente, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (p. ej., cada Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).

60

En una realización, al menos un grupo sustituyente alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> es CH<sub>3</sub>O- (p. ej., al menos un Z es CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-). En otra realización, cada grupo sustituyente alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> es CH<sub>3</sub>O- (p. ej., cada Z es CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-).

65

En una realización, al menos un grupo sustituyente es halógeno (p. ej., al menos un Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más halógeno). En otra realización, cada grupo sustituyente es, independientemente, halógeno (p. ej., cada Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más halógeno). En otra realización, al menos un grupo sustituyente halógeno es flúor (p. ej., al menos un Z es CH<sub>2</sub>FCH<sub>2</sub>-, CHF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- o CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-). En otra realización, cada grupo sustituyente halo es flúor (p. ej., cada Z es, independientemente, CH<sub>2</sub>FCH<sub>2</sub>-, CHF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- o CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-).

En una realización, al menos un grupo sustituyente es hidroxilo (p. ej., al menos un Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más hidroxilo). En otra realización, cada grupo sustituyente es, independientemente, hidroxilo (p. ej., cada Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más hidroxilo). En otra realización, al menos un Z es HOCH<sub>2</sub>-. En otra realización, cada Z es HOCH<sub>2</sub>-.

En una realización, al menos un Z es CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>F- o HOCH<sub>2</sub>-. En otra realización, cada Z es, independientemente, CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>F- o HOCH<sub>2</sub>-.

En una realización, al menos un grupo Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es, independientemente, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, al menos un grupo Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es, independientemente, halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

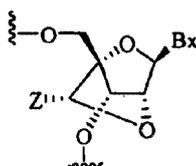
En una realización, cada grupo Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es independientemente OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, cada grupo Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es independientemente halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

En una realización, al menos un grupo Z es -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde X<sup>x</sup> es OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, al menos un grupo Z es -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde X<sup>x</sup> es halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

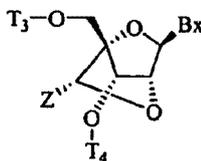
En una realización, cada grupo Z es, independientemente, -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es, independientemente, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, cada grupo Z es, independientemente, -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es, independientemente, halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

En una realización, al menos un Z es CH<sub>3</sub>-. En otra realización, cada Z es, CH<sub>3</sub>-.

En una realización, el grupo Z de al menos un monómero está en la configuración (R) representada por la fórmula:



o la fórmula:



En otra realización, el grupo Z de cada monómero de la fórmula está en configuración (R).

En una realización, el grupo Z de al menos un monómero está en la configuración (S) representada por la fórmula:

5 En una realización, al menos un grupo sustituyente es hidroxilo (p. ej., al menos un Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más hidroxilo). En otra realización, cada grupo sustituyente es, independientemente, hidroxilo (p. ej., cada Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más hidroxilo). En otra realización, al menos un Z es HOCH<sub>2</sub>-. En otra realización, cada Z es HOCH<sub>2</sub>-.

10 En una realización, al menos un Z es CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>F- o HOCH<sub>2</sub>-. En otra realización, cada Z es, independientemente, CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>F- o HOCH<sub>2</sub>-.

15 En una realización, al menos un grupo Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es, independientemente, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, al menos un grupo Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es, independientemente, halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

20 En una realización, cada grupo Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es independientemente OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, cada grupo Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con uno o más X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es independientemente halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

25 En una realización, al menos un grupo Z es -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde X<sup>x</sup> es OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, al menos un grupo Z es -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde X<sup>x</sup> es halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

30 En una realización, cada grupo Z es, independientemente, -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es, independientemente, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o CN; donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En otra realización, cada grupo Z es, independientemente, -CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>, donde cada uno de X<sup>x</sup> es, independientemente, halo (p. ej., flúor), hidroxilo, alcoxi (p. ej., CH<sub>3</sub>O-) o azido.

35 En una realización, al menos un Z es CH<sub>3</sub>-. En otra realización, cada Z es, CH<sub>3</sub>-.

En una realización, el grupo Z de al menos un monómero está en la configuración (R) representada por la fórmula:



o la fórmula:



En otra realización, el grupo Z de cada monómero de la fórmula está en configuración (R).

En una realización, el grupo Z de al menos un monómero está en la configuración (S) representada por la fórmula:

60

65

En otra realización de la presente invención se proporcionan compuestos oligoméricos que tienen de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. En una realización adicional el compuesto oligomérico comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. En una nueva realización los compuestos oligoméricos comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. En otra realización los compuestos oligoméricos comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud.

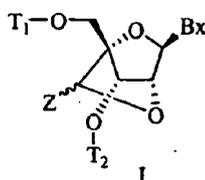
También se proporcionan compuestos para su uso en un método terapéutico para inhibir la expresión génica que comprende poner en contacto una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico de la invención.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente solicitud proporciona nucleósidos bicíclicos modificados en la posición 6, y la presente invención proporciona compuestos oligoméricos y composiciones preparadas de allí. También se describen intermedios sintéticos novedosos, y métodos para preparar los nucleósidos, los compuestos oligoméricos, las composiciones, e intermedios sintéticos novedosos. Más concretamente, la presente invención proporciona oligómeros y composiciones preparadas de nucleósidos que tienen un puente entre las posiciones 4' y 2' de la porción ribosa que tiene la fórmula: 2'-O-C(H)(Z)-4' y oligómeros y composiciones preparadas de allí. En una realización preferida, Z está en una configuración concreta que proporciona el isómero (*R*) o el isómero (*S*). En algunas realizaciones, los compuestos oligoméricos y las composiciones de la presente invención se diseñan para que hibriden con una porción de un ARN diana. En otra realización, los compuestos oligoméricos de la presente invención se pueden utilizar en el diseño de aptámeros que son compuestos oligoméricos susceptibles de unirse a proteínas aberrantes en un escenario in vivo.

Los nucleósidos bicíclicos de la presente invención son útiles para potenciar las propiedades deseadas de los compuestos oligoméricos en los que se incorporan. Los oligómeros de la presente invención pueden ser útiles también como cebadores y sondas en aplicaciones de diagnóstico. En una realización preferida los nucleósidos bicíclicos modificados en la posición 6 de la presente invención tienen la estructura mostrada más abajo:

En un aspecto la presente invención divulgación proporciona nucleósidos bicíclicos que tienen la fórmula I:



donde:

Bx es un radical alcalino heterocíclico;

T<sub>1</sub> es H o un grupo protector de hidroxilo;

T<sub>2</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo; y

Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilideno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilideno C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquilideno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquilideno C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol, o tio sustituido.

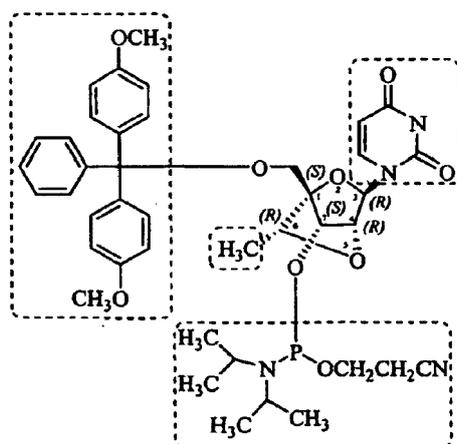
En una realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes protegidos opcionalmente seleccionados independientemente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> y CN, donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>,

En un aspecto de la presente divulgación se preparan nucleósidos bicíclicos que tienen grupos reactivos protegidos ortogonalmente y que comprenden adicionalmente un grupo fósforo reactivo. Tales nucleósidos bicíclicos son útiles como monómeros para la síntesis de oligómeros. Un ejemplo ilustrativo de tal monómero del nucleósido bicíclico tiene la fórmula:

5

10

15



20

donde los grupos rodeados por los rectángulos de líneas discontinuas son variables. El grupo de la posición 6 se puede preparar también en configuración *S* (obsérvese que las denominaciones *R* y *S* pueden variar dependiendo de los grupos de las posiciones variables). El monómero del nucleósido bicíclico mostrado es referido genéricamente como dimetoxitritil fosforamidita o más formalmente utilizando la nomenclatura de denominación de la IUPAC como (1*S*,3*R*,4*R*,6*R*,7*S*)-7-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)-fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano.

25

30

35

Los nucleósidos bicíclicos modificados en la posición 6 descritos en la presente son útiles para modificar de otro modo compuestos oligoméricos no modificados en una o más posiciones. Tales compuestos oligoméricos modificados se pueden describir por tener un motivo particular. Los motivos susceptibles a la presente invención incluyen pero no están limitados a un motivo interrumpido, un motivo hemímero, un motivo blocámero, un motivo completamente modificado, un motivo modificado posicionalmente y un motivo alternante. Junto con estos motivos se pueden utilizar una gran variedad de enlaces incluyendo pero no limitados a enlaces fosfodiéster y fosforotioato utilizados uniformemente o combinados. El posicionamiento de los nucleósidos bicíclicos modificados en la posición 6 y el uso de las estrategias de enlace se pueden optimizar fácilmente para la mejor actividad para un objetivo concreto. Las patentes de los Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de los motivos representativos incluyen, pero no están limitadas a, 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.052.355; 5.652.356; y 5.700.922, algunas de las cuales son del mismo propietario que la presente solicitud. Los motivos también se describen en las Solicitudes Internacionales PCT/US2005/019219, presentada el 2 de Junio de 2005 y publicada como WO 2005/121371 en 22 de Diciembre de 2005 y PCT/US2005/01920, presentada el 2 de Junio de 2005 y publicada como WO 2005/121372 el 22 de Diciembre de 2005.

40

45

Los términos "compuesto estable" y "estructura estable" están destinados a indicar un compuesto que es suficientemente robusto para superar el aislamiento hasta un grado útil de pureza en una mezcla de reacción, y su formulación en un agente terapéutico eficaz. En la presente memoria únicamente se contemplan compuestos estables.

50

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

55

Los sustituyentes recursivos son un aspecto pretendido de la invención. Un experto normal en la técnica de la química médica y orgánica entiende la versatilidad de tales sustituyentes. En la medida en que están presentes los sustituyentes recursivos en una reivindicación de la invención, se determinará el número total como se ha mostrado antes.

60

El término "alquilo", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado saturado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no están limitados 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<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) siendo más preferido de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. El término "alquilo inferior" según se utiliza en la presente memoria incluye de 1 a

65

aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

5 El término "alquenilo", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un enlace doble carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no están limitados a, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alquenilo incluyen típicamente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono siendo más preferido de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo según se  
10 utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

15 El término "alquinilo", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un enlace triple carbono-carbono. Los ejemplos de los grupos alquinilo incluyen, pero no están limitados 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 preferido de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquinilo según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

20 El término "aminoalquilo" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical alquilo sustituido con amino. Se pretende que este término incluya grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que tienen un sustituyente amino en cualquier posición y donde el grupo alquilo une el grupo aminoalquilo a la molécula de origen. Las porciones alquílica y/o amínica del grupo aminoalquilo pueden estar sustituidas adicionalmente con grupos sustituyentes.

25 El término "alifático", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono donde la saturación entre dos átomos de carbono cualesquiera es un enlace sencillo, doble o triple. Un grupo alifático contiene preferiblemente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono siendo más preferido de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático  
30 puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Tales grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen sin limitación grupos polialcoxi, tales como polialquilenglicoles, poliaminas, y poliiminas. Los grupos alifáticos según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

35 El término "alicíclico" o "alíciclico" hace referencia a un sistema anular cíclico donde el anillo es alifático. El sistema anular puede comprender uno o más anillos donde al menos un anillo es alifático. Los grupos alicíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo. Alicíclico según se utiliza en la presente memoria puede incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

40 El término "alcoxi", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno donde el átomo de oxígeno se utiliza para unir el grupo alcoxi a una molécula de origen. Los ejemplos de los grupos alcoxi incluyen, pero no están limitados a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, *n*-pentoxi, neopentoxi, *n*-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.  
45

Los términos "halo" y "halógeno", según se utilizan en la presente memoria, hacen referencia a un átomo seleccionado entre flúor, cloro, bromo y yodo.

50 Los términos "arilo" y "aromático", según se utiliza en la presente memoria, hacen referencia a radicales de sistemas anulares carbocíclicos mono- o policíclicos que tienen uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de los grupos arilo incluyen, pero no están limitados a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares. Los sistemas anulares arílicos preferidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.  
55

Los términos "aralquilo" y "arilalquilo", según se utilizan en la presente memoria, hacen referencia a un radical formado entre un grupo alquilo y un grupo arilo donde el grupo alquilo se utiliza para unir el grupo aralquilo a la molécula de origen. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, bencilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales unidos a los grupos alquilo, arilo o ambos que forman el grupo radical.  
60

El término "radical heterocíclico" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical de sistema anular mono-, o poli-cíclico que incluye al menos un heteroátomo y es insaturado, parcialmente saturado o completamente saturado, incluyendo de ese modo grupos heteroarilo. También se pretende que heterocíclico incluya sistemas anulares fusionados donde uno o más de los anillos fusionados contienen al menos un heteroátomo y los  
65

5 otros anillos pueden contener uno o más heteroátomos u opcionalmente no contienen heteroátomos. Un grupo heterocíclico incluye típicamente al menos un átomo seleccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de los grupos heterocíclico incluyen, [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y similares. Los grupos heterocíclicos según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

10 Los términos "heteroarilo", y "heteroaromático", según se utiliza en la presente memoria, hacen referencia a un radical que comprende un sistema anular de anillo aromático mono- o poli-cíclico, o sistema anular fusionado donde al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. También se pretende que heteroarilo incluya sistemas anulares fusionados incluyendo sistemas donde uno o más de los anillos fusionados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo incluyen típicamente un átomo anular seleccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de los grupos heteroarilo incluyen, pero no están limitados a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, benzoxazolilo, quinoxalinilo, y similares. Los radicales heteroarilo se pueden unir a la molécula de origen directamente o a través de un radical conector tal como un grupo alifático o heteroátomo. Los grupos heteroarilo según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

20 El término "heteroarilalquilo", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un grupo heteroarilo como se ha definido previamente que tiene un radical alquilo que puede unir el grupo heteroarilalquilo grupo a una molécula de origen. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, piridinilmetilo, pirimidiniletilo, naftiridinilpropilo y similares. Los grupos heteroarilalquilo según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales en uno o ambos de las porciones heteroarilica o alquilica.

25 El término "estructura mono- o poli-cíclica" según se utiliza en la presente invención incluye todos los sistemas anulares que son sencillos o policíclicos que tienen anillos que están fusionado o unidos y se pretende que sea inclusivo de sistemas anulares sencillos y mixtos seleccionados individualmente entre alifático, alicíclico, arílico, heteroarílico, aralquílico, arilalquílico, heterocíclico, heteroarílico, heteroaromático, heteroarilalquílico. Tales estructuras mono y poli cíclicas pueden contener anillos que son uniformes o tienen grados variables de saturación incluyendo completamente saturados, parcialmente saturados o completamente insaturados. Cada anillo puede comprender átomos anulares seleccionados entre C, N, O y S para dar lugar a anillos heterocíclico así como anillos que comprenden únicamente átomos de C anulares que pueden estar presentes en un motivo mixto tal como por ejemplo benzimidazol donde un anillo tiene sólo átomos de carbono anulares y el anillo fusionado tiene dos átomos de nitrógeno. Las estructuras mono o poli cíclicas pueden estar sustituidas adicionalmente con grupos sustituyentes tales como por ejemplo ftamimida que tiene dos grupos =O unidos a uno de los anillos. En otro aspecto, las estructuras mono o poli cíclicas se pueden unir a una molécula de origen directamente a través de un átomo anular, a través de un grupo sustituyente o un radical conector bifuncional.

40 El término "acilo", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical formado eliminando un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general -C(O)-X donde 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 según se utilizan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

45 El término "hidrocarbilo" incluye grupos que comprenden C, O y H. Están incluidos 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 polisustituidos con uno o más grupos sustituyentes.

50 Se pretende que los términos "sustituyente" y "grupo sustituyente", según se utilizan en la presente memoria, incluyan grupos que se añaden típicamente a otros grupos o compuestos parentales para potenciar las propiedades deseadas o proporcionar los efectos deseados. Los grupos sustituyentes pueden estar protegidos o no protegidos y se pueden añadir a un sitio disponible o a muchos sitios disponibles en un compuesto parental. Los grupos sustituyentes pueden estar sustituidos también adicionalmente con otros grupos sustituyentes y se pueden unir directamente o vía grupo conector tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo a un compuesto parental. Tales grupos incluyen sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquínilo, acilo (-C(O)R<sub>aa</sub>), carboxilo (-C(O)O-R<sub>aa</sub>), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxi sustituido (-O-R<sub>aa</sub>), arilo, aralquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-NR<sub>bb</sub>R<sub>cc</sub>), imino(=NR<sub>bb</sub>), amido (-C(O)N-R<sub>bb</sub>R<sub>cc</sub> o -N(R<sub>bb</sub>)C(O)R<sub>aa</sub>), azido (-N<sub>3</sub>), nitro (-NO<sub>2</sub>), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)NR<sub>bb</sub>R<sub>cc</sub> o -N(R<sub>bb</sub>)C(O)OR<sub>aa</sub>), ureido (-N(R<sub>bb</sub>)C(O)NR<sub>bb</sub>R<sub>cc</sub>), tioureido (-N(R<sub>bb</sub>)C(S)NR<sub>bb</sub>R<sub>cc</sub>), guanidinilo (-N(R<sub>bb</sub>)C(=NR<sub>bb</sub>)NR<sub>bb</sub>R<sub>cc</sub>), amidinilo (-C(=NR<sub>bb</sub>)NR<sub>bb</sub>R<sub>cc</sub> o -N(R<sub>bb</sub>)C(NR<sub>bb</sub>)R<sub>aa</sub>), tiol (-SR<sub>bb</sub>), sulfínilo (-S(O)R<sub>bb</sub>), sulfonilo (-S(O)<sub>2</sub>R<sub>bb</sub>), sulfonamidilo (-S(O)<sub>2</sub>NR<sub>bb</sub>R<sub>cc</sub> o -N(R<sub>bb</sub>)-S(O)<sub>2</sub>R<sub>bb</sub>) y grupos conjugados. Donde cada R<sub>aa</sub>, R<sub>bb</sub> y R<sub>cc</sub> es, independientemente, H, un grupo funcional químico unido opcionalmente o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida incluyendo sin limitación H, alquilo, alqueno, alquínilo, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo.

El término "oxo" hace referencia al grupo (=O).

5 Los compuestos (p. ej., nucleósidos bicíclicos) descritos en la presente memoria se pueden preparar mediante cualquiera de los mecanismos aplicables de síntesis orgánica, como, por ejemplo, se ilustra en los ejemplos siguientes. Muchos de tales mecanismos son bien conocidos en la técnica. No obstante, muchos de los mecanismos conocidos se elaboran 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 March, J., Advanced Organic Chemistry, 3<sup>a</sup> Edición, John Wiley & Sons, New York (1985); Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry, En 9 Volúmenes, Barry M. Trost, Editor-in-Chief, Pergamon Press, New York (1993); Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis, 4<sup>a</sup> Ed.; Carey and Sundberg; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York (2001); Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, y Structure, 2<sup>a</sup> Edición, March, McGraw Hill (1977); Protecting Groups in Organic Synthesis, 2<sup>a</sup> Edición, Greene, T.W., y Wutz, P.G.M., John Wiley & Sons, New York (1991); y Comprehensive Organic Transformations, 2<sup>a</sup> Edición, Larock, R.C., John Wiley & Sons, New York (1999).

20 En un aspecto de la presente invención los compuestos oligoméricos se modifican mediante unión covalente de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico unido incluyendo pero no limitadas a farmacodinámica, farmacocinética, unión, absorción, distribución celular, absorción celular, carga y aclaramiento. Se utilizan rutinariamente grupos conjugados en las técnicas químicas y se unen directamente o a través de un radical conector o grupo conector opcional a un compuesto parental tal como un compuesto oligomérico. Una lista preferida de grupos conjugados incluye sin limitación, intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolesteroles, radicales ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

30 Los grupos conectores o los radicales conectores bifuncionales tales como los conocidos en la técnica con adecuados para la presente invención. Los grupos conectores son útiles para el anclaje de grupos funcionales químicos, grupos conjugados; grupos informadores y otros grupos a sitios selectivos en un compuesto parental tal como por ejemplo un compuesto oligomérico. En general un radical conector bifuncional comprende un radical hidrocarbilo que tiene dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona para que se una a una molécula parental o compuesto de interés y el otro se selecciona para que se una esencialmente a cualquier grupo seleccionado tal como un grupo funcional químico o un grupo conjugado. En algunas realizaciones, el conector comprende una estructura en cadena o un oligómero de unidades repetitivas tales como unidades de etilenglicol o aminoácidos. Los ejemplos de los grupos funcionales que se utilizan rutinariamente en radicales conectores bifuncionales incluyen, pero no están limitados a, electrófilos para reaccionar con grupos nucleofílicos y nucleófilos para reaccionar con grupos electrofílicos. En algunas realizaciones, los radicales conectores bifuncionales incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (p. ej., enlaces dobles o triples), y similares. Algunos ejemplos no limitantes de radicales conectores bifuncionales incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) y ácido 6-aminohexanoico (AHEx o AHA). Otros grupos conectores incluyen, pero no están limitados a, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sustituido o no sustituido o alquino C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sustituido o no sustituido, donde una lista no limitante de grupos sustituyentes preferidos incluye hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

50 El término "grupo protector", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un radical químico lábil que se sabe en la técnica que protege grupos reactivos incluyendo sin limitación, grupos hidroxilo, amino y tiol, de reacciones no deseadas durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores se utilizan típicamente selectivamente y/u ortogonalmente para proteger los sitios durante las reacciones en otros sitios reactivos y se pueden retirar después para dejar el grupo no protegido tal cual o disponible para nuevas reacciones. Los grupos protectores conocidos en la técnica son descritos generalmente por Greene y Wuts, en Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>a</sup> edición, John Wiley & Sons, New York (1999).

55 Los grupos se pueden incorporar selectivamente a los compuestos oligoméricos de la invención como precursores. Por ejemplo un grupo amino se puede colocar en un compuesto de la invención como un grupo azido que se puede convertir químicamente en el grupo amino en un punto deseado de la síntesis. Generalmente, los grupos se protegen o se presentan como precursores que serán inertes para las reacciones que modifican otras zonas de la molécula parental para su conversión en grupos finales en el momento apropiado. Los grupos protectores o precursores ilustrativos son comentados por Agrawal, et al., en Protocols for Oligonucleotide Conjugates, Eds, Humana Press; New Jersey, 1994; Vol. 26 págs. 1-72.

65 Los ejemplos de los grupos protectores de hidroxilo incluyen, pero no están limitados a, acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropirano, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, bis(2-acetoxietoxi)metilo (ACE), 2-trimetilsililetilo, trimetilsililo,

5 trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, [(trisiopropilsilil)oxi]metilo (TOM), benzoilformiato, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloilo, benzoilo, p-fenilbenzoilo, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato, tosilato, trifenilmetilo (tritol), 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). Donde los grupos protectores de hidroxilo más preferidos incluyen, pero no están limitados a, bencilo, 2,6-diclorobencilo, t-butildimetilsililo, t-butil-difenilsililo, benzoilo, mesilato, tosilato, dimetoxitritilo (DMF), 9-fenilxantin-9-ilo (Pixilo) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX).

10 Los ejemplos de los grupos protectores de amino incluyen, pero no están limitados a, grupos protectores carbamato, tales como 2-trimetilsililetoxicarbonilo (Teoc), 1-metil-1-(4-bifenilil)-etoxicarbonilo (Bpoc), t-butoxicarbonilo (BOC), aliloxicarbonilo (Alloc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), y benciloxicarbonilo (Cbz); grupos protectores de amida, tales como formilo, acetilo, trihaloacetilo, benzoilo, y nitrofenilacetilo; grupos protectores de sulfonamida, tales como 2-nitrobenzenosulfonilo; grupos protectores de imina e imida cíclica, tales como ftalimido y ditiasuccinoilo.

15 Los ejemplos de los grupos protectores tiol incluyen, pero no están limitados a, trifenilmetilo (tritol), bencilo (Bn), y similares.

20 En algunas realizaciones preferidas se preparan compuestos oligoméricos conectando nucleósidos con conexiones internucleósido que contienen fósforo opcionalmente protegido. Los grupos protectores representativos para las conexiones internucleósido que contienen fósforo tales como conexiones fosfodiéster y fosforotioato incluyen grupos  $\beta$ -cianoetilo, difenilsililetilo,  $\delta$ -cianobutenilo, ciano p-xililo (CPX), W-metil-N-trifluoroacetiletilo (META), acetoxifenoxietilo (APE) y buten-4-ilo. Véanse por ejemplo las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.725.677 y Re. 34.069 ( $\beta$ -cianoetilo); Beaucage, S.L. y Iyer, R.P., Tetrahedron, 49 Núm. 10, págs. 1925-1963 (1993); Beaucage, S.L. e Iyer, R.P., Tetrahedron, 49 Núm. 46, págs. 10441-10488 (1993); Beaucage, S.L. y Iyer, P.P., Tetrahedron, 48 Núm. 12, págs. 2223-2311 (1992).

30 Según se utiliza en la presente memoria, El término "protegidos ortogonalmente" hace referencia a grupos funcionales que están protegidos con diferentes clases de grupos protectores, donde cada una de las clases de grupo protector se puede separar en cualquier orden y en presencia de todas las demás clases (véase, Barany, G. y Merrifield, R.B., J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 7363; ídem, 1980, 102, 3084). La protección ortogonal se utiliza ampliamente por ejemplo en la síntesis de oligonucleótidos automática. Un grupo funcional se desbloquea en presencia de uno o más de otros grupos funcionales protegidos que no resultan afectados por el procedimiento de desbloqueo. Este grupo funcional desbloqueado se hace reaccionar de alguna manera y en algún punto se separa un grupo protector ortogonal adicional bajo un conjunto diferente de condiciones de reacción. Esto permite que la química selectiva llegue a un compuesto o compuestos oligoméricos deseados.

40 La presente invención proporciona compuestos que tienen grupos fósforo reactivos útiles para formar conexiones internucleósido incluyendo por ejemplo conexiones internucleósido fosfodiéster y fosforotioato. Tales grupos fósforo reactivos son conocidos en la técnica y contienen átomos de fósforo en estado de valencia P<sup>III</sup> o P<sup>V</sup> incluyendo, pero no limitados a, fosforamidita, H-fosfonato, triésteres fosfato y auxiliares quirales que contienen fósforo. Una síntesis en fase sólida preferida utiliza fosforamiditas (química P<sup>III</sup>) como fosfitos reactivos. Los compuestos fosfito intermedios se oxidan con posterioridad al estado P<sup>V</sup> utilizando métodos conocidos para producir, en realizaciones preferidas, conexiones internucleótido fosfodiéster o fosforotioato. Los fosfatos y fosfitos reactivos adicionales se describen en Tetrahedron Report Number 309 (Beaucage y Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311).

45 Los ejemplos específicos de los compuestos oligoméricos útiles en esta invención incluyen oligonucleótidos que contienen conexiones internucleósido de origen no natural, p. ej. modificadas. Dos clases principales de conexiones internucleósido se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Las conexiones internucleósido modificadas que tienen un átomo de fósforo incluyen, pero no están limitadas a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquil-fosfotriésteres, metil- y otros alquil-fosfonatos incluyendo 3'-alquilenfosfonatos, 5'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquifosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquifosfonatos, tionoalquifosfotriésteres, esclenofosfatos y boranofosfatos que tienen conexiones 3'-5' normales, análogos con conexiones 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida donde una o más conexiones internucleótido es una conexión 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos que tienen polaridad invertida pueden comprender una conexión 3' a 3' sencilla en la conexión internucleótido más 3' esto es un residuo del nucleósido invertido sencillo que puede ser abásico (la nucleobase se pierde o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas ácidas libres.

60 Las patentes de los Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no están limitadas a los documentos, U.S.: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.102; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.918; 5.672.697 y 5.625.050, algunas de las cuales son del mismo propietario que esta solicitud.

Los enlaces internucleósido modificados que no tienen un átomo de fósforo incluyen, pero no están limitados a, aquellos que están formados por conexiones internucleósido alquílicas o cicloalquílicas de cadena corta, conexiones internucleósido mixtas de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o una o más conexiones internucleósido heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estas incluyen aquellas que tienen esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formaceto y tioformaceto; esqueletos de etilformaceto y tioformaceto; esqueleto de riboaceto; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metiliminino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH<sub>2</sub> mixtas.

Las patentes de los Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no están limitadas a los documentos, U.S.: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439, algunas de las cuales son del mismo propietario que esta solicitud.

Los compuestos descritos en la presente memoria contienen uno o más centros asimétricos y de este modo dan lugar a enantiómeros, diastereómeros, y otras formas estereoisoméricas que pueden ser definidas, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-,  $\alpha$  o  $\beta$ , o como (D)- o (L)- como para los aminoácidos. Se pretende que la presente invención incluya todos estos posibles isómeros, así como sus formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros ópticos se pueden preparar a partir de sus respectivos precursores ópticamente activos mediante los procedimientos descritos antes, o resolviendo las mezclas racémicas. La resolución se puede llevar a cabo en presencia de un agente de resolución, mediante cromatografía o mediante cristalización repetida o mediante una combinación de estos mecanismos que son conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden encontrar detalles adicionales referentes a resoluciones en Jacques, et al., *Enantiomers, Racemates, and Resolutions* (John Wiley & Sons, 1981). Cuando los compuestos descritos en la presente memoria contienen dobles enlaces olefínicos, otras insaturaciones, u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique de otro modo, se pretende que los compuestos incluyan los isómeros geométricos tanto E como Z o isómeros cis y trans. Del mismo modo, también se pretende incluir todas las formas tautoméricas. También se pretende incluir la configuración de cualquier doble enlace carbono-carbono. La configuración de cualquier doble enlace carbono-carbono que aparece en la presente memoria se selecciona solamente por conveniencia y no se pretende designar una configuración concreta a menos que el texto lo establezca de ese modo; así un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-heteroátomo representado arbitrariamente en la presente memoria como trans puede ser cis, trans, o una mezcla de los dos en cualquier proporción.

En el contexto de la presente invención, el término "compuesto oligomérico" hace referencia a un polímero que tiene al menos una región que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico. El término "compuesto oligomérico" incluye oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos y oligonucleósidos así como miméticos de nucleótido y/o polímeros mixtos que comprenden componentes de ácido nucleico y no de ácido nucleico. Los compuestos oligoméricos se preparan rutinariamente pero se pueden reunir o preparar de otro modo para que sean circulares y también pueden incluir ramificaciones. Los compuestos oligoméricos pueden formar constructos de doble hebra tales como por ejemplo dos hebras hibridadas para formar composiciones de doble hebra. Las composiciones de doble hebra pueden estar conectadas o separadas y pueden incluir salientes en los extremos. En general, un compuesto oligomérico comprende un esqueleto de subunidades monoméricas conectadas donde cada subunidad monomérica conectada está anclada directa o indirectamente a un radical de una base heterocíclica. Los compuestos oligoméricos también pueden incluir subunidades monoméricas que no están conectadas a un radical de una base heterocíclica proporcionando de ese modo sitios sin base. Las conexiones que unen las subunidades monoméricas, los radicales de azúcar o sucedáneos y los radicales de bases heterocíclicas pueden ser modificados independientemente. La unidad de azúcar de conexión, que puede incluir o no una base heterocíclica, puede ser sustituida por un mimético tal como los monómeros de ácidos nucleicos peptídicos. La capacidad para modificar o sustituir porciones o monómeros completos en cada posición de un compuesto oligomérico da lugar a un gran número de motivos posibles.

Como es sabido en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de la base del nucleósido es normalmente un radical de una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son purinas y pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen adicionalmente un grupo fosfato conectado covalentemente a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, se puede conectar el grupo fosfato al radical hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato se conectan covalentemente a nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal se pueden unir para formar una estructura circular por hibridación o por formación de un enlace covalente, no obstante, generalmente se desean estructuras lineales abiertas. En la estructura del oligonucleótido, se alude comúnmente a que los grupos fosfato forman las conexiones internucleósido del oligonucleótido. La conexión internucleósido normal de ARN y ADN es una conexión fosfodiéster 3' a 5'.

En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" hace referencia a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN). Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases de origen natural, azúcares y conexiones internucleósido covalentes. El término "análogo de oligonucleótido" hace referencia a oligonucleótidos que tienen una o más porciones de origen no natural. Tales oligonucleótidos de origen no natural a menudo se desean por encima de las formas naturales debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo, mayor absorción celular, mayor afinidad por dianas de ácido nucleico y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

En el contexto de esta invención, el término "oligonucleósido" hace referencia a una secuencia de nucleósidos que se unen por enlaces internucleósido que no tienen átomos de fósforo. Las conexiones internucleósido de este tipo incluyen alquilo de cadena corta, cicloalquilo, alquil-heteroátomos mixtos, cicloalquil-heteroátomos mixtos, uno o más heteroátomos de cadena corta y uno o más heterociclos de cadena corta. Estas conexiones internucleósido incluyen, pero no están limitadas a, siloxano, sulfuro, sulfóxido, sulfona, acetilo, formacético, tioformacético, metilformacético, tioformacético, alqueno, sulfamato, metilenimino, metilhidrazino, sulfonato, sulfonamida, amida y otros que tienen partes componentes N, O, S y CH<sub>2</sub> mixtas.

Las Patentes de los Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no están limitadas a, los documentos U.S.: 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; 5.61 8.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439, algunos de los cuales son del mismo propietario que esta solicitud.

Se pretende que el término "nucleobase" o "radical de base heterocíclica" según se utiliza en la presente memoria, sea sinónimo de "base de ácido nucleico o mimético de la misma". En general, una nucleobase es cualquier subestructura que contenga uno o más átomos o grupos de átomos capaces de formar puentes de hidrógeno con una base de un ácido nucleico.

Según se utiliza en la presente memoria, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, derivados 2-propil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C=C-CH<sub>3</sub>) uracilo y citosina y otros derivados alquilo de bases de pirimidina y otras adeninas y guainas sustituidas en la posición 8, 5-halo concretamente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina, 3-desazaguanina y 3-desazaadenina, bases universales, bases hidrofóbicas, bases promiscuas, bases de tamaño ampliado, y bases fluoradas como las definidas en la presente memoria. Las nucleobases modificadas adicionalmente incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazin-citidin(1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazin-citidin(1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), pinzas G tales como una fenoxazin-citidina sustituida (p. ej. 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b]-[1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol-citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol-citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo-[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina es remplazada por otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las bases adicionales incluyen aquellas descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 3.687.808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613, y las descritas por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993.

Las nucleobases modificadas incluyen, pero no están limitadas a, bases universales, bases hidrofóbicas, bases promiscuas, bases de tamaño ampliado, y bases fluoradas como se definen en la presente memoria. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en las posiciones N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, se ha demostrado que las sustituciones 5-propiniluracilo y 5-propinil-citosina, 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son preferidas en la actualidad las sustituciones de bases, incluso más concretamente cuando se combinan con modificaciones de Azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de los Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de algunas de las nucleobases modificadas así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no están limitadas a, los documentos indicados antes U.S. 3.687.808. así como los documentos U.S.: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066;

5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; y 5.681.941, algunos de los cuales son del mismo propietario que la presente solicitud, y la patente de los Estados Unidos 5.750.692, que es del mismo propietario que la presente solicitud.

5  
10  
15  
Los compuestos oligoméricos de la presente invención también pueden contener uno o más nucleósidos que tienen radicales azúcar modificados. El anillo de azúcar de furanosilo se puede modificar de numerosas maneras incluyendo la sustitución con un grupo sustituyente, la formación de puentes para formar un BNA y la sustitución del grupo 4'-O con un heteroátomo tal como S o N(R). Algunas patentes de los Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de tales azúcares modificados incluyen, pero no están limitadas a los documentos, U.S.: 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; 5.100.920; 6.600.032 y la Solicitud Internacional PCT/US2005/019219, presentada el 2 de Junio, de 2005 y publicada como documento WO 2005/121371 el 22 de Diciembre, de 2005 algunas de las cuales son del mismo propietario que la presente solicitud. Una lista representativa de los azúcares modificados preferidos incluye pero no está limitada a azúcares sustituidos que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH<sub>2</sub> o 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>; azúcares modificados con 4'-tio y azúcares modificados bicíclicos.

20  
25  
Según se utiliza en la presente memoria se pretende que el término "mimético de nucleósido" incluya aquellas estructuras utilizadas para remplazar el azúcar o el azúcar y la base, no el enlace, en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como por ejemplo miméticos de nucleósidos que tienen miméticos de azúcares con morfolino o biciclo[3,1,0]hexilo p. ej. unidades de azúcar distintas de furanosa con un enlace fosfodiéster. El término "sucedáneo de azúcar" se solapa con el término ligeramente más amplio "mimético de nucleósido" pero solamente se pretende indicar la sustitución de la unidad de azúcar (anillo de furanosa). Se pretende que el término "mimético de nucleótido" incluya aquellas estructuras utilizadas para sustituir el nucleósido y el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como por ejemplo péptidos, ácidos nucleicos o morfolinos (morfolinos conectados por un enlace -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster).

30  
35  
Los compuestos oligoméricos de acuerdo con la presente invención comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. Un experto normal en la técnica apreciará que la realización comprende 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, 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, 7S, 76, 77, 78, 79, o 80 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud, o cualquiera de sus intervalos.

40  
En otra realización los compuestos oligoméricos de la invención tienen de 8 a 40 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. Un experto normal en la técnica apreciará que ésta abarca 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 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud, o cualquiera de sus intervalos.

45  
En otra realización, los compuestos oligoméricos de la invención tienen de 8 a 20 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. Un experto normal en la técnica apreciará que ésta abarca compuestos oligoméricos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud, o cualquiera de sus intervalos.

50  
En otra realización, los compuestos oligoméricos de la invención tienen de 10 a 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. Un experto normal en la técnica apreciará que ésta abarca compuestos oligoméricos de 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud, o cualquiera de sus intervalos.

55  
En otra realización, los compuestos oligoméricos de la invención tienen de 10 a 14 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud. Un experto normal en la técnica apreciará que ésta abarca compuestos oligoméricos de 10, 11, 12, 13 o 14 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud, o cualquiera de sus intervalos.

60  
Los compuestos oligoméricos quiméricos tienen nucleósidos modificados diferencialmente en dos o más posiciones y se definen generalmente por tener un motivo. Los compuestos oligoméricos quiméricos de la invención se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se ha descrito más arriba. Las patentes de los Estados Unidos que ilustran la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no están limitadas a los documentos, U.S.: 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 propietario que la presente solicitud.

65  
La oligomerización de nucleósidos y sus miméticos modificados o no modificados, en un aspecto de la

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

El equipamiento asequible comercialmente utilizado rutinariamente para la síntesis de compuestos oligoméricos y compuestos relacionados basada en medios de soporte es comercializado por varios proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Alternativamente se puede emplear cualquier otro método para semejante síntesis conocido en la técnica. Los mecanismos en fase sólida adecuados, incluyendo los mecanismos de síntesis automatizada, son descritos por F. Eckstein (ed.), Oligonucleótidos 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 ha sido creciente en cuanto a los esfuerzos para incrementar el ARNi. Las estrategias de síntesis de ARN primario que se están utilizando comercialmente en la actualidad incluyen 5'-O-DMT-2'-O-t-butildimetilsililo (TBDMS), 5'-O-DMT-2'-O-[1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo] (FPMP), 2'-O-[(trisisopropilsilil)oxi]metilo (2'-O-CH<sub>2</sub>-O-Si(iPr)<sub>3</sub> (TOM), y el 5'-O-sililéter-2'-ACE (5'-O-bis(trimetilsiloxi)ciclododeciloxisililéter (DOD)-2'-O-bis(2-acetoxietoxi)metil (ACE). Una lista actual de algunas de las principales compañías que ofrecen actualmente productos de ARN incluye Pierce Nucleic Acid Technologies, Dharmacon Research Inc., Ameri Biotechnologies Inc., e Integrated DNA Technologies, Inc. Una compañía, Princeton Separations, está comercializando un activador de la síntesis de ARN para reducir los tiempos de acoplamiento especialmente con químicas de TOM y TBDMS. Semejante activador sería adecuado para la presente invención.

Los grupos primarios que están siendo utilizados para la síntesis comercial de ARN son:

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

Todas las estrategias de síntesis de ARN mencionadas antes se proponen para la presente invención. Las estrategias que sean un híbrido de las anteriores, p. ej., utilizando un grupo protector de 5' de una estrategia con un protector de 2'-O de otra estrategia también se proponen para la presente invención.

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

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

"Complementario", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la capacidad de emparejamiento preciso de dos nucleobases con independencia de dónde estén localizadas las dos. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto oligomérico es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo el ácido nucleico diana ADN, ARN, o una molécula de oligonucleótido, se considera que la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana están en una posición complementaria. El compuesto oligomérico y la molécula de ADN, ARN, u oligonucleótido adicionales son complementarias entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias de cada molécula está ocupado por nucleobases que pueden unirse mediante puentes de hidrógeno entre sí. De este modo, "hibridable específicamente" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de emparejamiento preciso o complementariedad a lo largo de un número suficiente de nucleobases de manera que se produce una unión estable y específica entre el oligonucleótido y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser complementaria al

100% a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Por otra parte, un oligonucleótido puede hibridar a lo largo de uno o más segmentos de manera que los segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el evento de hibridación (p. ej., una estructura en bucle o una estructura en horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden comprender al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 99% de complementariedad de la secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácido nucleico a la cual están dirigidos. Por ejemplo, un compuesto oligomérico en el que 18 a 20 nucleobases del compuesto oligomérico son complementarias a una región diana, y por lo tanto hibridarían específicamente, representaría una complementariedad de 90 por ciento. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden ser agrupadas o intercaladas con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o a las nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto oligomérico que tiene 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría una complementariedad total de 77,8% con el ácido nucleico diana y por lo tanto entraría en el alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto oligomérico con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar rutinariamente utilizando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656).

Adicionalmente se incluyen en la presente invención compuestos oligoméricos tales como compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencias guía externas (EGS), empalmadores alternos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan al menos con una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos oligoméricos pueden ser introducidos en forma de compuestos oligoméricos de hebra sencilla, de doble hebra, circulares o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles. Una vez introducidos en un sistema, los compuestos oligoméricos de la invención pueden lograr la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la modificación del ácido nucleico diana.

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

Si bien una forma de compuesto oligomérico es un oligonucleótido antisentido de hebra sencilla, se ha demostrado que en muchas especies la introducción de estructuras de doble hebra, tales como moléculas de ARN de doble hebra (ARNdh), inducen una reducción mediada por antisentido potente y específica de la función de un gen o sus productos génicos asociados. Este fenómeno ocurre tanto en plantas como animales y se cree que tiene una conexión evolutiva con la defensa viral y el silenciamiento de transposones.

En algunas realizaciones, se pueden emplear "segmentos diana adecuados" en un escrutinio en busca de compuestos oligoméricos adicionales que modulan 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 comprenden al menos una porción de 8-nucleobases que es complementaria a un segmento diana adecuado. El método de escrutinio comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana adecuado de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína con uno o más moduladores candidato, y seleccionar en busca de uno o más moduladores candidato que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína. Una vez que se ha demostrado que el modulador o moduladores candidato son capaces de modular (p. ej. disminuir o aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido, se puede emplear el modulador para estudios de investigación adicionales de la función del péptido, o para su uso como agente de búsqueda, diagnóstico, o terapéutico de acuerdo con la presente invención.

Los segmentos diana adecuados de la presente invención también se pueden combinar con sus respectivos compuestos oligoméricos antisentido complementarios de la presente invención para formar oligonucleótidos de doble hebra estabilizados (dúplex). Se ha demostrado que tales radicales oligonucleotídicos de doble hebra modulan la expresión de la diana y regulan la traducción así como el procesamiento de ARN por medio de un mecanismo antisentido. Por otra parte, los radicales de doble hebra se pueden someter a modificaciones químicas (Fire et al., *Nature*, 1998, 391, 806-811; Timmons y Fire, *Nature* 1998, 395, 854; Timmons et al., *Gene*, 2001, 263, 103-112; Tabara et al., *Science*, 1998, 282, 430-431; Montgomery et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 15502-15507; Tuschl et al., *Genes Dev.*, 1999, 13, 3191-3197; Elbashir et al., *Nature*, 2001, 411, 494-498; Elbashir et al., *Genes Dev.* 2001, 15, 188-200). Por ejemplo, se ha demostrado que tales radicales de doble hebra inhiben la diana mediante hibridación clásica de la hebra antisentido del dúplex a la diana, desencadenando de ese modo la degradación enzimática de la diana (Tijsterman et al., *Science*, 2002, 295,

694-697).

Los compuestos oligoméricos de la presente invención también se pueden aplicar en las áreas de descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente invención comprende el uso de los compuestos oligoméricos y dianas identificadas en la presente memoria en los esfuerzos para el descubrimiento de fármacos para dilucidar las relaciones que existen entre las proteínas y un estado de enfermedad, un fenotipo, o una afección. Estos métodos incluyen la detección o modulación de un péptido diana que comprende poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos oligoméricos de la presente invención, medir el nivel de ácido nucleico o proteína de la diana y/o un criterio de valoración fenotípico o químico 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 métodos también se pueden realizar en paralelo o combinados con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de la diana o para determinar la validez de un producto génico concreto como diana para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, afección, o fenotipo concretos.

Se evalúa el efecto de las modificaciones de nucleósidos sobre la actividad del ARNi de acuerdo con las publicaciones existentes (Elbashir et al., *Nature* (2001), 411, 494-498; Nishikura et al., *Cell* (2001), 107, 415-416; y Bass et al., *Cell* (2000), 101, 235-238.)

Los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden ser utilizados para el diagnóstico, la terapia, la profilaxis y como reactivos de búsqueda y kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con una especificidad exquisita, son utilizados a menudo por los expertos en la técnica para dilucidar la función de genes concretos o para distinguir entre las funciones de diferentes miembros de una ruta biológica.

Para su uso en kits y diagnósticos, los compuestos oligoméricos de la presente invención, ya sean solos o combinados con otros compuestos oligoméricos o agentes terapéuticos, pueden ser utilizados como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para dilucidar patrones de expresión de una porción o del complemento completo de genes expresados en células y tejidos.

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

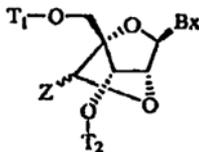
Los ejemplos de los métodos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen las matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 17-24; Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16), SAGE (análisis seriado de la expresión génica) (Madden, et al., *Drug Discov. Today*, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación con enzimas de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Jungblut, et al., *Electrophoresis*, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de etiquetas de secuencia expresada (EST) (Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143-57), toma de huellas de ARN sustractiva (SuRF) (Fuchs, et al., *Anal. Biochem.*, 2000, 286, 91-98; Larson, et al., *Cytometry*, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., *J. Cell Biochem. Suppl.*, 1998, 31, 286-96), técnicas FISH (hibridación fluorescente in situ) (Going y Gusterson, *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (To, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2000, 3, 235-41).

Los compuestos oligoméricos de la invención son útiles para la investigación y el diagnóstico, debido a que estos compuestos oligoméricos hibridan con ácidos nucleicos que codifican proteínas. Por ejemplo, los oligonucleótidos que se ha demostrado que hibridan con dicha eficacia y en dichas condiciones descritos en la presente memoria por ser inhibidores eficaces de proteínas también serán cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorezcan la amplificación o la detección génica, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas y en la amplificación de las moléculas de ácido nucleico para la detección o para el uso en estudios adicionales. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, concretamente los cebadores y sondas, de la invención con un ácido nucleico puede ser detectada mediante métodos conocidos en la técnica. Tales métodos pueden incluir la conjugación de una enzima con el oligonucleótido, el radiomarcaje del oligonucleótido o cualquier otro método de detección adecuado. También se pueden preparar kits que utilizan tales métodos de detección para detectar el nivel de proteínas seleccionadas en una muestra.

Otras realizaciones enumeradas:

1. Un nucleósido bicíclico que tiene la fórmula:

5



10

donde:

15

Bx es un radical alcalino heterocíclico;

T<sub>1</sub> es H o un grupo protector de hidroxilo;

T<sub>2</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo;

Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tío o tío sustituido; y

20

donde cada uno de los grupos sustituidos, está, independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes protegidos opcionalmente seleccionados independientemente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> y CN, donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>,

25

2. El compuesto de la realización 1 donde Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido.

3. El compuesto de la realización 2 donde Z es metilo.

4. El compuesto de la realización 2 donde Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido.

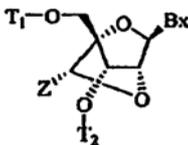
30

5. El compuesto de la realización 4 donde cada grupo sustituyente es alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

6. El compuesto de la realización 4 donde Z es CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-.

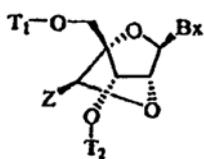
35

7. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 1-6 donde el grupo Z está en la configuración (R)-:



40

8. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 1-6 donde el grupo Z está en la configuración (S)-:



45

50

9. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 1-8 donde al menos uno de T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> es un grupo protector hidroxilo.

55

10. El compuesto de la realización 9 donde cada uno de los grupos protectores hidroxilo es seleccionado independientemente de bencilo, benzoilo, 2,6-diclorobencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, mesilato, tosilato, dimetoxitritilo (DMT), 9-fenilxantin-9-ilo (Pixilo) y 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX).

60

11. El compuesto de la realización 9 donde T<sub>1</sub> es seleccionado de acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo y dimetoxitritilo.

12. El compuesto de la realización 11 donde el mencionado T<sub>1</sub> es 4,4'-dimetoxitritilo.

13. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 1-8 donde T<sub>2</sub> es un grupo de fósforo reactivo.

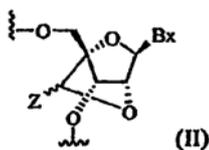
65

14. El compuesto de la realización 13 donde el mencionado grupo de fósforo reactivo es diisopropil-oyanoetoxi

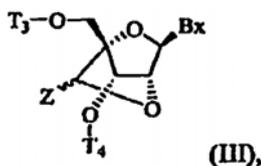
fosforamidita o H-fosfonato.

15. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 1-8 donde  $T_1$  es 4,4'-dimetoxitritiloximetil y  $T_2$  es diisopropilcianoetoxi fosforamidira.

16. Un compuesto oligomérico que tiene al menos un monómero de fórmula:



o de fórmula:



donde

Bx es un radical alcalino heterocíclico; podría

$T_3$  es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado conectado o un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

$T_4$  es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado conectado o un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

donde al menos uno de  $T_3$  y  $T_4$  es un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico; y Z es alquilo  $C_1-C_6$ , alqueno  $C_1-C_6$ , alquino  $C_1-C_6$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido, alqueno  $C_2-C_6$  sustituido, alquino  $C_2-C_6$  sustituido, acilo, acilo sustituido, tiol amida sustituida o tio sustituido.

17. El compuesto oligomérico de la realización 16 donde cada uno de los grupos sustituidos está independientemente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes protegidos opcionalmente seleccionados independientemente entre halógeno, oxo, hidroxilo,  $OJ_1$ ,  $NJ_1J_2$ ,  $SJ_1$ ,  $N_3$ ,  $OC(=X)J_1$ ,  $OC(=X)NJ_1J_2$ ,  $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$  y CN, donde cada uno de  $J_1$ ,  $J_2$  y  $J_3$  es, independientemente, H o alquilo  $C_1-C_6$ , y X es O, S o  $NJ_1$ .

18. El compuesto oligomérico de la realización 16 en donde cada Z es independientemente, alquilo  $C_1-C_6$  o alquilo  $C_1-C_6$  sustituido.

19. El compuesto oligomérico de la realización 18 donde al menos una Z es metilo.

20. El compuesto oligomérico de la realización 18 donde al menos una Z es alquilo  $C_1-C_6$  sustituido.

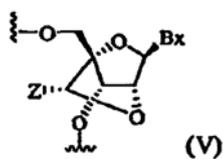
21. El compuesto oligomérico de la realización 20 donde cada uno de los mencionados grupos sustituyentes es alcoxi  $C_1-C_6$ .

22. El compuesto oligomérico de la realización 20 donde al menos una Z es  $CH_3OCH_2-$ .

23. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-22 donde cada Z es metilo o  $CH_3OCH_2-$ .

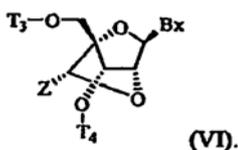
24. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-23 donde el grupo Z de al menos un monómero de la mencionada fórmula está en la configuración (R)- como se representa por la fórmula:  
o la fórmula:

5



o la fórmula:

10



15

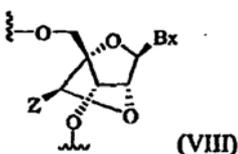
25. El compuesto oligomérico de la realización 24 donde cada grupo Z de cada monómero de la mencionada fórmula está en la configuración (R)-.

20

26. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-23 donde el grupo Z de al menos un monómero está en la configuración (S)- como se representa por la fórmula:

o la fórmula:

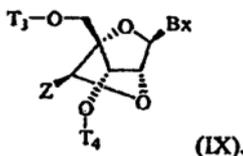
25



30

o la fórmula:

35



40

27. El compuesto oligomérico de la realización 26 donde cada grupo Z de cada monómero de la mencionada fórmula está en la configuración (S)-.

45

28. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-27 donde T<sub>3</sub> es H o un grupo protector hidroxilo.

29. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-27 donde T<sub>3</sub> es un grupo de enlace internucleosídico unido a un nucleósido, un nucleótido o una subunidad monomérica.

50

30. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-27 donde T<sub>3</sub> es un grupo de enlace internucleosídico unido a un oligonucleósido o un oligonucleótido.

31. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-27 donde T<sub>3</sub> es un grupo de enlace internucleosídico unido a un compuesto oligomérico.

55

32. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-31 donde T<sub>4</sub> es un grupo protector hidroxilo.

33. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-31 donde T<sub>4</sub> es un grupo de enlace internucleosídico unido a un nucleósido, un nucleótido o una subunidad monomérica.

60

34. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-31 donde T<sub>4</sub> es un grupo de enlace internucleosídico unido a un oligonucleósido o un oligonucleótido.

35. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-31 donde T<sub>4</sub> es un grupo de enlace internucleosídico unido a un compuesto oligomérico.

65

36. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-27 donde al menos uno de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> comprende un grupo de enlace internucleosídico seleccionado de fosfodiéster o fosforotioato.
- 5 37. . El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-36 que comprende al menos una región de al menos dos monómeros contiguos de la mencionada fórmula.
38. El compuesto oligomérico de la realización 37 que comprende al menos dos regiones de al menos dos monómeros contiguos de la mencionada fórmula.
- 10 39. El compuesto oligomérico de la realización 38 que comprende un compuesto oligomérico con huecos.
40. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 37 ó 385 que comprende además al menos una región de desde alrededor de 8 a alrededor de 14 nucleósidos β-D-2'-desoxiribofuranosil contiguos.
- 15 41. El compuesto oligomérico de la realización 40 que comprende además al menos una región de desde alrededor de 9 a alrededor de 12 nucleósidos β-D-2'-desoxiribofuranosil contiguos.
- 20 42. El compuesto oligomérico de la realización 37 que comprende una región de desde 2 a tres monómeros contiguos de la mencionad fórmula, una segunda región opcional de 1 ó 2 monómeros contiguos de la mencionada fórmula y una tercera región de desde 8 a 14 nucleósidos β-D-2'-desoxiribofuranosil donde la mencionada tercera región está localizada entre la mencionada primera y la mencionada segunda regiones.
43. El compuesto oligomérico de la realización 42 que comprende de 8 a 10 nucleósidos β-D-2'-desoxiribofuranosil.
- 25 44. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-43 que comprende de alrededor de 8 a alrededor de 40 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud.
45. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-43 que comprende de alrededor de 8 a alrededor de 20 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud.
- 30 46. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-43 que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 16 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud.
- 35 47. El compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16-43 que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 14 nucleósidos y/o nucleósidos modificados o miméticos de longitud.
48. Un método para inhibir la expresión génica que comprende poner en contacto una o más células, un tejido o un animal con un compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 16 a 45.
- 40 49. Un compuesto de cualquiera de las realizaciones 16-47, para su uso en terapia médica.
50. El uso de un compuesto de cualquiera de las realizaciones 16-47, para la fabricación de un medicamento para inhibir la expresión génica.

45 Si bien la presente invención ha sido descrita con especificidad de acuerdo con algunas de sus realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención y no se pretende que limiten la misma.

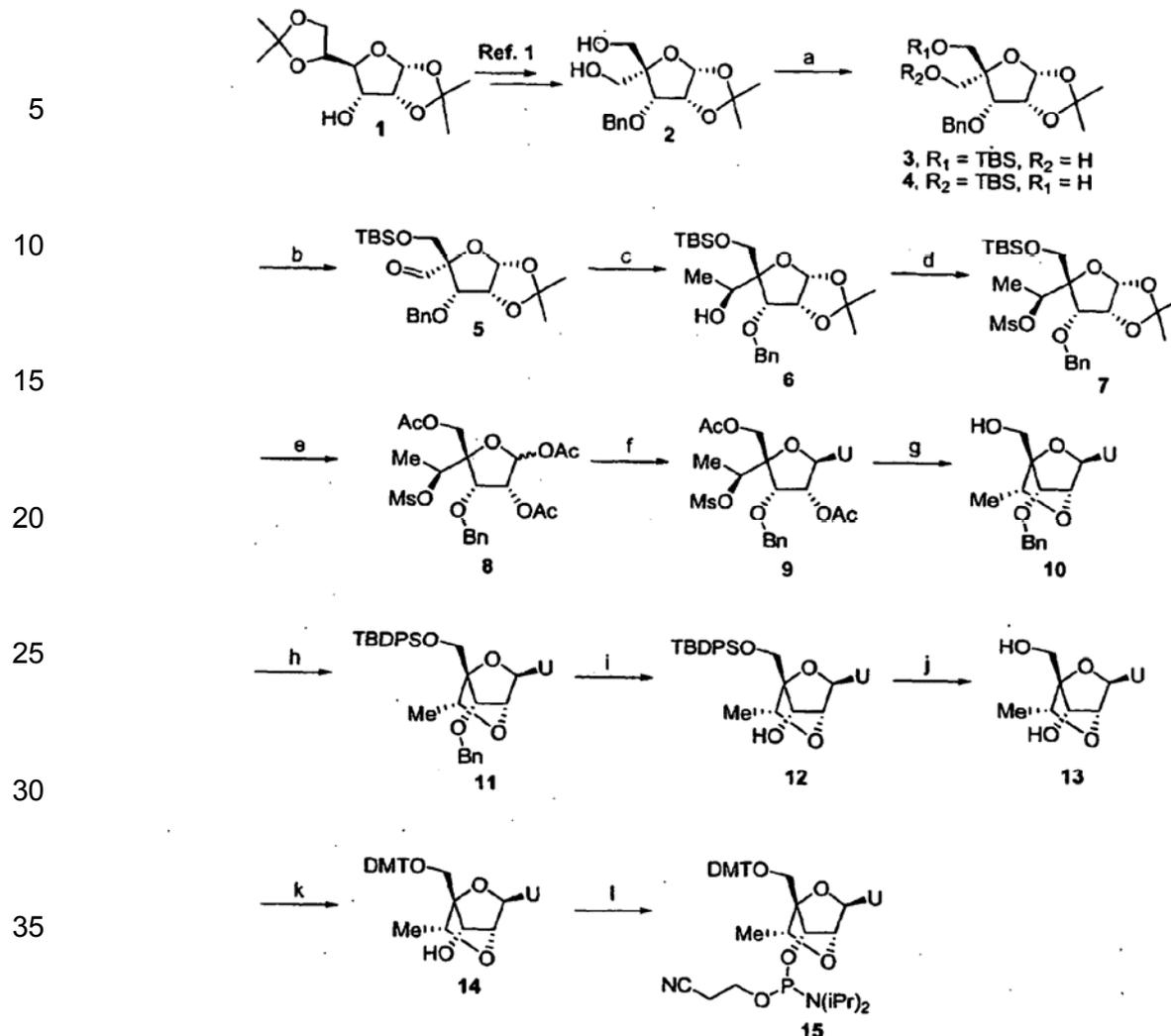
50 **Ejemplo 1**

Preparación de uridin-6-(R)-metil BNA fosforamidita, (1S,3R,4R,6R,7S)-7-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-metil-2,5-dioxabicyclo[2,2,1]heptano (15)

55

60

65



Esquema 1 (a) TBSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 16h, 50% para 3; (b)Oxidación de Swern; (c) MeMgBr, CeCl<sub>3</sub>, THF, -78°C 80% a partir de 3; (d) MsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 16hy, 91%; (e) AcOH, Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rt, 16h, 88%; (f) Uracilo, BSA, TMSOTf, CH<sub>3</sub>CN, reflujo, 2h; (g) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 16h; (h) TBDPSCI, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 16h, 79% a partir de 8; (i) BCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -15°C, 60%; (j) Et<sub>3</sub>N.3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h, DMTCl, Piridina, rt, 16h, 89% a partir de 12; (l) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF.

A) 5-*O*-*tert*-Butildimetilsilil)-3-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropiliden-4-*C*-hidroximetil- $\alpha$ -D-*eritro*-pentofuranosa (3)

Una solución de cloruro de *tert*-butildimetilsililo (6,24 g, 40,7 mmoles) en diclorometano (10 mL) se añadió a lo largo de 10 min, vía embudo de adición, a una solución refrigerada (0°C) del diol 2 (12 g, 38,8 mmoles, preparado de acuerdo con el procedimiento de Moffatt et al, J. Org. Chem. 1979, 44, 1301, Ref. 1), trietilamina (11,44 mL, 81,5 mmoles) y 4-dimetilaminoetilpiridina (0,47 g, 3,9 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (184 mL). Una vez completada la adición, la reacción se templó gradualmente a rt y se agitó durante 16h adicionales. La reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 10% a 30% EtOAc/hexanos) proporcionó el alcohol 3 (11,53g, 59%) y el alcohol 4 (3,93 g, 22%) en forma de sólidos de color blanco.

B) Alcohol (6).

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (3,36 mL, 47,5 mmoles) a una solución refrigerada (-78°C) de cloruro de oxalilo (2,08 mL, 23,7 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (130 mL). Después de agitar durante 30 min, se añadió a la reacción una solución del alcohol 3 (6,7 g, 15,8 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Se continuó agitando durante 45 min a -78°C y se añadió a la reacción trietilamina (10,0 mL, 71,2 mmoles). La reacción se agitó a -78°C durante 15 min después de lo cual se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó templando gradualmente a lo largo de 45 min. La reacción se vertió después en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%, NaHCO<sub>3</sub> saturado,

salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío para proporcionar el aldehído 5, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

5 Una suspensión de cloruro de cerio III (5,84 g, 23,7 mmoles) en THF (130 mL) se agitó a rt durante 90 min. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió bromuro de metilmagnesio (17,0 mL de una solución 1 M en THF) a lo largo de 5 min y se continuó agitando durante otros 90 min. Una solución del aldehído bruto **5** (anterior) en THF (20 mL) se añadió a la reacción. Después de agitar durante otros 90 min, la reacción se sofocó con una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat. y se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%,  $\text{NaHCO}_3$  saturado, salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , eluyendo con 15% EtOAc/hexanos) proporcionó el alcohol **6** (5,52 g, 80% a partir de **3**).

### C) Mesilato (7)

15 Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,55 mL, 7,0 mmoles) a una solución refrigerada ( $0^\circ\text{C}$ ) del alcohol **6** (2,77 g, 6,4 mmoles), trietilamina (1,1 mL, 7,7 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (84 mg, 0,7 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (14 mL). Después de agitar a rt durante 1h, la reacción se vertió en  $\text{CHCl}_3$  y la capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%,  $\text{NaHCO}_3$  saturado, salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , eluyendo con EtOAc/hexanos al 15% proporcionó el mesilato **7** (2,97 g, 91 %).

### D) Triacetato (8)

20 Se añadió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (3 gotas) a una solución del mesilato **7** (2,97 g, 5,8 mmoles) en ácido acético glacial (29 mL) y anhídrido acético (5,8 mL). Después de agitar a rt durante 1h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con agua,  $\text{NaHCO}_3$  saturado, salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , eluyendo con EtOAc/hexanos de 33% a 50% proporcionó el triacetato **8** (2,48 g, 88%). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\beta$  anomérico):  $\delta$  7,39-7,30 (m, 5H), 6,23 (s, 1H), 5,37 (d, 1H), 5,19 (q, 1H), 4,62 (d, 1H), 4,52 (d, 1H), 4,38 (s, 1H), 4,34 (d, 1H), 3,98 (d, 1H), 2,91 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 1,55 (d, 3H). LCMS: tiempo de retención 1,35 min; M+23 calcd. 511,1, encontrado 511,0.

### E) Nucleósido (11)

35 Se añadió *N,O*-Bis(trimetilsilil)acetamida (4,9 mL, 20,0 mmoles) a una suspensión del triacetato **8** (2,47 g, 5,0 mmoles) y uracilo (0,70 g, 6,3 mmoles) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (15 mL). Después de calentar a  $40^\circ\text{C}$  durante 15 min para obtener una solución clara, se añadió a la reacción triflato de trimetilsililo (1,18 mL, 6,5 mmoles). Después de someter a reflujo durante 2h, la reacción se enfrió a rt y se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado, salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío para proporcionar el nucleósido bruto **9**, que se utilizó sin purificación alguna.

40 Se añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2,07 g, 15 mmoles) a una solución del nucleósido **9** (anterior) en MeOH (50 mL). Después de agitar durante 16h a rt, el disolvente se separó a vacío y el residuo se repartió entre piridina/EtOAc al 25% y salmuera. La fase orgánica se recogió, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío para proporcionar **10**, que se utilizó sin purificación adicional alguna. RMN  $^1\text{H}$  (MeOD):  $\delta$  7,74 (d, 2H), 7,29-7,14 (m, 5H), 5,53 (d, 1H), 5,38 (s, 1H), 4,48 (s, 2H), 4,18 (s, 1H), 4,14 (sm, 1H), 3,92 (s, 1H), 3,66 (s, 2H), 1,08 (d, 3H). LCMS: tiempo de retención 2,40 min; M+H calcd. 360,1, encontrado 361,0.

45 Se añadió cloruro de *tert*-butildifenilsililo (1,73 mL, 6,7 mmoles) a una solución refrigerada ( $0^\circ\text{C}$ ) del nucleósido **10** (anterior), trietilamina (1,4 mL, 10,0 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (80 mg, 0,7 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (9 mL). Después de agitar durante 16h a rt, la reacción se vertió en EtOAc y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%,  $\text{NaHCO}_3$  saturado, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el nucleósido **11** (2,02 g, 79% a partir de **8**) en forma de un sólido de color blanco.

### F) Nucleósido (12)

55 Se añadió cuidadosamente tricloruro de boro (16,7 mL de una solución 1 M en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) a una solución refrigerada ( $-15^\circ\text{C}$ ) del nucleósido **11** (2,0 g, 3,3 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL). Después de agitar a  $-15^\circ\text{C}$  durante 1h, la reacción se enfrió a  $-78^\circ\text{C}$  y se sofocó cuidadosamente mediante la adición de MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, 10 mL). Después de agitar durante 10 min adicionales, la reacción se vertió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%,  $\text{NaHCO}_3$  saturado, salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , eluyendo con 50% a 80% EtOAc/hexanos proporcionó el nucleósido **12** en forma de un sólido de color blanco (1,02 g, 60%).

### G) Nucleósido (13)

65 Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (2,98 mL, 18,3 mmoles) a una solución del nucleósido **12** (1,86 g,

3,7 mmoles) y trietilamina (1,03 mL, 7,3 mmoles) en THF (36 mL), en un tubo de polipropileno. Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se concentró a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, 15% MeOH/CHCl<sub>3</sub> proporcionó el nucleósido **13** (1,31 g, producto contaminado con trietilamina) en forma de un sólido de color blanco.

#### H) Nucleósido (14)

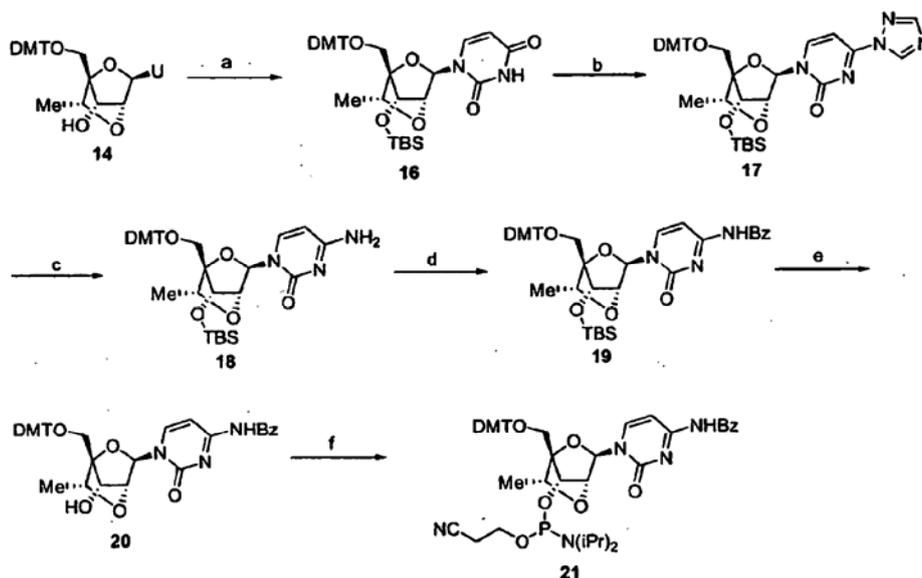
Se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTCl) (1,23 g, 3,7 mmoles) a una solución del nucleósido **13** (anterior) en piridina (18 mL). Después de agitar durante 16 h a rt, se añadió DMTCl adicional (0,12 g) a la reacción y se continuó agitando durante otras 8h. La reacción se vertió después en EtOAc y la capa orgánica se extrajo sucesivamente con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con acetona/CHCl<sub>3</sub> al 15% proporcionó el nucleósido **14** (1,85 g, 89%) en forma de una espuma de color blanco. RMN H1 (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,03 (d, 1H), 7,44-2,28 (m, 14H), 6,86 (d, 4H), 5,63 (d, 1H), 5,60 (s, 1H), 4,32 (m, 1H), 4,13 (s, 1H), 3,81 (s, 6H), 3,49 (d, 1H), 3,37 (d, 1H), 1,18 (d, 3H).

#### I) Preparación de la fosforamidita, (1S,3R,4R,6R,7S)-[2-cianoetoxi-(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (**15**)

Se añadió 2-cianoetiltetraisopropilfosforamidita (0,69 mL, 2,2 mmoles) a una solución del nucleósido **14** (0,83 g, 1,4 mmoles), tetrazol (80 mg, 1,2 mmoles) y *N*-metilimidazol (29 μL, 0,36 mmoles) en DMF (7,2 mL). Después de agitar a rt durante 8h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con salmuera al 90%, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de EtOAc y esta solución se añadió a hexanos. El precipitado resultante se recogió y se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 66% a 75%) para proporcionar la fosforamidita **15** en forma de un sólido de color blanco (1,04 g, 94%). RMN P<sup>31</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 149,21, 149,79.

#### Ejemplo 2

#### Preparación de uridin-*N*-Bz-citosin-6-(*R*)-metil-BNA fosforamidita, (1S,3R,4R,6R,7S)-7-(2-cianoetoxi-(diisopropilamino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-*N*-benzoilcitosin-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (**21**)



Esquema 2 (a) TBSCl, imidazol, DMF, rt, 16h 99%; POCl<sub>3</sub>, 1,2,4-triazol, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, rt, 4h; (c) NH<sub>3</sub> acuoso, 1,4-dioxano, rt, 16h; (d) Bz<sub>2</sub>O, DMF, rt, 16h, 90% a partir de **15**; (e) Et<sub>3</sub>N.3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h, 93%; (f) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF, 95%.

#### A) Nucleósido (16)

Se añadió cloruro de *tert*-Butildimetilsililo (0,79 g, 5,2 mmoles) a una solución del nucleósido **14** (1,0 g, 1,7 mmoles) e imidazol (0,70g, 10,4 mmoles) en DMF (3,5 mL). Después de agitar durante 16h, la reacción se vertió en EtOAc y la fase orgánica se extrajo sucesivamente con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el

nucleósido **16** (1,17 g, 99%) en forma de un sólido de color blanco.

#### B) Nucleósido (19)

5 Se añadió oxocloruro de fósforo (1,27 mL, 13,6 mmoles) a una suspensión refrigerada (0°C) de 1,2,4-triazol (4,0 g, 58,0 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (21 mL). Después de agitar durante 15 min, se añadió a la reacción trietilamina (9,57 mL, 68 mmoles) y se continuó agitando durante 30 min. Una solución del nucleósido **16** (1,17 g, 1,7 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (10 mL) se añadió a la reacción a 0°C. Después de agitar durante 10 min, se retiró el baño de hielo y la  
10 reacción se agitó a rt durante 4h. El disolvente se eliminó después a vacío y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se lavó después con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar **17** bruto, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

15 Se añadió amoníaco acuoso (4 mL) a una solución del nucleósido **17** (anterior) en dioxano (20 mL). Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se concentró a vacío y se secó a alto vacío durante 8h para proporcionar el nucleósido **18**, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

20 Se añadió anhídrido benzoico (0,65 g, 2,9 mmoles) a una solución del nucleósido **18** (anterior) en DMF (3 mL). Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se extrajo con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el nucleósido **19** (1,2 g, 90% de **16**) en forma de un sólido de color blanco.

#### C) Nucleósido (20)

25 Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (1,48 mL, 9,1 mmoles) a una solución del nucleósido **19** (1,86 g, 3,7 mmoles) y trietilamina (1,03 mL, 7,3 mmoles) en THF (15 mL) en un tubo de polipropileno. Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se concentró a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc y la capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 5% MeOH/CHCl<sub>3</sub> proporcionó el nucleósido **20** (0,91 g, 90%) en forma de un sólido de color blanco. RMN H1 (MeOD) δ: 8,62 (d, 1H), 8,02 (d, 1H), 7,63 (m, 6H), 7,38 (m, 7H), 6,96 (d, 4H), 6,65 (s, 1H); 4,49 (s, 1H), 4,36 (s, 1H), 4,25 (m, 1H), 3,53 (d, 1H), 3,41 (d, 1H), 1,18 (d, 3H).  
30

#### D) (1S,3R,4R,6R,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)-fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-N-benzoilcitosin-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo-[2,2,1]heptano (21)

35 Se añadió 2-cianoetil-tetraisopropilfosforamidita (0,63 mL, 2,0 mmoles) a una solución del nucleósido **20** (0,89 g, 1,3 mmoles), tetrazol (73 mg, 1,1 mmoles) y N-metilimidazol (26 µL, 0,33 mmoles) en DMF (6,6 mL). Después de agitar a rt durante 8h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con salmuera al 90%, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de EtOAc y esta solución se añadió a hexanos. El precipitado resultante se recogió y se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 75% a 90%) para proporcionar la fosforamidita **21** en forma de un sólido de color blanco (1,1 g, 95%). RMN P31 (CDCl<sub>3</sub>) δ: 149,34, 149,77.  
40

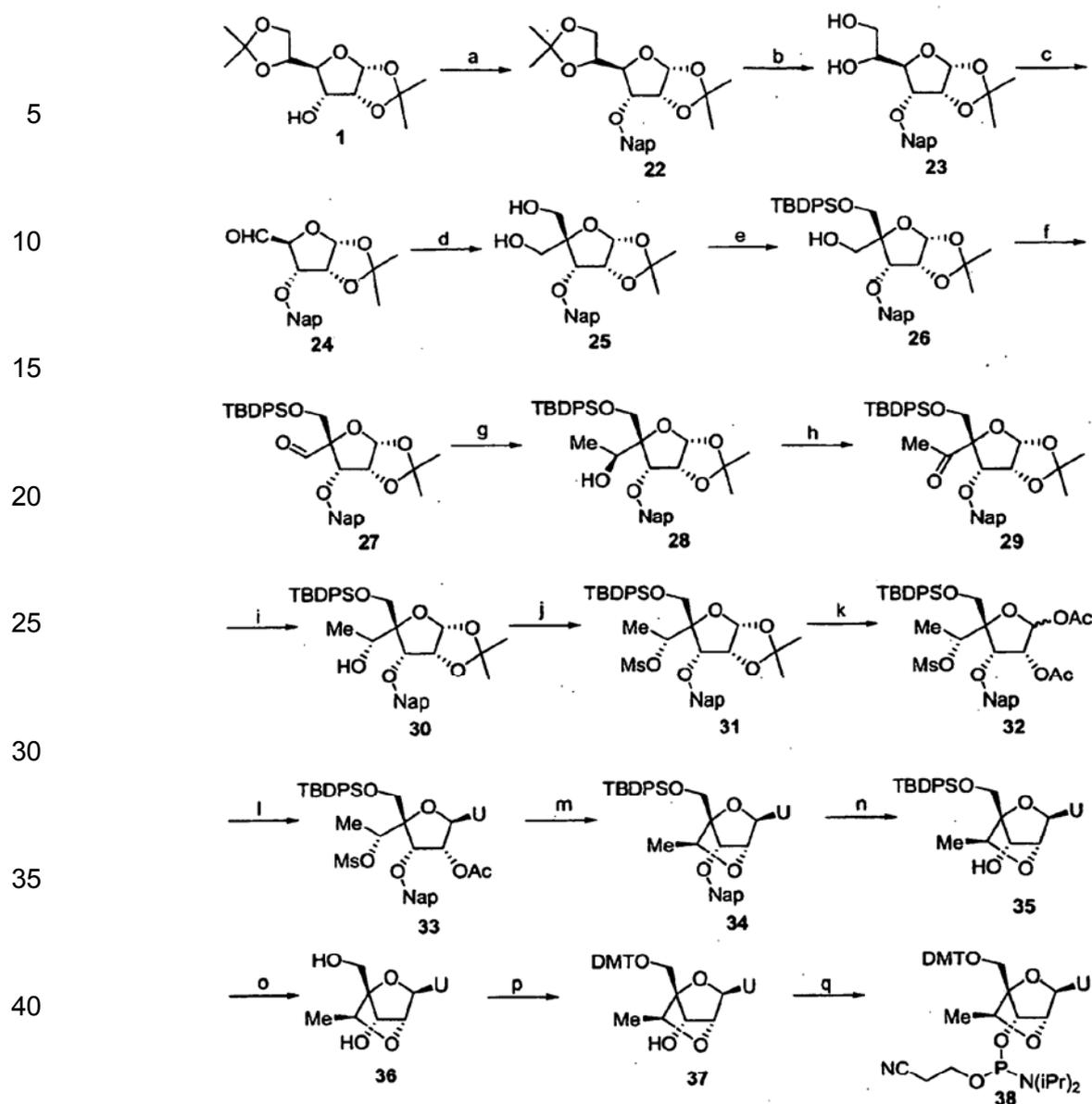
#### Ejemplo 3

45 Preparación de uridin-6-(S)-metil-BNA fosforamidita, (1S,3R,4R,6S,7S)-7-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (38)  
50

55

60

65



Esquema 3 (a) NaH, bromuro de naftilo, DMF, rt, 2h, 98%; (b) Ácido acético, H<sub>2</sub>O, rt, 16h; (c) NaIO<sub>4</sub>, dioxano, H<sub>2</sub>O, rt, 90 minutos; (d) HCHO, NaOH, THF, H<sub>2</sub>O, rt, 16h, 80% a partir de 22; (e) TBDPSCI, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 16h, 61%; (f) Cloruro de oxalilo, DMSO, Et<sub>3</sub>N, -78°C; (g) MeMgBr, CeCl<sub>3</sub>, 89% a partir de 26; (h) Cloruro de oxalilo, DMSO, Et<sub>3</sub>N, -78°C; (i) DiBAL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C; (j) MsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1h; (k) Ac<sub>2</sub>O, AcOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 58% a partir de 28; (l) BSA, Uracilo, TMSOTf, MeCN, reflujo, 2h; (m) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 16h, 76% a partir de 34; (n) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt, 8h, 80%; (o) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, cuant.; (p) DMTCl, piridina, rt, 16h, 86%; (q) CN(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OP(NiPr)<sub>2</sub>, tetrazol, NMI, DMF, 97%.

#### A) Alcohol (22)

Se añadió cuidadosamente hidruro de sodio (2,39 g, 59,8 mmoles) a una solución refrigerada (0°C) de 1,2:5,6-Di-O-isopropiliden- $\alpha$ -D-alofuranosa **1** (12,0g, 46 mmoles) asequible comercialmente en DMF (75 mL). Después de agitar durante 20 minutos, se añadió a la reacción bromuro de naftilo (11,12 g, 50,8 mmoles) y se continuó agitando durante otras 2h. La reacción se sofocó cuidadosamente con H<sub>2</sub>O y después se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/hexanos 10% a 33%) proporcionó el alcohol **22** en forma de un sólido de color blanco (18,1 g, 98%).

#### B) Diol (25)

El alcohol **22** (18g, 46 mmoles) se disolvió en ácido acético glacial (150 mL) y H<sub>2</sub>O (60 mL). La reacción se agitó a rt durante 16h después de lo cual se concentró a vacío. El residuo se disolvió después en EtOAc y la capa

orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó y se concentró para proporcionar **23** bruto, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

5 Una solución de peryodato sódico (48 mmoles, 10 g) en agua (350 mL) se añadió a una solución del diol **23** bruto obtenido antes, en 1,4-dioxano (140 mL). Después de agitar a rt durante 90 minutos, la reacción se extrajo con EtOAc y la capa orgánica se lavó adicionalmente con agua, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el aldehído **24**, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

10 El aldehído bruto **24** de antes, se disolvió en un mezcla de THF:H<sub>2</sub>O (1: 1, 100 mL) y la reacción se enfrió en un baño de hielo. Se añadieron formaldehído (25 mL, 35% p/p) y NaOH 1N (100 mL) a la reacción. Después de agitar a rt durante 16h, se añadió formaldehído (5 mL) a la reacción y se continuó agitando durante 32h adicionales. La reacción se concentró después hasta sequedad y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con NaOH 1N adicional, agua, salmuera, se secó y se concentró para proporcionar diol **25** (12,96 g, 80%, tres etapas) en forma de un sólido de color blanco.

15 **C) Alcohol (26)**

20 Se añadió cloruro de *tert*-butildifenilsililo (0,75 mL, 2,9 mmoles) a una solución refrigerada (0°C) del diol **25** (1 g, 2,8 mmoles) y trietilamina (0,45 mL, 3,2 mmoles). Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se vertió en EtOAc y se lavó sucesivamente con HCl al 5%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 10% a 40%) proporcionó el alcohol **26** (1,02 g, 61 %) en forma de un aceite (también se aislaron 0,42 g del diol protegido con sililo regioisomérico).

25 **D) Alcohol (28)**

30 Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (1,6 mL, 22,4 mmoles) a una solución refrigerada (-78°C) de cloruro de oxalilo (0,98 mL, 11,2 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL). Después de agitar durante 30 min, se añadió a la reacción una solución del alcohol **26** (4,8 g, 8,0 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Se continuó agitando durante 45 min a -78°C y se añadió trietilamina (4,72 mL, 33,7 mmoles) a la reacción. La reacción se agitó a -78°C durante 15 min después de lo cual se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó templando gradualmente a lo largo de 45 min. La reacción se vertió después en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar el aldehído **27**, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

35 Una suspensión de cloruro de cerio III (2,96 g, 12,0 mmoles) en THF (50 mL) se agitó a rt durante 90 min. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió bromuro de metilmagnesio (8,6 mL de a 1,4 M solución en THF, 12 mmoles) a lo largo de 5 min y se continuó agitando durante otros 90 min después de lo cual la reacción se enfrió a -78°C. Una solución del aldehído bruto **27** (anterior) en THF (20 mL) se añadió a la reacción. Después de agitar durante otros 90 min, la reacción se sofocó con una solución de NH<sub>4</sub>Cl y se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 20%) proporcionó el alcohol **28** (4,37 g, 89% de **26**).

45 **E) Diacetato (32)**

50 Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (1,41 mL, 19,9 mmoles) una solución refrigerada (-78°C) de cloruro de oxalilo (0,87 mL, 10,0 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL). Después de agitar durante 30 min, se añadió a la reacción una solución de alcohol **28** (4,35 g, 7,1 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Se continuó agitando durante 45 min a -78°C y trietilamina (4,20 mL, 30,0 mmoles) se añadió a la reacción. La reacción se agitó a -78°C durante 15 min después de lo cual se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó templando gradualmente a lo largo de 45 min. La reacción se vertió después en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar la cetona **29**, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

55 Se añadió hidruro de diisobutilaluminio (13,7 mL de una solución 1 M en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 13,7 mmoles) a una solución refrigerada de la **29** (anterior) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL). Después de agitar durante 2h a -78°C, la reacción se sofocó mediante la adición de NH<sub>4</sub>Cl saturado y se vertió en CHCl<sub>3</sub>. La capa orgánica se lavó después sucesivamente con HCl acuoso al 5%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar alcohol **30** que se utilizó sin purificación adicional alguna.

60 Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,11 mL, 1,4 mmoles) a una solución refrigerada (0°C) del alcohol **30** (anterior), trietilamina (1,77 mL, 10,5 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (85 mg, 0,7 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (21 mL). Después de agitar a rt durante 1h, la reacción se vertió en CHCl<sub>3</sub> y la capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar el mesilato

65

**31**, que se utilizó sin purificación alguna.

Se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (2 gotas) a una solución del mesilato **31** (anterior) en ácido acético glacial (15 mL) y anhídrido acético (3,0 mL). Después de agitar a rt durante 1h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 20% a 33% proporcionó el diacetato **32** (3,0 g, 58% de **28**).

#### F) Nucleósido (**34**)

Se añadió *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (3,45 mL, 14,0 mmoles) a una suspensión del diacetato **32** (3,0 g, 4,1 mmoles) y uracilo (0,57 g, 5,1 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (20 mL). Después de calentar a 40°C durante 15 min para obtener una solución clara, se añadió a la reacción triflato de trimetilsililo (0,95 mL, 5,3 mmoles). Después de someter a reflujo durante 2h, la reacción se enfrió a rt y se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar el nucleósido bruto **33**, que se utilizó sin purificación alguna.

Se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,66 g, 12,0 mmoles) a una solución del nucleósido **33** (anterior) en MeOH (40 mL). Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se concentró a vacío y el residuo se disolvió en piridina/EtOAc al 25% y se extrajo con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 40% proporcionó el nucleósido **34** (2,0 g, 76% a partir de **32**) en forma de un sólido de color blanco.

#### G) Nucleósido (**35**)

Se añadió 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) (1,4 g, 6,2 mmoles) a una solución del nucleósido **34** (2,0 g, 3,1 mmoles) en diclorometano (30 mL) y H<sub>2</sub>O (1,5 mL). Después de agitar durante 3h a rt, se añadió a la reacción DDQ adicional (0,5 g). Después de agitar durante otros 10 minutos, la reacción se concentró a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó después sucesivamente con agua, agua:NaHCO<sub>3</sub> saturado (1:1), salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/hexanos al 80% proporcionó el nucleósido **35** (1,25 g, 80%) en forma de un sólido de color blanco.

#### H) Nucleósido (**36**)

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (2,4 mL, 14,7 mmoles) a una solución del nucleósido **35** (1,25 g, 2,5 mmoles) y trietilamina (1,0 mL, 7,4 mmoles) en THF (25 mL) en un tubo de polipropileno. Después de agitar a rt durante 24h, la reacción se concentró a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó después con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó y se concentró (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 5% a 10% MeOH/CHCl<sub>3</sub> proporcionó el nucleósido **36** (0,88 g) en forma de un sólido de color blanco (producto contaminado con Et<sub>3</sub>N).

#### I) Nucleósido (**37**)

Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (0,91 g, 2,7 mmoles) a una solución del nucleósido **36** (anterior) en piridina (12 mL). Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 90% EtOAc/hexanos proporcionó el nucleósido **37** (1,28 g, 86% a partir de **36**) en forma de un sólido de color blanco.

#### J) (**1S,3R,4R,6S,7S**)-7-[2-

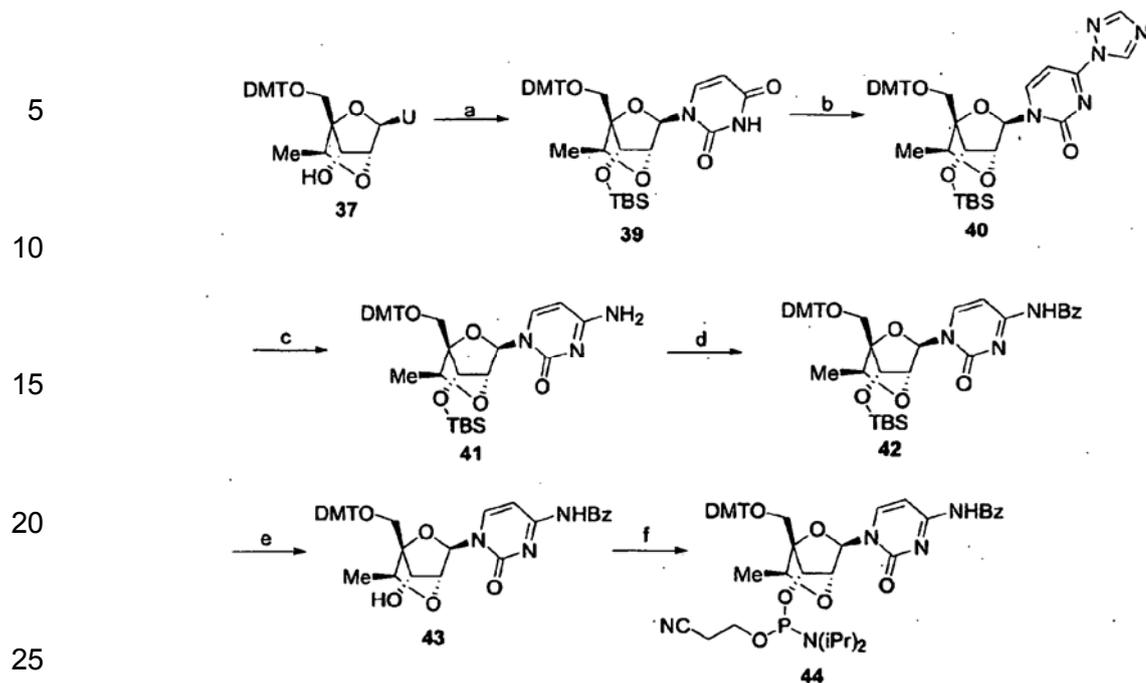
**Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (**38**)**

Se añadió 2-Cianoetil-tetraisopropilfosforamidita (0,46 mL, 1,5 mmoles) a una solución del nucleósido **37** (0,59 g, 1,0 mmoles), tetrazol (57 mg, 0,82 mmoles) y *N*-metilimidazol (20 µL, 0,25 mmoles) en DMF (5 mL). Después de agitar a rt durante 8h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con salmuera al 90%, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos 66% a 75% proporcionó la fosforamidita **38** en forma de un sólido de color blanco (0,75 g, 97%). RMN P31 (CDCl<sub>3</sub>) δ: 149,36, 149,53.

#### Ejemplo 4

##### Preparación de *N*-Bz-citosin-6-(*S*)-metil-BNA

fosforamidita, 2.2 Preparación de (**1S,3R,4R,6S,7S**)-7-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-*N*-benzoilcitosin-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (**44**)



Esquema 4 (a) TBSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 16h, 97%; (b) 1,2,4-Triazol, CH<sub>3</sub>CN, rt, 4h; (c) NH<sub>3</sub> acuoso, 1,4-dioxano, rt, 16h; (d) Bz<sub>2</sub>O, DMF, rt, 16h, 91% a partir de 39; (e) Et<sub>3</sub>N.3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h, 87%; (f) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF, 90%.

#### A) Nucleósido (39)

Se añadió cloruro de *tert*-butildimetilsililo (0,45 g, 3,0 mmoles) a una solución del nucleósido 37 (0,59 g, 1,0 mmoles) e imidazol (0,41 g, 6,0 mmoles) en DMF (2 mL). Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se vertió en EtOAc y la fase orgánica se extrajo sucesivamente con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el nucleósido 39 (0,68 g, 97%) en forma de un sólido de color blanco.

#### B) Nucleósido (42)

Se añadió oxiclورو de fósforo (0,74 mL, 8,0 mmoles) a una suspensión refrigerada a (0°C) de 1,2,4-triazol (2,35 g, 34,0 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (16 mL). Después de agitar durante 15 min, se añadió trietilamina (5,6 mL, 40 mmoles) a la reacción y se continuó agitando durante 30 min. Se añadió una solución del nucleósido 39 (0,68 g, 1,0 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (7 mL) a la reacción a 0°C. Después de agitar durante 10 min, se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó a rt durante 4h. El disolvente se eliminó después a vacío y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se lavó después con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar 40 bruto, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

Se añadió amoníaco acuoso (2,5 mL) a una solución del nucleósido 40 (anterior) en dioxano (12 mL). Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se concentró a vacío y se secó a alto vacío durante 8h para proporcionar el nucleósido 41, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

Se añadió anhídrido benzoico (0,38 g, 1,7 mmoles) a una solución del nucleósido 41 (anterior) en DMF (2 mL). Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se extrajo con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el nucleósido 42 (0,72 g, 91 % a partir de 39) en forma de un sólido de color blanco.

#### C) Nucleósido (43)

Se añadió trifluoruro de trietilamina (0,89 mL, 5,5 mmoles) a una solución del nucleósido 42 (0,72 g, 0,91 mmoles) y trietilamina (0,30 mL, 2,2 mmoles) en THF (9 mL) en un tubo de polipropileno. Después de agitar a rt durante 16h, la reacción se concentró a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc y la capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 25% a 40% acetona/CHCl<sub>3</sub>) proporcionó el nucleósido 43

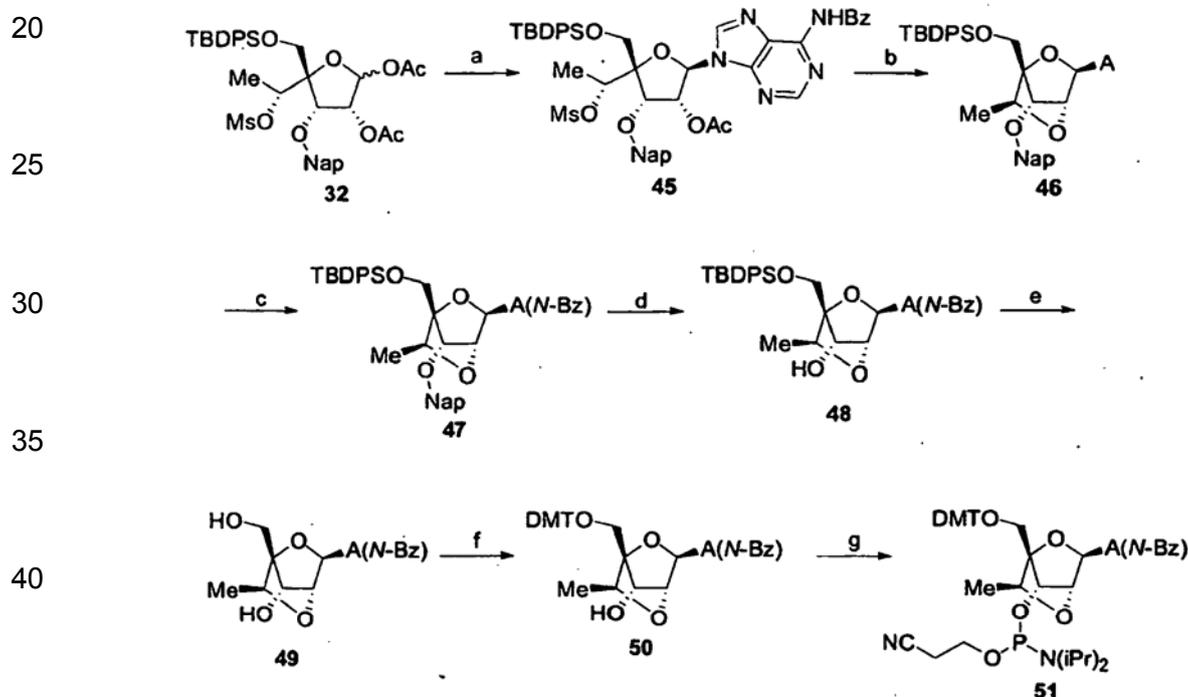
(0,53 g, 87%) en forma de un sólido de color blanco. RMN H1 (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,34 (s, ancho, 1H), 8,33 (d, 1H), 7,83 (d, 1H), 7,57-7,26 (m, 16H), 6,89 (d, 4H), 5,72 (s, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,22 (s, 1H), 4,14 (m, 1H), 3,83 (s, 6H), 3,63 (d, 1H), 3,46 (s, 1H), 1,20 (d, 3H).

5 **D) (1S,3R,4R,6S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)-fosfinoxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-N-Benzoilcitosin-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (44)**

10 Se añadió 2-cianoetil-tetraisopropilfosforamidita (0,37 mL, 1,2 mmoles) a una solución del nucleósido **43** (0,89 g, 1,3 mmoles), tetrazol (43 mg, 0,63 mmoles) y *N*-metilimidazol (16 µL, 0,20 mmoles) en DMF (4 mL). Después de agitar a rt durante 8h, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con salmuera al 90%, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 75% a 90% proporcionó la fosforamidita **44** en forma de un sólido de color blanco (0,61 g, 90%).

15 **Ejemplo 5**

20 **(1S,3R,4R,6S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(6-N-benzoiladenin-9-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (51)**



45 **Esquema 5 (a) 6-N-Benzoiladenina, BSA, TMSOTf, DCE, reflujo, 8h; (b) Bz<sub>2</sub>O, DMF, rt, (d) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt; 16h, (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h; (f) DMTCl, Piridina, rt, 16h; (g) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF.**

50 **A) Nucleósido (46)**

55 Se añadió *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (1,1 mL, 4,50 mmoles) a una suspensión del diacetato **32** (1,0 g, 1,4 mmoles) y 6-*N*-benzoiladenina (0,48 g, 2,0 mmoles) en dicloroetano (14 mL). La mezcla de reacción se volvió transparente después de 45 minutos a reflujo y se enfrió en un baño de hielo y se añadió triflato de trimetilsililo (0,49 mL, 2,7 mmoles). Después de someter a reflujo durante 8 horas la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar el nucleósido bruto **45**, que se utilizó sin purificación.

60 Se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,38 g, 2,7 mmoles) a una solución del nucleósido **45** (anterior) en MeOH (14 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas la reacción se concentró a vacío. El residuo se suspendió en EtOAc, se extrajo con agua y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con MeOH/CHCl<sub>3</sub> de 1 a 2,5% proporcionó el nucleósido **46** en forma de un sólido de color blanco (0,69 g, 73% a partir de **32**).

65 **B) Nucleósido 47**

Nucleósido **47** se prepara a partir del nucleósido **46** mediante reacción con anhídrido benzoico (1,5-2 eq) en DMF seca.

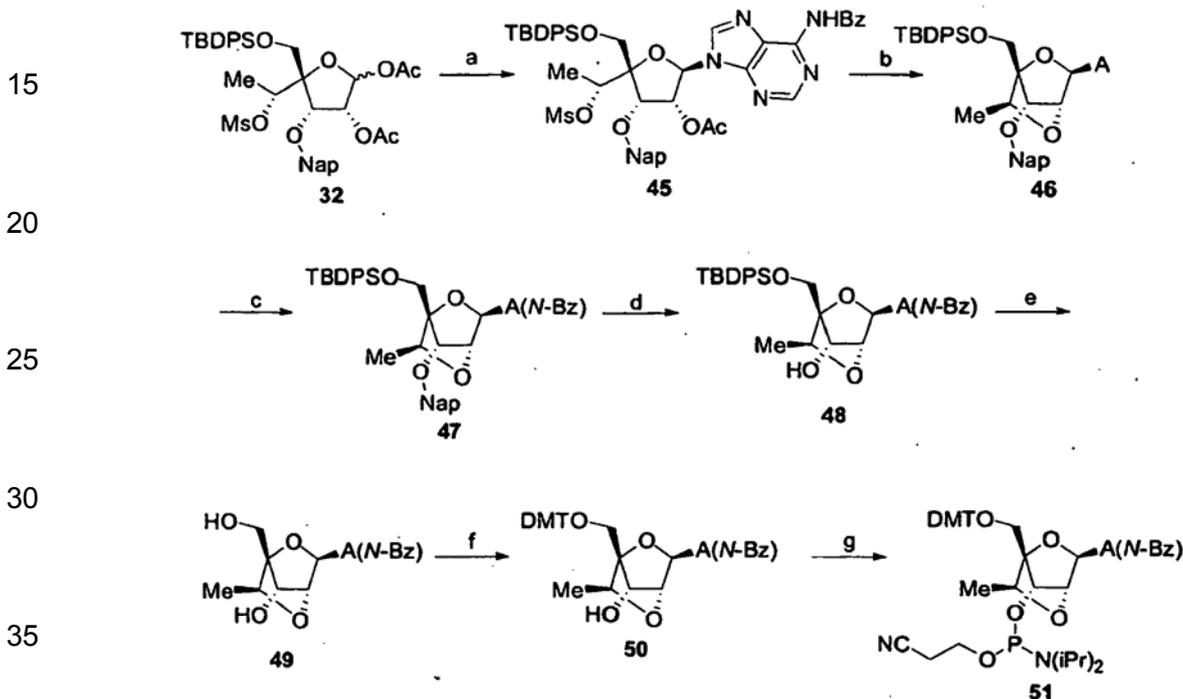
### C) Fosforamidita **51**

La fosforamidita **51** se prepara a partir del nucleósido **47** utilizando los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 3 para la fosforamidita **38** a partir del nucleósido **34**.

### Ejemplo 6

(1*S*,3*R*,4*R*,6*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinbenzoiladenin-9-il]-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (**60**)

oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(6-*N*-



Esquema 6 (a) MsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 4h; (b) Ac<sub>2</sub>O, AcOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cat., rt, 3h, 87% a partir de **28**; (c) 6-*N*-benzoiladenina, BSA, TMSOtf, DCE, reflujo, 2h; (d) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 16h; (e) Bz<sub>2</sub>O, DMF, rt; (f) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt; (g) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h; (h) DMTCl, Piridina, rt, 16h; (i) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-*i*Pr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF.

### A) Diacetato (**52**)

Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (1,33 mL, 16,8 mmoles) a una solución refrigerada (0°C) del alcohol **28** (7,37 g, 12,0 mmoles), trietilamina (2,82 mL, 20,2 mmoles) y DMAP (0,20 g, 1,1 mmoles) en diclorometano (25 mL). Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con diclorometano y la capa orgánica se lavó con HCl al 5%, una solución saturada de bicarbonato de sodio, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El mesilato bruto **52** obtenido de este modo se utilizó sin purificación adicional.

### B) Diacetato (**53**)

Se añadió ácido sulfúrico concentrado (10 gotas) a una solución del mesilato **52** (anterior) en anhídrido acético (7,2 mL) y ácido acético (36 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas la reacción se concentró a alto vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo y la capa orgánica se lavó cuidadosamente con agua, una solución saturada de bicarbonato de sodio (hasta pH > 8) y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 25 a 35%) para proporcionar el diacetato **53** (7,66 g, 87% de **28**) en forma de un aceite viscoso.

### C) Fosforamidita (**60**)

La fosforamidita **60** se prepara a partir del diacetato **53** utilizando los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 3 para la fosforamidita **51** a partir del diacetato **32**.

### Ejemplo 7

(1*S*,3*R*,4*R*,6*S*,7*S*)-7-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin  
Isobutirilguanin-9-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (67)

oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(2-*N*-

5

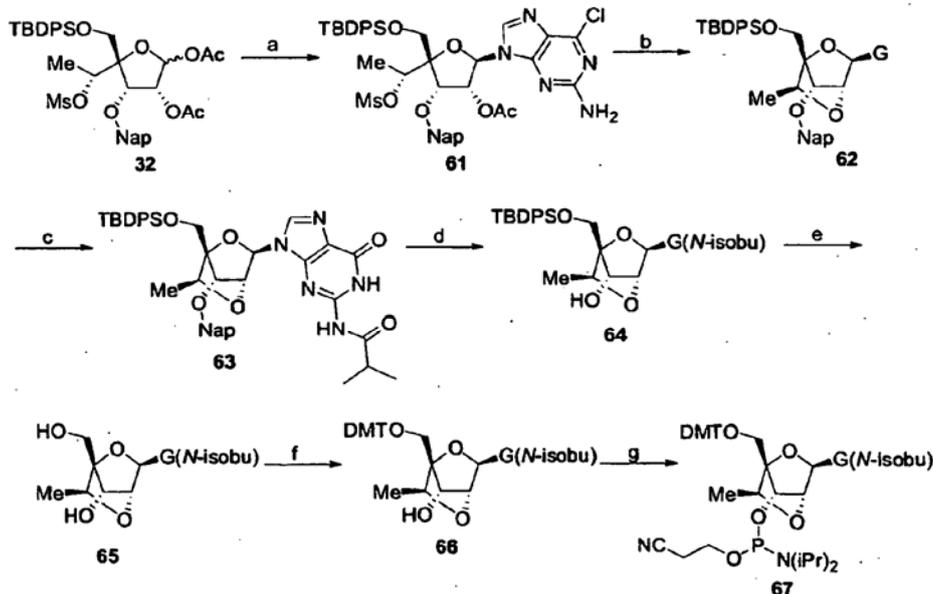
10

15

20

25

30



Esquema 7 (a) 2-amino-6-cloropurina, BSA, TMSOTf, DCE, reflujo, 2h; (b) 3-Hidroxipropionitrilo, NaH, THF, 4h, 82% a partir de 32; (c) Anhídrido isobutírico, DMAP, DMF, 60°C, 24h, 71%; (d) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt, 16h, 91%; (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h, 97%; (f) DMTCl, Piridina, rt, 16h, 85%; (g) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-*i*Pr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF.

#### A) Nucleósido (61)

35

Se añadió *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (3,8 mL, 15,5 mmoles) a una suspensión del diacetato **32** (3,44 g, 4,7 mmoles) y 2-amino-6-cloropurina (1,18 g, 7,0 mmoles) en dicloroetano (46 mL). Después de someter a reflujo durante 45 minutos para obtener una solución clara, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió triflato de trimetilsililo (1,69 mL, 9,4 mmoles). Después de someter a reflujo durante 8 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en cloroformo. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar el nucleósido bruto **61**, que se utilizó sin purificación.

40

#### B) Nucleósido (62)

45

Se añadió gota a gota 3-hidroxipropionitrilo (1,67 mL, 24,5 mmoles) a una suspensión con agitación de hidruro de sodio (1,07 g, 27,0 mmoles, 60% p/p) en THF seco (10 mL). Después de agitar durante 20 minutos, se añadió una solución del nucleósido bruto **61** (anterior) en THF seco (25 mL). Se continuó agitando durante 5 horas a temperatura ambiente después de lo cual, la reacción se sofocó cuidadosamente mediante la adición de una solución de cloruro de amonio saturado. La reacción se vertió en acetato de etilo y la capa orgánica se extrajo con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se concentró. La purificación del residuo mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con CHCl<sub>3</sub> a 2,5% MeOH/CHCl<sub>3</sub>) proporcionó el nucleósido **62** (3,18 g, 82% a partir de **32**) en forma de un sólido de color pardo claro.

50

#### C) Nucleósido (63)

55

Se añadió anhídrido isobutírico (1,5 mL, 9,3 mmoles) a una solución del nucleósido **62** (3,19 g, 4,6 mmoles) y 4-dimetilaminometilpiridina (0,11 g, 0,93 mmoles) en DMF (27 mL). Después de agitar a 60°C durante 14 horas se añadió a la reacción una cantidad adicional de anhídrido isobutírico (1,5 mL, 9,3 mmoles) y se continuó agitando a 60°C durante otros 12 horas. La reacción se enfrió después a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se lavó con agua, una solución saturada de bicarbonato de sodio, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, acetona/CHCl<sub>3</sub> de 5% a 10%) proporcionó el nucleósido **63** (2,5 g, 71 %) en forma de una espuma amarillenta.

60

#### D) Nucleósido (64)

65

Se añadió DDQ (1,12 g, 5,0 mmoles) a una solución del nucleósido **63** (2,5 g, 3,3 mmoles) en diclorometano (33 mL) y H<sub>2</sub>O (1,7 mL). Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente se añadió DDQ adicional (1,0 g). Se continuó agitando a temperatura ambiente durante otras 6 horas después de lo cual, la reacción se almacenó en el refrigerador (4°C) durante 16 horas. La reacción se concentró después a vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, una solución de bisulfito de sodio al 10% (2x), una solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 5% MeOH/CHCl<sub>3</sub> proporcionó el nucleósido **64** (1,84 g, 91%).

#### 10 E) Nucleósido (65)

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (2,88 mL, 17,9 mmoles) a una solución del nucleósido **64** (1,84 g, 3,0 mmoles) y trietilamina (1,25 mL, 8,9 mmoles) en THF (30 mL) en un tubo de polipropileno. Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas la reacción se concentró a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó después con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con MeOH/CHCl<sub>3</sub> de 5% a 10% proporcionó el nucleósido **65** (1,05 g, 97%) en forma de un sólido de color blanco.

#### 20 F) Nucleósido (66)

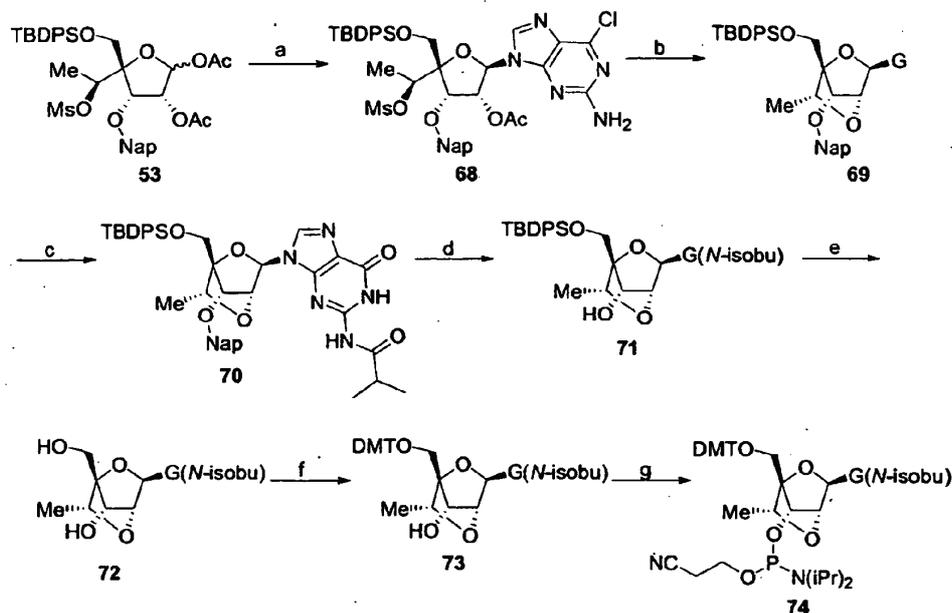
Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (1,07 g, 3,2 mmoles) a una solución del nucleósido **65** (1,00 g, 2,7 mmoles) en piridina (13 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con MeOH/CHCl<sub>3</sub> de 2,5 a 5% proporcionó el nucleósido **66** (1,52 g, 85%) en forma de una espuma de color blanco.

#### 30 G) (1S,3R,4R,6S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(2-N-Isobutirilguanin-9-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (67)

Se añadió 2-Cianoetil-tetraisopropilfosforamidita (1,06 mL, 3,4 mmoles) a una solución del nucleósido **66** (1,52 g, 2,2 mmoles), tetrazol (0,12 g, 1,7 mmoles) y *N*-metilimidazol (45 µL, 0,56 mmoles) en DMF (11 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con salmuera al 90%, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con MeOH/CHCl<sub>3</sub> al 2,5% proporcionó la fosforamidita **67** en forma de un sólido de color blanco (1,65 g, 84%). RMN P31 (CDCl<sub>3</sub>) δ: 148,70, 145,81.

#### Ejemplo 8

#### 40 (1S,3R,4R,6R,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(2-N-Isobutirilguanin-9-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (74)

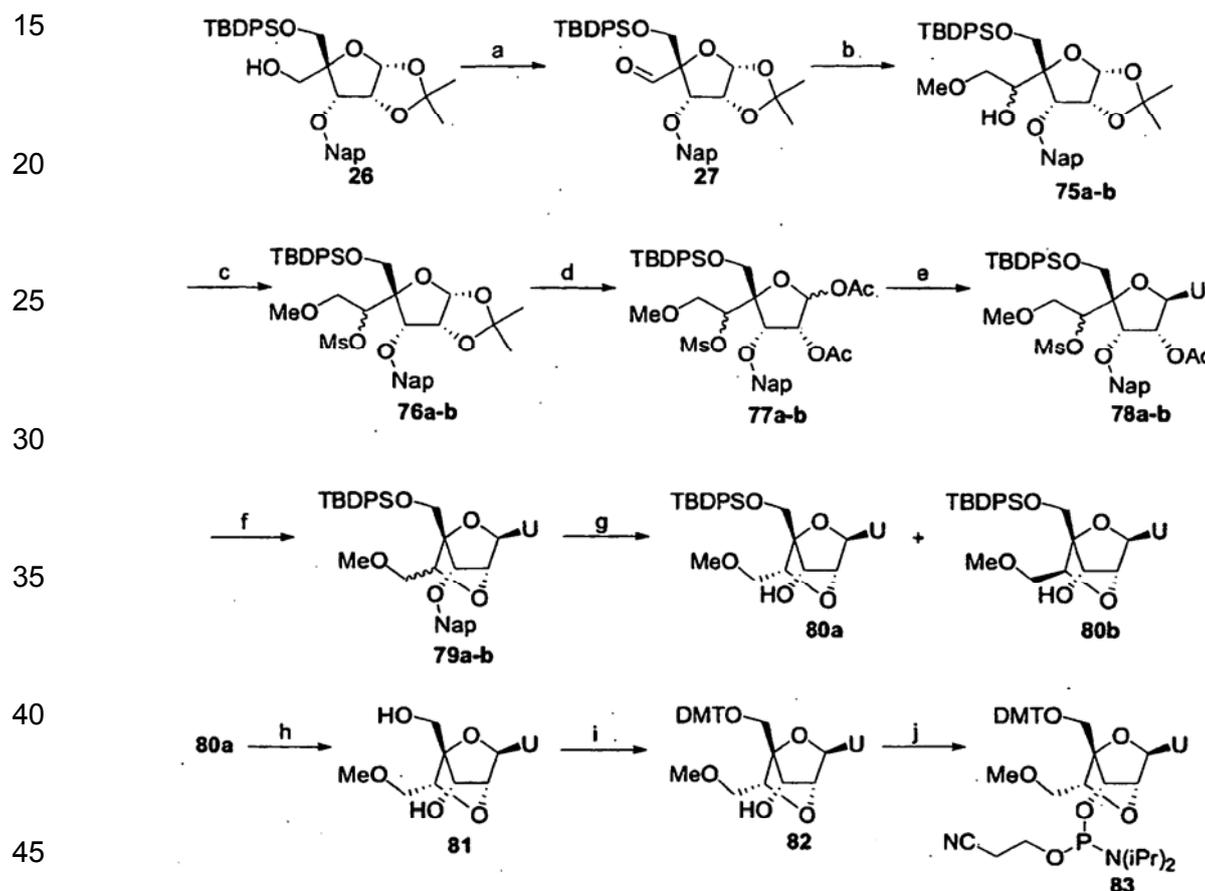


Esquema 8 (a) 2-amino-6-cloropurina, BSA, TMSOTf, DCE, reflujo, 2h; (b) 3-Hidroxi- propionitrilo, NaH, THF, 4h; (c) Anhídrido isobutírico, DMAP, DMF, 60C, 24h; (d) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt, 16h; (e) Et<sub>3</sub>N.3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h; (f) DMTCl, Piridina, rt, 16h; (g) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF.

5 La fosforamidita **74** se prepara a partir del diacetato **53** utilizando los mismos procedimientos ilustrados para la fosforamidita **67** a partir del diacetato **32**.

### Ejemplo 9

10 (1*S*,3*R*,4*R*,6*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin- oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6- metoximetil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (**83**)



Esquema 9 (a) Cloruro de oxalilo, DMSO, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C; (b) MeOHCH<sub>2</sub>Br, Mg, HgCl<sub>2</sub>, THF, -20°C, >95% a partir de **26**; (c) MsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 85%; (d) Ac<sub>2</sub>O, AcOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rt, 3h, 84%; (e) Uracilo, BSA, TMSOTf, MeCN, reflujo, 2h; (f) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 89% a partir de **77a-b**; (g) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 8h, rt, 98% rendimiento combinado para **80a** y **80b**; (h) Et<sub>3</sub>N.3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h; (i) DMTCl, piridina, 16h, rt, 90%; (j) CN(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF, 96%.

### A) Alcoholes (75a-b)

55 Se añadió dimetilsulfóxido (3,5 mL, 50,0 mmoles) a una solución de cloruro de oxalilo (2,2 mL, 25,0 mmoles) en diclorometano (130 mL) a -78°C. Después de agitar durante 30 minutos se añadió una solución del alcohol **26** (10,0 g, 16,7 mmoles) en diclorometano (30 mL) a la reacción a lo largo de 10 minutos. Después de agitar durante otros 45 minutos, se añadió lentamente a la reacción trietilamina (10,5 mL, 75,0 mmoles). Una vez completada la adición, se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó templando gradualmente hasta 0°C (aprox. 1 hora) y se transfirió a un embudo separador. La capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl al 5%, una solución de bicarbonato de sodio saturado y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el aldehído **27**, que se secó a alto vacío (18 horas) y se utilizó sin purificación adicional.

65 Una mezcla de virutas de magnesio (2,5 g, 102,8 mmoles) y cloruro de mercurio (II) (93 mg, 0,34 mmoles)

se cubrió con THF seco (5 mL) y la reacción se enfrió a -20°C. Se añadieron unas pocas gotas de bromuro de metoximetilo puro para iniciar la reacción. Después de esperar durante unos pocos minutos, se añadió una solución de bromuro de metoximetilo (9,33 mL, 102,8 mmoles) en THF (12 mL) (1 mL/10 minutos a través de una jeringa) a la reacción a lo largo de aproximadamente 3 horas. La temperatura del baño externo se mantuvo muy cuidadosamente entre -20 y -25 °C durante la adición. Se añadió intermitentemente un pequeño volumen de THF seco (5 mL) (a lo largo de 3 horas) a la reacción para facilitar la agitación. Una vez completada la adición del bromuro, la reacción se agitó a -25°C durante 100 minutos y se añadió una solución del aldehído bruto (27) en THF (30 mL). Después de agitar a -20 °C durante 45 minutos, no se detectó aldehído de partida **27** mediante TLC. La reacción se sofocó cuidadosamente con una solución de cloruro de amonio saturado y se diluyó con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con HCl al 5%, una solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 25 a 30%) proporcionó los alcoholes **75a-b** (cuantitativo) en forma de una mezcla (de isómeros aproximadamente 1:1).

#### 15 **B) Mesilatos (76a-b)**

Se añadió cloruro de metanosulfonilo (2,3 mL, 29,2 mmoles) a una solución refrigerada (0°C) de los alcoholes **75a-b** (13,38 g, 20,8 mmoles) disueltos en trietilamina (5,3 mL, 37,9 mmoles) y DMAP (0,36 g, 2,9 mmoles) en diclorometano (42 mL). Después de agitar durante 2 horas se añadió cloruro de metanosulfonilo adicional (0,5 mL). Se continuó agitando durante 1 hora y la reacción se diluyó con cloroformo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl al 5%, una solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos 20%) proporcionó los **mesilatos 76a-b** (12,8 g, 85%) en forma de un aceite viscoso.

#### 25 **C) Diacetatos (77a-b)**

Se añadió ácido sulfúrico concentrado (6 gotas) a una solución de mesilatos **76a-b** (12,8 g, 17,8 mmoles), ácido acético (50 mL) y anhídrido acético (10 mL). Después de agitar durante 3 horas a temperatura ambiente la reacción se consideró completada mediante LCMS y la mayoría del disolvente se evaporó a alto vacío. La mezcla concentrada se diluyó con acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con agua, una solución saturada de bicarbonato de sodio (hasta pH >10) y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 20% EtOAc/hexanos proporcionó una mezcla anomérica de los diacetatos **77a-b** (11,44 g, 84%) en forma de un aceite viscoso.

#### 35 **D) Nucleósidos (79a-b)**

Se añadió *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (14,76 mL, 59,9 mmoles) a una suspensión de los diacetatos **77a-b** (11,44 g, 15,0 mmoles) y uracilo (3,35 g, 29,9 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (75 mL). Después de calentar a 40°C durante 15 minutos para obtener una solución clara, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió triflato de trimetilsililo (4,06 mL, 22,5 mmoles). Después de someter a reflujo durante 2 horas la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con una solución semisaturada de bicarbonato de sodio y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar los nucleósidos brutos **78a-b**, que se utilizaron sin purificación.

Se añadió carbonato de potasio (5,30 g, 38,4 mmoles) a una solución de los nucleósidos **78a-b** (anteriores) en metanol (130 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se concentró a vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se extrajo con agua y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con acetona/cloroformo de 5 a 7,5% proporcionó los nucleósidos **79a-b** (9,0 g, 89% a partir de **77a-b**) en forma de un sólido de color blanco.

#### 50 **E) Nucleósidos (80a y 80b)**

Se añadió DDQ (20,0 mmoles, 4,5 g) a una solución de los nucleósidos **79a-b** (9,0 g, 13,3 mmoles) en diclorometano (130 mL) y agua (6,5 mL). La reacción bifásica se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas después de lo cual se añadió a la reacción DDQ adicional (2,75 g). Al cabo de otras 2 horas se añadió DDQ adicional (1,1 g) a la reacción y se continuó agitando durante otras 4 horas después de lo cual la reacción se almacenó en un refrigerador durante 16 horas. A la mañana siguiente, el LCMS mostró trazas de los nucleósidos **79a-b**, de manera que se añadió DDQ adicional (0,9 g) a la reacción y se continuó agitando durante 2 horas, momento en el cual no se detectaron más nucleósidos **79a-b** mediante TLC y LCMS. El disolvente se evaporó a vacío y el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con una solución de bisulfito de sodio (2x), una solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo acetona/cloroformo de 10 a 20% proporcionó los nucleósidos **80a** (aplicación con recorrido más lento) y **80b** (aplicación con recorrido más rápido) respectivamente (7,0 g rendimiento combinado, 98%).

**F) Nucleósido (81)**

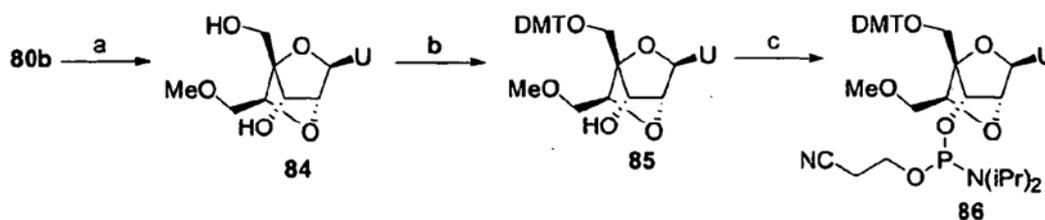
Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (12,2 mL, 74,8 mmoles) a una solución del nucleósido **80a** (6,7 g, 12,5 mmoles) y trietilamina (5,2 mL, 37,4 mmoles) en THF (120 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se concentró hasta sequedad a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 7,5% a 12,5% MeOH/CHCl<sub>3</sub>) para proporcionar el nucleósido **81** (contaminado con trietilamina.sal hidrofleururo, rendimiento >100%), que se utilizó sin purificación adicional.

**G) Nucleósido (82)**

Se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTCl, 4,8 g, 14,3 mmoles) a una solución del nucleósido **81** (~ 12,5 mmoles) en piridina (75 mL). Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, se añadió a la reacción DMTCl adicional (2,4 g). Después de agitar durante otras 4 horas se añadió MeOH (10 mL). Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se diluyó con acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/hexanos de 60 a 75% proporcionó el nucleósido **82** (6,73 g, 90%) en forma de una espuma de color blanco.

**H) (1S,3R,4R,6R,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-metoximetil-2,5-dioxabicyclo[2,2,1]heptano (83)**

Se añadió 2-cianoetil-tetraisopropilfosforamidita (1,58 mL, 5,0 mmoles) a una solución del nucleósido **82** (2,0 g, 3,3 mmoles), tetrazol (0,19 g, 2,6 mmoles) y *N*-metilimidazol (68 µL, 0,83 mmoles) en DMF (16 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas la reacción se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera al 90% seguido de salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 66% a 75% proporcionó fosforamidita **83** en forma de un sólido de color blanco (2,54 g, 96%). RMN P31 (CDCl<sub>3</sub>) δ: 149,78, 149,44.

**Ejemplo 10****(1S,3R,4R,6S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-metoximetil-2,5-dioxabicyclo-[2,2,1]heptano (86)**

**Esquema 10 (a)** Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h; **(i)** DMTCl, piridina, 16h, rt, 90%; **(j)** CN(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF, 96%.

**A) Nucleósido (84)**

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (11,6 mL, 71,5 mmoles) a una solución del nucleósido **80b** (6,43 g, 12,0 mmoles) y trietilamina (5,0 mL, 35,7 mmoles) en THF (125 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se concentró hasta sequedad a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con MeOH/CHCl<sub>3</sub> de 7,5% a 12,5%) para proporcionar el nucleósido **84** (contaminado con sal hidrofleururo de trietilamina, rendimiento > 100%), que se utilizó sin purificación adicional.

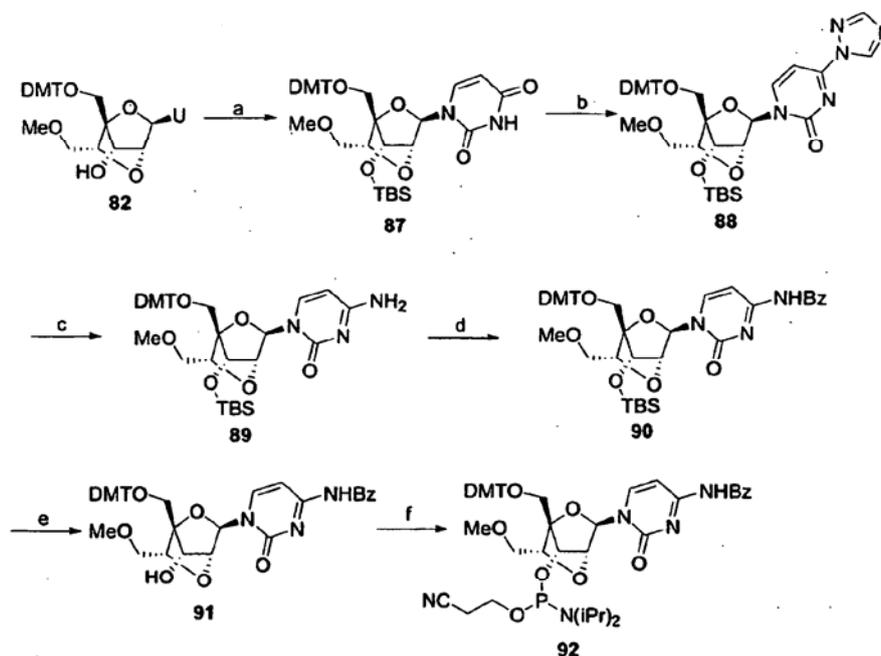
**B) Nucleósido (85)**

Se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTCl, 4,6 g, 13,8 mmoles) a una solución del nucleósido **84** (~ 12,0 mmoles) en piridina (72 mL). Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente se añadió a la reacción DMTCl adicional (2,3 g). Después de agitar durante otras 4 horas se añadió MeOH (10 mL). Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se diluyó con acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/hexanos de 60 a 75% proporcionó el nucleósido **85** (6,52 g, 91%) en forma de una espuma de color blanco.

**C) (1S,3R,4R,6S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(uracil-1-il)-6-metoximetil-2,5-dioxabicyclo[2,2,1]heptano (86)**

**biciclo[2,2,1]heptano (86)**

Se añadió 2-cianoetil-tetraisopropilfosforamidita (1,58 mL, 5,0 mmoles) a una solución del nucleósido **85** (2,0 g, 3,3 mmoles), tetrazol (0,19 g, 2,7 mmoles) y *N*-metilimidazol (68  $\mu$ L, 0,83 mmoles) en DMF (17 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas la reacción se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera al 90% después salmuera y se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , eluyendo con EtOAc/hexanos de 66% a 75% proporcionó la fosforamidita **86** en forma de un sólido de color blanco (2,55 g, 96%). RMN P31 ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149,97, 149,78.

**Ejemplo 11****(1S,3R,4R,6R,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-N-Benzoilcitosin-1-il)-6-metoximetil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (92)**

**Esquema 11** (a) TBSCl,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ , rt, 16h, 98%; (b)  $\text{POCl}_3$ , 1,2,4-Triazol,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , rt, 4h; (c)  $\text{NH}_3$  acuoso, 1,4-dioxano, rt, 16h; (d)  $\text{Bz}_2\text{O}$ , DMF, rt, 16h, 91% a partir de **82**; (e)  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, rt, 16h, 94%; (f)  $\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{OP}(\text{N}(\text{iPr})_2)_2$ , Tetrazol, NMI, DMF, 84%.

**(A) Nucleósido (87)**

Se añadió cloruro de *tert*-butildimetilsililo (2,40 g, 15,9 mmoles) a una solución del nucleósido **82** (3,20 g, 5,3 mmoles) e imidazol (2,16 g, 31,8 mmoles) en DMF (10,6 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se vertió en EtOAc. La fase orgánica se extrajo sucesivamente con salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el nucleósido **87** (3,70 g, 98%) en forma de un sólido de color blanco.

**B) Nucleósido (90)**

Se añadió oxiclورو de fósforo (3,86 mL, 41,4 mmoles) a una suspensión refrigerada ( $0^\circ\text{C}$ ) de 1,2,4-triazol (12,15 g, 176,1 mmoles) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (80 mL). Después de agitar durante 15 minutos se añadió trietilamina (29,0 mL, 207,2 mmoles) y se continuó agitando durante 30 minutos.

Una solución del nucleósido **87** (3,70 g, 5,2 mmoles) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (20 mL) se añadió a la mezcla de reacción a  $0^\circ\text{C}$ . Después de agitar durante 10 minutos se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se separó a vacío y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se lavó después con  $\text{NaHCO}_3$  saturado y salmuera, después se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró a vacío para proporcionar **88** bruto, que se utilizó sin purificación adicional.

Se añadió amoníaco acuoso (10 mL) a una solución del nucleósido **88** (anterior) en dioxano (50 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se concentró a vacío y se secó a alto vacío durante 8 horas para proporcionar el nucleósido **89**, que se utilizó sin purificación adicional.

Se añadió anhídrido benzoico (1,99 g, 8,8 mmoles) a una solución del nucleósido **89** (anterior) en DMF (10 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se vertió en EtOAc. La capa orgánica se extrajo con NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera, después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el nucleósido **90** (3,86 g, 91 % a partir de **87**) en forma de un sólido de color blanco.

### C) Nucleósido (91)

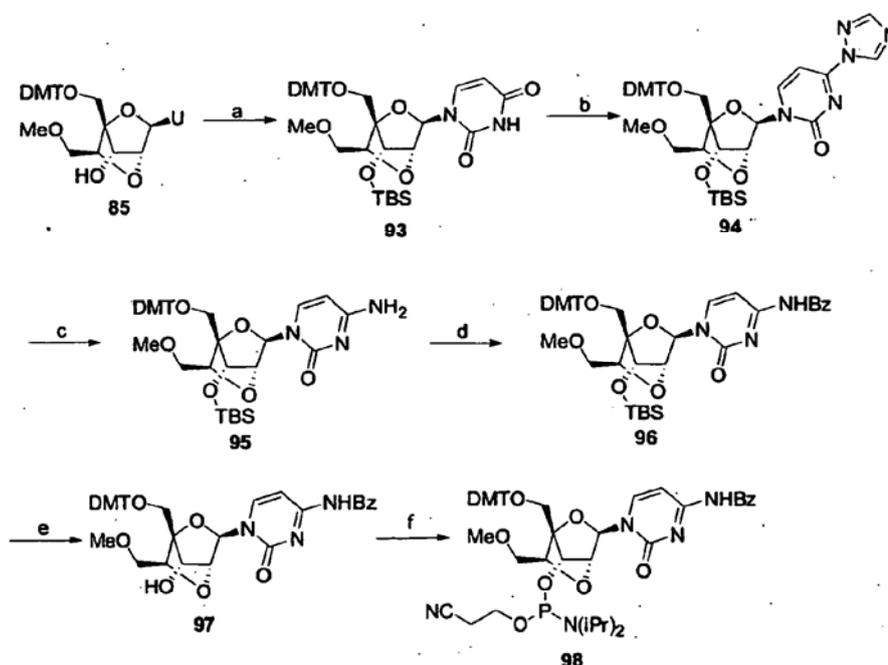
Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (4,54 mL, 27,9 mmoles) a una solución del nucleósido **90** (3,81 g, 4,7 mmoles) y trietilamina (1,56 mL, 11,2 mmoles) en THF (46 mL) en un tubo de polipropileno. Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se secó a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera, después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con MeOH/CHCl<sub>3</sub> al 5% proporcionó el nucleósido **91** (3,07 g, 94%) en forma de un sólido de color blanco.

### D) (1S,3R,4R,6R,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-N-Benzoilcitosin-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (92)

Se añadió 2-cianoetil-tetraisopropilfosforamidita (0,90 mL, 4,3 mmoles) a una solución del nucleósido **91** (2,0 g, 2,8 mmoles), tetrazol (0,16 g, 2,3 mmoles) y *N*-metilimidazol (58 µL, 0,71 mmoles) en DMF (14 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas la reacción se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera al 90% seguido de salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de EtOAc y esta solución se añadió a hexanos. El precipitado resultante se recogió y se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos de 75% a 90%) para proporcionar la fosforamidita **92** en forma de un sólido de color blanco (2,14 g, 84%). RMN P31 (CDCl<sub>3</sub>) δ: 149,82.

### Ejemplo 12

### (1S,3R,4R,6S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-N-Benzoilcitosin-1-il)-6-metoximetil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (98)



Esquema 12 (a) TBSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, rt, 16h, 97%; (b) POCl<sub>3</sub>, 1,2,4-Triazol, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, rt, 4h; (c) NH<sub>3</sub> acuoso, 1,4-dioxano, rt, 16h; (d) Bz<sub>2</sub>O, DMF, rt, 16h, 89% a partir de 93; (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h, 89%; (f) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF, 84%.

### A) Nucleósido (93)

Se añadió cloruro de *tert*-butildimetilsililo (2,25 g, 15,0 mmoles) a una solución del nucleósido **85** (3,0 g, 5,0

mmoles) e imidazol (2,03 g, 29,9 mmoles) en DMF (10 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se vertió en EtOAc. La fase orgánica se extrajo sucesivamente con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el nucleósido **93** (3,45 g, 97%) en forma de un sólido de color blanco.

5

#### B) Nucleósido (96)

Se añadió oxiclورو de fósforo (3,59 mL, 38,5 mmoles) se añadió a una suspensión refrigerada (0°C) de 1,2,4-triazol (11,3 g, 163,9 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (80 mL). Después de agitar durante 15 minutos se añadió a la reacción trietilamina (27,0 mL, 192,8 mmoles) y se continuó agitando durante 30 minutos. Se añadió a la reacción una solución del nucleósido **93** (3,45 g, 4,82 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (20 mL) a 0°C. Después de agitar durante 10 minutos se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se eliminó después a vacío y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se lavó después con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar **94** bruto, que se utilizó sin purificación adicional.

10

15

20

Se añadió amoníaco acuoso (10 mL) a una solución del nucleósido **94** (anterior) en dioxano (50 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se concentró a vacío y se secó a alto vacío durante 8 horas para proporcionar el nucleósido **95**, que se utilizó sin purificación adicional.

25

Se añadió anhídrido benzoico (1,63 g, 7,2 mmoles) a una solución del nucleósido **95** (anterior) en DMF (9 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se vertió en EtOAc. La capa orgánica se extrajo con NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc/hexanos al 50% proporcionó el nucleósido **96** (3,53 g, 89% a partir de **93**) en forma de un sólido de color blanco.

#### C) Nucleósido (97)

30

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (4,20 mL, 25,8 mmoles) a una solución del nucleósido **96** (3,53 g, 4,3 mmoles) y trietilamina (1,43 mL, 10,3 mmoles) en THF (43 mL) en un tubo de polipropileno. Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se secó a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con acetona/CHCl<sub>3</sub> 25% a 40% proporcionó el nucleósido **97** (2,87 g, 95%) en forma de un sólido de color blanco.

35

#### D) (1S,3R,4R,6S,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(4-N-Benzoilcitosin-1-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo(2,2,1)heptano (98)

40

Se añadió 2-cianoetil-tetraisopropilfosforamidita (1,35 mL, 4,3 mmoles) a una solución del nucleósido **97** (2,0 g, 2,8 mmoles), tetrazol (0,16 mg, 2,3 mmoles) y *N*-metilimidazol (58 µL, 0,71 mmoles) en DMF (1,4 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con salmuera al 90% seguido de salmuera, después se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 75% a 90% EtOAc/hexanos proporcionó la fosforamidita **98** en forma de un sólido de color blanco (2,15 g, 84%). RMN P<sup>31</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 150,33.

45

#### Ejemplo 13

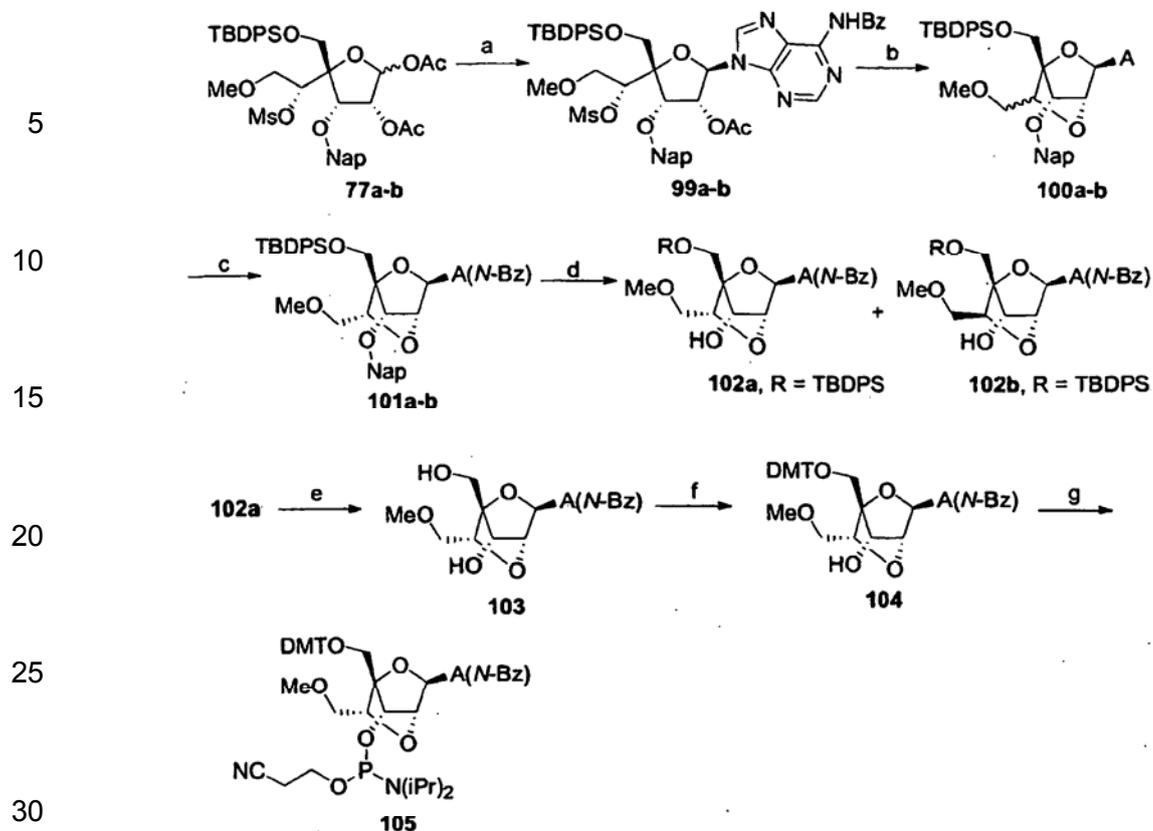
50

#### (1S,3R,4R,6R,7S)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(6-N-Benzoiladenin-9-il)-6-metoximetil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (105)

55

60

65



35

Esquema 13 (a) 6-*N*-Benzoiladenina, BSA, TMSOTf, CH<sub>3</sub>CN, reflujo, 8h; (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 16h; (c) Bz<sub>2</sub>O, DMF, rt; (d) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt; (e) Et<sub>3</sub>N.3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h; (f) DMTCl, Piridina, rt, 16h; (g) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-*i*Pr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF.

40

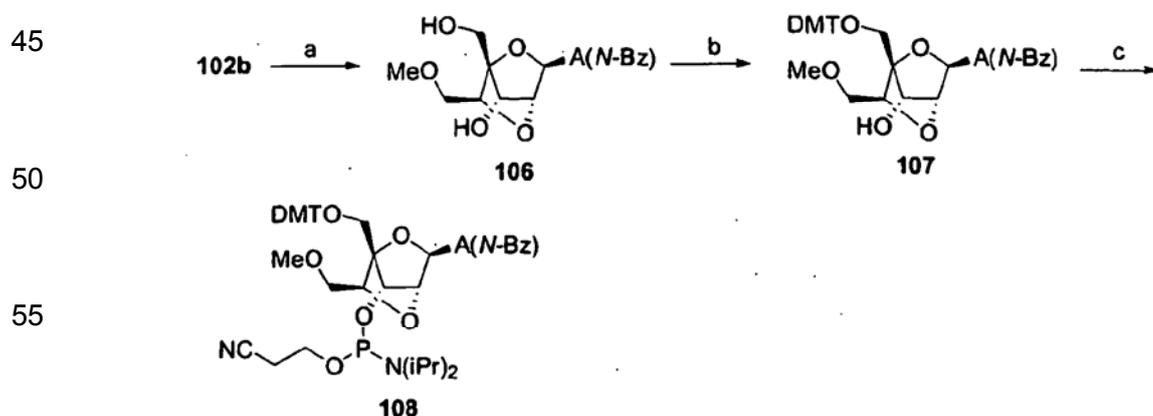
La fosforamidita **105** se prepara a partir del diacetato **77a-b** utilizando los procedimientos ilustrados para la síntesis de la fosforamidita **83** a partir de una mezcla del diacetato **77a-b**.

40

**Ejemplo 14**

45

(1*S*,3*R*,4*R*,6*S*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin oxo]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(6-*N*-Benzoiladenin-9-il)-6-metil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (**108**)



60

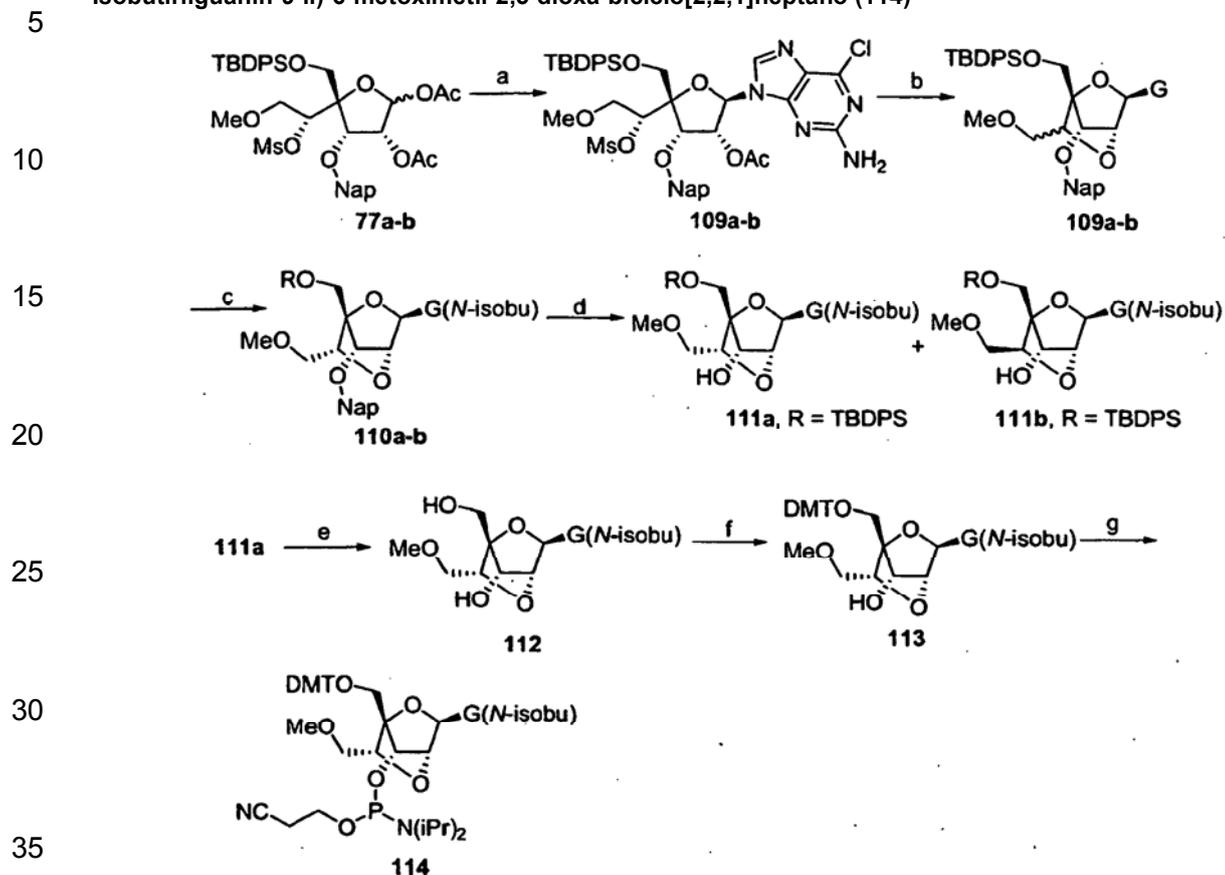
Esquema 14 (a) Et<sub>3</sub>N.3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt, 16h; (b) DMTCl, Piridina, rt, 16h; (c) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-*i*Pr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF.

65

La fosforamidita **108** se prepara a partir del nucleósido **102b** utilizando los procedimientos ilustrados para la síntesis de la fosforamidita **86** a partir de **80b**.

## Ejemplo 15

(1*S*,3*R*,4*R*,6*R*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(2-*N*-Isobutirilguanin-9-il)-6-metoximetil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (114)

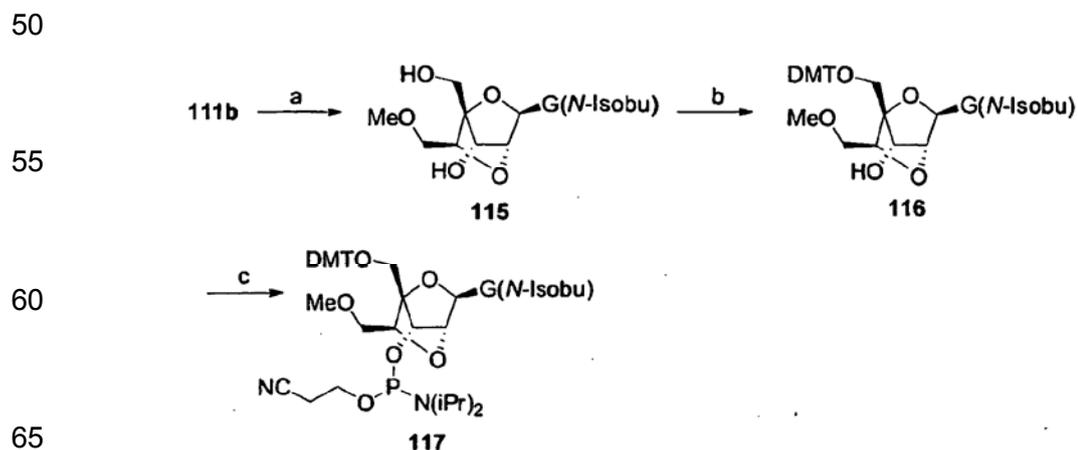


Esquema 15 (a) 2-amino-6-cloropurina, BSA, TMSOTf, CH<sub>3</sub>CN, reflujo, 2h; (b) 3-Hidroxipropionitrilo, NaH, THF, 4h; (c) anhídrido isobutírico, DMAP, DMF, 60°C, 24h; (d) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt, 16h; (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, rt; (f) DMTCl, Piridina, rt; (g) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-*i*Pr)<sub>2</sub>, Tetrazol, NMI, DMF.

La fosforamidita 114 se prepara a partir del diacetato 77a-b utilizando los procedimientos ilustrados para la síntesis de la fosforamidita 83 a partir de la mezcla del diacetato 77a-b.

## Ejemplo 16

(1*S*,3*R*,4*R*,6*S*,7*S*)-7-[2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfin-oxi]-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(2-*N*-Isobutirilguanin-9-il)-6-metoximetil-2,5-dioxa-biciclo[2,2,1]heptano (117)

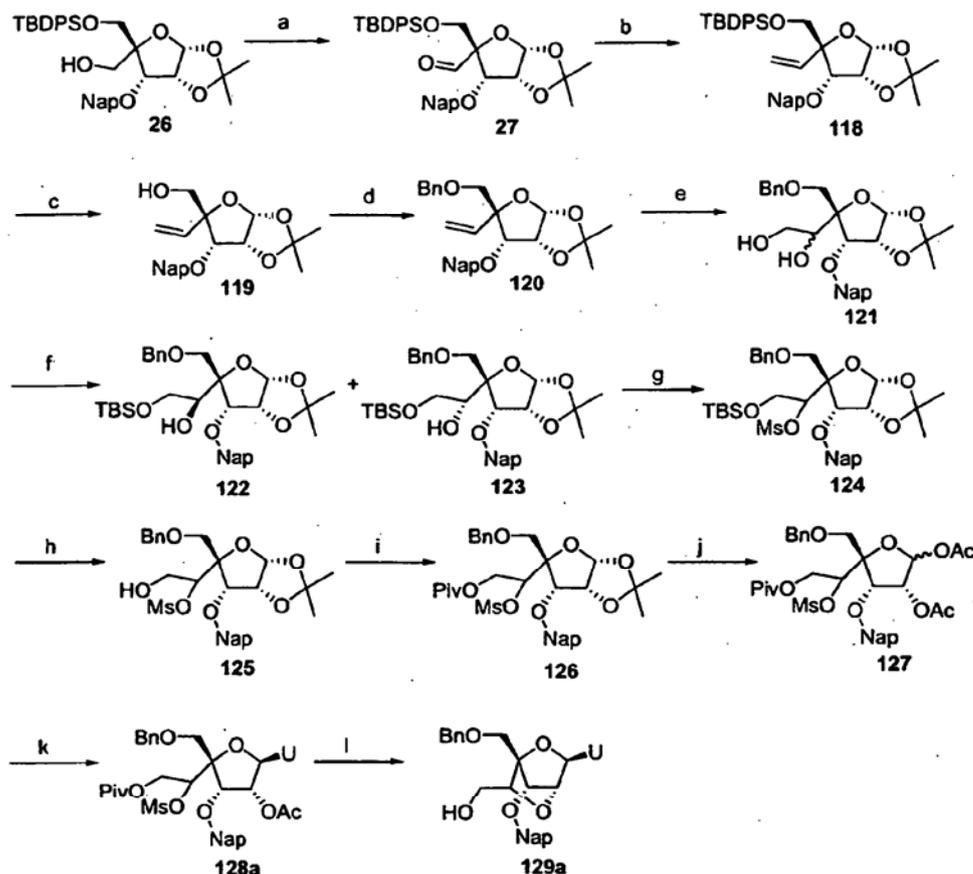


**Esquema 16** (a)  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, rt, 16h; (b) DMTCl, Piridina, rt, 16h; (c)  $\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{OP}(\text{N}\text{-iPr}_2)_2$ , Tetrazol, NMI, DMF.

La fosforamidita **117** se prepara a partir del nucleósido **111b** utilizando los procedimientos ilustrados para la síntesis de la fosforamidita **86** a partir de **80b**.

### Ejemplo 17

#### Síntesis de 6- $\text{CH}_2\text{OH}$ BNA



**Esquema 17** (a) Cloruro de oxalilo, DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$  a  $0^\circ\text{C}$ ; (b)  $\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br}$ ,  $n\text{BuLi}$ , THF,  $-78^\circ\text{C}$  a rt, 97% a partir de **26**; (c) TBAF, THF, rt, 16h, 97%; (d) NaH, BnBr, DMF, rt, 1h, cuantitativo; (e)  $\text{OsO}_4$ , NMO, acetona ac. al 95%, rt, 48, 87%; (f) TBSCl, piridina,  $0^\circ\text{C}$ , 4h, cuantitativo; (g) MsCl,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 16h; (h)  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, cuantitativo; (i) PivCl, DIPEA, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 16h; (j) AcOH, Ac<sub>2</sub>O,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  catalítico, 92% a partir de **125**; (k) BSA, uracilo, TMSOTf,  $\text{CH}_3\text{CN}$  reflujo, 2h;  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 74% a partir de **127**.

#### A) Nucleósido 118

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido (1,77 mL, 25,0 mmoles) a una solución refrigerada ( $-78^\circ\text{C}$ ) de cloruro de oxalilo (1,10 mL, 12,5 mmoles) en diclorometano (60 mL). Después de agitar durante 30 minutos, una solución de alcohol **26** (5,0 g, 8,4 mmoles) en diclorometano (20 mL) se añadió a la reacción. Se continuó agitando a  $-78^\circ\text{C}$  durante otros 45 minutos después de lo cual, se añadió gota a gota a la reacción trietilamina (5,05 mL, 37,5 mmoles). Después de agitar durante 10 minutos, se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó templando gradualmente a aprox.  $0^\circ\text{C}$ , momento en el cual, el análisis mediante TLC no indicó alcohol de partida. La reacción se diluyó con diclorometano y la capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl al 10%,  $\text{NaHCO}_3$  saturado, salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró para proporcionar el aldehído **27**, que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación alguna.

#### B) Nucleósido 118

Se añadió gota a gota nBuLi (2,5 M, 4,34 mL, 10,9 mmoles) a una solución con agitación refrigerada a (0°C) de bromuro de trifetilfosfonio (3,88 g, 10,9 mmoles) en THF seco (60 mL). Después de agitar durante 1 hora, la solución de color rojo se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota a la reacción una solución del aldehído **27** de antes (8,4 mmoles) en THF seco (15 mL). Se dejó que la reacción se templara gradualmente a temperatura ambiente y se continuó agitando durante otras 16 horas. La reacción se sofocó después cuidadosamente utilizando NH<sub>4</sub>Cl saturado y se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se lavó sucesivamente con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc en hexanos al 10% proporcionó la olefina **118** (4,84 g, 97% de **26**) en forma de un aceite incoloro.

#### C) Nucleósido 119

Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1M en THF, 10,00 mL, 10,0 mmoles) a una solución de la olefina **118** (4,83 g, 8,1 mmoles) en THF (35 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas después de lo cual el disolvente se separó a vacío y el residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc en hexanos al 40%) proporcionó el alcohol **119** (2,79 g, 97%) en forma de un aceite incoloro.

#### D) Nucleósido 120.

Se añadió hidruro de sodio (60% p/p en aceite mineral, 0,4 g, 10 mmoles) a una solución refrigerada (0°C) del alcohol **119** (1,44 g, 4,1 mmoles) y bromuro de bencilo (0,71 mL, 6,0 mmoles) en DMF (16 mL). Después de agitar durante 1 hora a 0°C, la reacción se sofocó cuidadosamente con agua y se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc de 10 a 25% en hexanos proporcionó la olefina **120** (1,84 g, cuantitativo) en forma de un aceite incoloro.

#### E) Nucleósido 121

Se añadió tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>, solución al 25% en iPrOH, 1 mL) a una solución de la olefina **120** (1,80 g, 4,0 mmoles) y *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMO, 0,94 g, 8,0 mmoles) en acetona/agua al 95% (25 mL). Después de agitar durante 16h a temperatura ambiente, se añadieron una solución de OsO<sub>4</sub> (0,5 mL) y NMO (0,40 g) adicionales a la reacción. Después de agitar durante un total 48 horas, la reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NaHSO<sub>3</sub> al 10%, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc en hexanos de 40 a 50% proporcionó el diol **121** (1,68 g, 87%, mezcla de isómeros aprox. 1:1) en forma de un aceite incoloro.

#### F) Nucleósidos 122 y 123

Se añadió TBSCl (0,66 g, 4,4 mmoles) se añadió a una solución refrigerada (0°C) del diol **121** (1,63 g, 3,4 mmoles) en piridina (17 mL). Después de agitar durante 4 h a 0°C, la reacción se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc en hexanos de 10 a 20%) proporcionó los alcoholes **122** y **123** (0,90 g y 1,17 g, esteoquímica absoluta no asignada) en forma de aceites incoloros.

#### G) Nucleósido 124

Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (0,24 mL, 3,0 mmoles) a una solución refrigerada (0°C) del alcohol **123** (estereoquímica absoluta no asignada, 0,9 g, 1,5 mmoles), trietilamina (0,46 mL, 3,3 mmoles) y dimetilaminopiridina (37 mg, 0,3 mmoles) en diclorometano (5 mL). Al cabo de 7 horas a temperatura ambiente, se añadieron a la reacción cloruro de metanosulfonilo (0,12 mL) y trietilamina (0,23 mL) adicionales. Después de agitar durante otras 9 horas a temperatura ambiente, la reacción se vertió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con HCl al 10%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc en hexanos de 10 a 15% proporcionó el mesilato **124** (0,44 g, 44%) y el diol **123** de partida (0,32 g, 40%).

#### H) Nucleósido 125

Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (0,64 mL, 4,0 mmoles) a una solución del mesilato **124** (0,44 g, 0,6 mmoles) y trietilamina (0,23 mL, 1,7 mmoles) en THF (7 mL). Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con EtOAc y la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc en hexanos al 50%) proporcionó el alcohol **125** (0,40 g, cuantitativo).

#### I) Nucleósido 127

Se añadió gota a gota cloruro de pivaloilo (0,12 mL, 1,0 mmoles) a una solución fría (0°C) del alcohol **125** (0,72 mmoles, 0,4 g), diisopropiletilamina (DIPEA, 0,17 mL, 1,0 mmoles) y dimetilaminopiridina (12 mg, 0,1 mmoles) en diclorometano (2 mL). Después se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas después de lo cual se añadieron DIPEA (0,17 mL) y cloruro de pivaloilo (0,12 mL) adicionales y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se diluyó después con EtOAc y la capa orgánica se lavó con HCl 10%, NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para proporcionar el pivaloato bruto **126**, que se utilizó sin purificación adicional alguna.

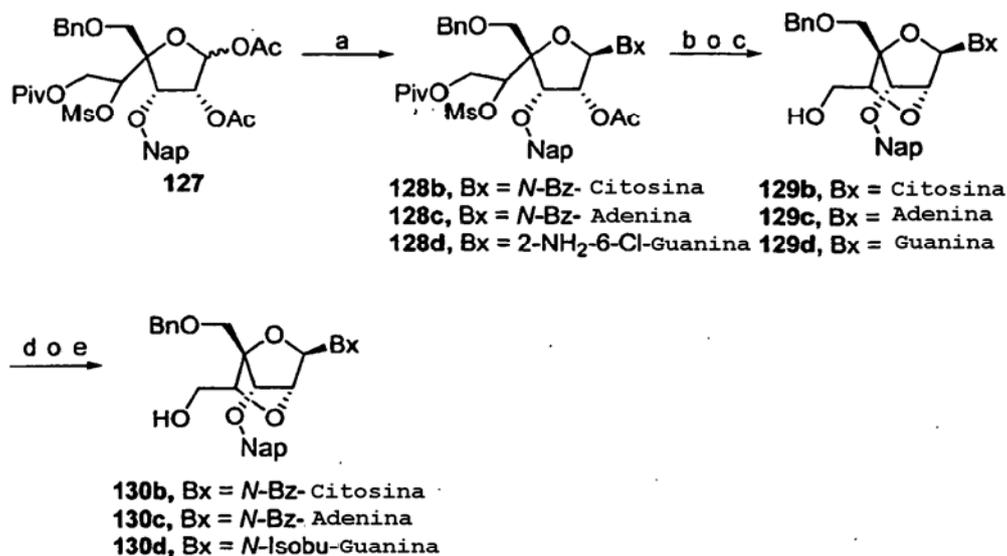
Se añadió ácido sulfúrico concentrado (2 gotas) a una solución del pivaloato bruto **126** (anterior) en ácido acético glacial (2,5 mL) y anhídrido acético (0,5 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, el disolvente se eliminó a alto vacío y el residuo se disolvió en EtOAc y la capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con EtOAc en hexanos de 10 a 15% proporcionó el diacetato **127** (0,45 g, 92% de **125**) en forma de un aceite incoloro (mezcla de anoméricos).

#### J) Nucleósido **129a**

Se añadió *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (0,8 mL, 3,3 mmoles) a una suspensión del diacetato **127** (0,45 g, 0,65 mmoles) y uracilo (0,15 g, 1,3 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (3,5 mL). Después de calentar a 40°C durante 15 min para obtener una solución clara, se añadió a la reacción triflato de trimetilsililo (0,24 mL, 1,3 mmoles). Después de someter a reflujo durante 2 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para proporcionar el nucleósido bruto **128a**, que se utilizó sin purificación alguna.

Se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mg, 0,3 mmoles) a una solución del nucleósido **128a** (0,11 g, 0,15 mmoles) en MeOH (1,5 mL). Después de agitar durante 16h a temperatura ambiente, el disolvente se separó a vacío y el residuo se repartió entre EtOAc y salmuera. La fase orgánica se recogió, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró, a vacío para proporcionar **129a** (estereoquímica absoluta no determinada). La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con acetona al 35% en CHCl<sub>3</sub> proporcionó el nucleósido **129a** (57 mg, 74% de **127**). RMN H1 (CDCl<sub>3</sub>): δ 9,37 (s, 1H), 7,92-7,61 (m, 5H), 7,55-7,23 (m, 9H), 5,58 (s, 1H), 5,43 (d, 1H, *J* = 8,1), 4,79 (d, 1H, *J* = 11,7), 4,66 (d, 1H, *J* = 11,7), 4,58 (m, 2H), 4,51 (s, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,05 (s, 1H), 3,95-3,72 (m, 4H). LCMS: tiempo de retención 3,34 min; M+H calcd. 517,19, encontrado 517,1.

#### Ejemplo 18



**Esquema 18.** (a) *N*-Bz-Citosina o 6-*N*-Bz-adenina o 2-amino-6-cloropurina, BSA, TMSOTf, MeCH, reflujo; (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 16h (para **129b-c**); (c) NaH, 3-hidroxiopropionitrilo, rt, (para **129d**); (d) TMSCl, piridina, BzCl o Bz<sub>2</sub>O, DMF (para **130b-c**); (e) TMSCl, piridina, cloruro de isobutirilo (para **139d**)

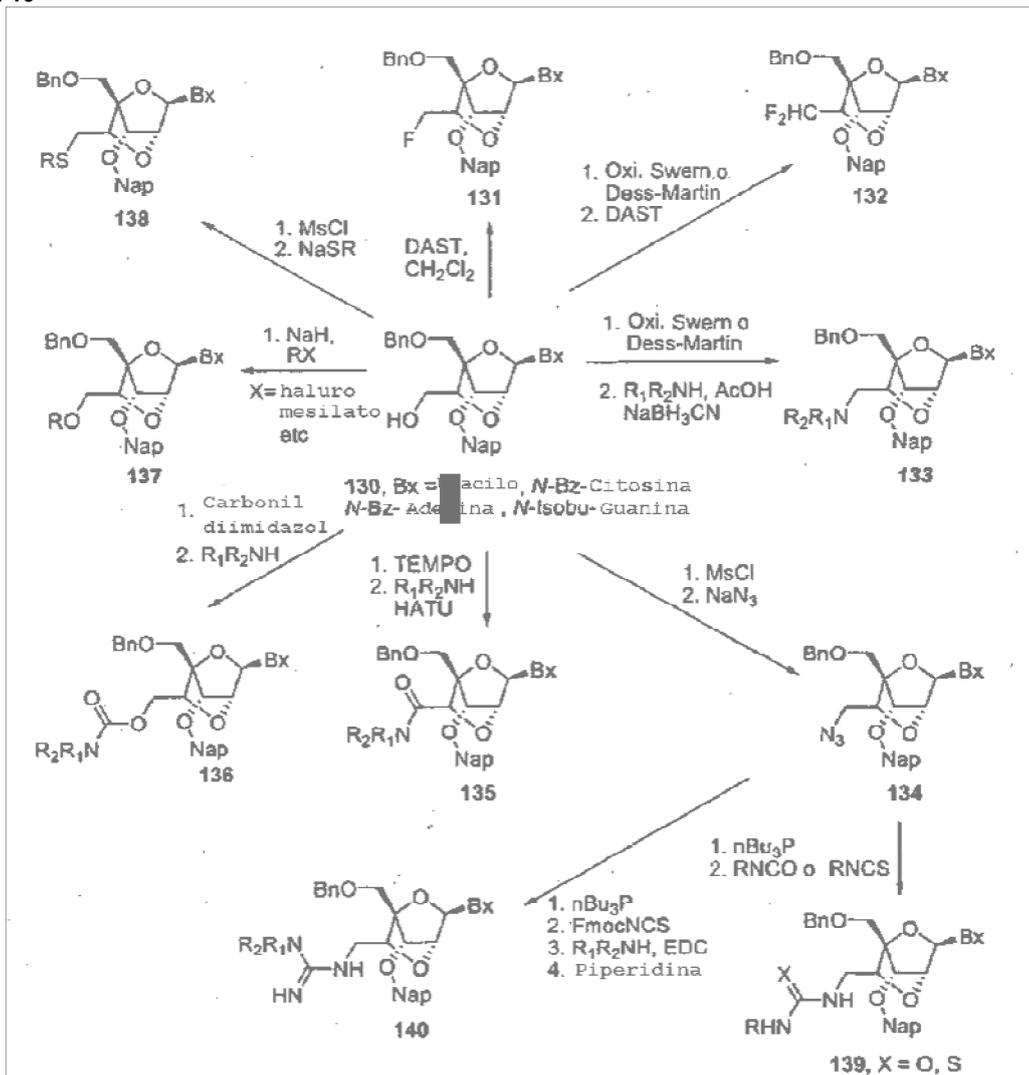
Los nucleósidos **128b**, **128c** y **128d** se preparan a partir de un azúcar precursor **127** mediante una reacción de Vorbrugen utilizando *N*-Bz-citosina, 6-*N*-Bz-adenina y 2-amino-6-cloropurina respectivamente (Esquema 18). El tratamiento de **128b** y **128c** con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y MeOH proporciona los nucleósidos **129b** y **129c** respectivamente. El tratamiento de **128d** con hidruro de sodio y 3-hidroxiopropionitrilo proporciona el nucleósido **129d**. La protección

transitoria del grupo hidroxilo con TMSCl seguido de reacción con cloruro de benzoilo proporciona los nucleósidos **130b** y **130c** respectivamente. Alternativamente la transformación anterior también se puede completar haciendo reaccionar los nucleósidos **129b** y **129c** con anhídrido benzoico utilizando DMF como disolvente. El nucleósido **130d** se prepara mediante protección transitoria con TMSCl en exceso en piridina seguido de reacción con cloruro de isobutirilo.

**Ejemplo 19**

**Preparación de análogos sustituidos en 6'**

**Esquema 19**



**R, R1 y R2 son cada uno independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, alquilo sustituido, alqueno sustituido, alquino sustituido, o un grupo protector**

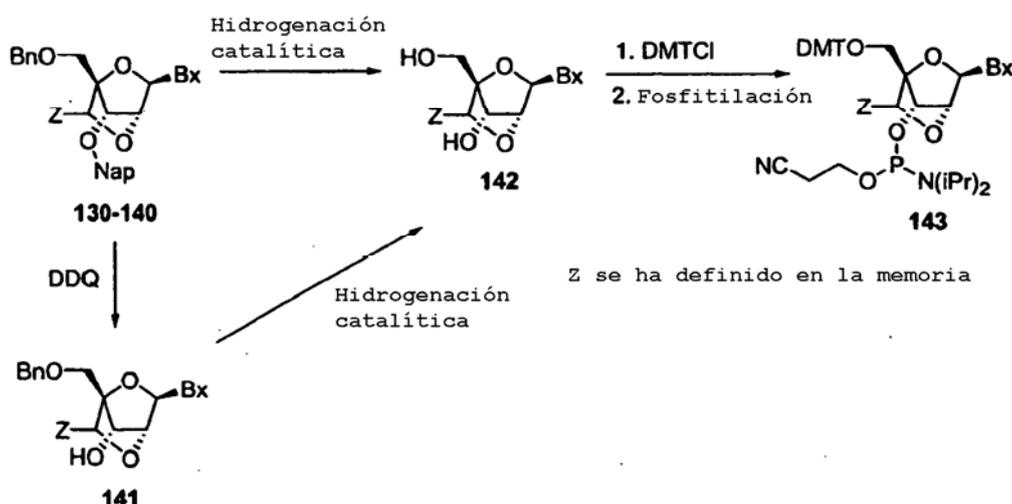
El nucleósido **131** se prepara a partir del nucleósido **130** mediante tratamiento con un agente fluorante tal como DAST utilizando diclorometano como el disolvente. El nucleósido **132** se prepara a partir de **130** oxidando primero el grupo hidroxilo primario con peryodiano de Dess-Martin o en condiciones de Swern seguido de tratamiento del aldehído resultante con DAST. El nucleósido **133** se prepara a partir de **130** oxidando primero el grupo hidroxilo primario con peryodiano de Dess-Martin o en condiciones de Swern seguido de aminación reductiva del aldehído resultante con una amina primaria o secundaria en presencia de ácido acético glacial y un agente reductor tal como cianoborohidruro de sodio. El nucleósido **134** se prepara a partir de **130** convirtiendo el grupo hidroxilo en un grupo eliminable (mesilato, tosilato, haluro) seguido de calentamiento con azida de sodio en exceso. El nucleósido **135** se prepara a partir de **130** mediante oxidación del alcohol primario a un ácido carboxílico seguido de reacción con una amina en presencia de HATU o cualquier otro reactivo acoplador de péptidos. El nucleósido **136** se prepara a partir de **130** activando el grupo hidroxilo con carbonildiimidazol seguido de reacción con una amina. El

nucleósido **137** se prepara a partir de **130** desprotonando el grupo hidroxilo con una base apropiada seguido de extinción del anión con un reactivo alquilante. El nucleósido **138** se prepara a partir de **130** convirtiendo el grupo hidroxilo en un grupo eliminable seguido de desplazamiento con un nucleófilo tiol. El nucleósido **139** se prepara a partir de **134** mediante reducción del grupo azida seguido de reacción con un isocianato o un isotiocianato. El nucleósido **140** se prepara a partir de **134** mediante reducción del grupo azido y reacción con FmocNCS para proporcionar una tiourea activada. La reacción adicional de la tiourea activada con fmoc con una amina en presencia de EDC proporciona la guanidina sustituida. La eliminación del grupo protector fmoc libera el nucleósido **140**.

**Ejemplo 20**

**Preparación de nucleósidos de BNA fosoramidita sustituidos en la posición 6**

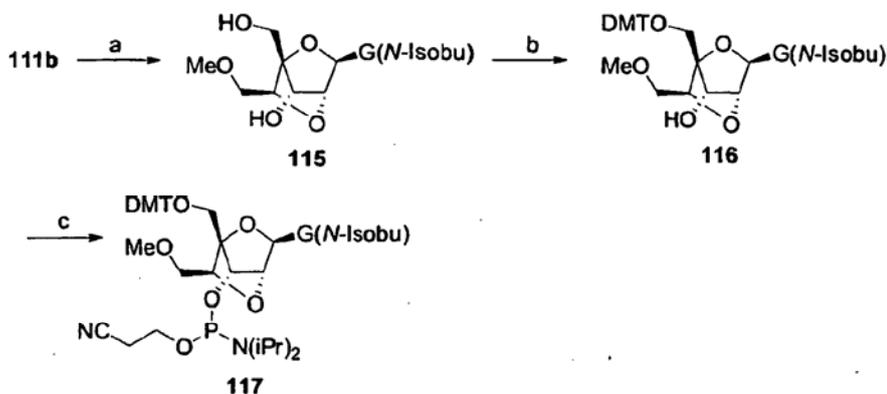
**Esquema 20**



El nucleósido **142** se prepara a partir del nucleósido **130-140** mediante hidrogenación catalítica para eliminar los grupos protectores 3'- y 5'-O. Alternativamente, **142** se puede preparar a partir de **130-140** separando primero el grupo 3'-O-Nap con DDQ seguido de una hidrogenación catalítica para eliminar el grupo 5'-O-bencilo. La posterior protección del grupo 5' hidroxilo en forma de dimetoxitritiléter seguido de una reacción de fosfitilación proporciona la fosoramidita **143**.

**Ejemplo 21**

**Preparación de 6-CH<sub>2</sub>F nucleósido**



**Esquema 23** (a) DAST, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, de -78°C a rt, 16h, 52%; (b) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt, 8h, cuant. (c) Pd/C 10%, balón H<sub>2</sub>, 50%; (d) DMTCl, piridina, 55%; (e) (iPr)<sub>2</sub>NPOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, tetrazol, NMI, DMF.

**A) Nucleósido (131a).**

Se añadió trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST, 0,16 mL, 1,4 mmoles) a una solución refrigerada (-50°C)

**129a** (0,1 g, 0,2 mmoles) en diclorometano (2 mL). La reacción se templó gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas después de lo cual, se sofocó cuidadosamente con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La reacción se repartió después entre EtOAc y salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc en hexanos al 33% proporcionó el nucleósido **131a** (51 mg, 52%, contaminado con 15-20% de una impureza de anillo abierto) en forma de una mezcla de isómeros). RMN F<sup>19</sup> (CDCl<sub>3</sub>): δ -227,98 (m) y -231,07 (m). LCMS: tiempo de retención 3,84 min; M+H calcd. 519,19, encontrado 519,1 y 3,89 min; M+H calcd. 519,19, encontrado 519,1.

#### B) Nucleósido (141a).

Se añadió DDQ (44 mg, 0,2 mmoles) a una solución del nucleósido **131a** (51 mg, 0,1 mmoles) en diclorometano (1 mL) y agua (2 gotas). Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas, la reacción se diluyó con EtOAc y la fase orgánica se lavó con una solución de NaHSO<sub>3</sub> al 10%, solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, acetona en cloroformo al 30% proporcionó el nucleósido **141a** (41 mg, cuantitativo en forma de una mezcla de isómeros). RMN F<sup>19</sup> (CDCl<sub>3</sub>): δ -229,3 (t) y -230,97 (dt). LCMS: tiempo de retención 2,66 min; M+H calcd. 379,12, encontrado 379,0.

#### C) Nucleósido (142a).

Una mezcla del nucleósido **141a** (41 mg, anterior) y paladio sobre carbono al 10% (10 mg) en metanol (2 mL) se hidrogenó utilizando un balón de hidrógeno. Al cabo de 3 horas, se consumió todo el nucleósido de partida **141a** (según se indica mediante el análisis LCMS de la mezcla de reacción). La reacción se filtró a través de celite y el producto filtrado se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, metanol en cloroformo de 10 a 20% proporcionó el nucleósido **142a** (14 mg, 50%) en forma de una mezcla de isómeros. RMN F<sup>19</sup> (CDCl<sub>3</sub>): δ -231,45 (t) y -232,88 (dt). LCMS: tiempo de retención 1,72 min; M+Na calcd. 311,08, encontrado 311,0.

#### D) Nucleósido (142aa).

Se añadió DMTCl (24 mg, 0,07 mmoles) a una solución del nucleósido **142a** (14 mg, 0,049 mmoles) en piridina (0,25 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, la reacción se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, acetona en cloroformo de 20 a 30% proporcionó el nucleósido **142aa** (16 mg, 55%) en forma de una mezcla de isómeros. RMN F<sup>19</sup> (CDCl<sub>3</sub>): δ -228,6 (t) y -230,91 (dt). LCMS: tiempo de retención 3,56 min; M+Na calcd. 613,21, encontrado 613,1.

#### E) Amidita (143a).

La amidita **143a** se prepara a partir del nucleósido **142aa** utilizando una reacción de fosfitilación como se ha descrito en el Ejemplo 1.

### Ejemplo 22

#### Síntesis de Nucleósido Fosforamiditas

La preparación de las nucleósido fosforamiditas se realiza siguiendo los procedimientos ilustrados en la presente memoria y en la técnica tal como pero no limitada a la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.426.220 y la Solicitud de Patente Internacional publicada PCT WO 02/36743.

### Ejemplo 23

#### Síntesis de oligonucleótidos y oligonucleósidos

Los compuestos oligoméricos utilizados de acuerdo con esta invención se pueden elaborar convenientemente y rutinariamente a través de la técnica de síntesis en fase sólida bien conocida. El equipo para tal síntesis es vendido por diversos proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Se puede emplear adicionalmente o alternativamente cualquier otro medio para tal síntesis conocida en la técnica. Es bien conocido utilizar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados alquilados.

Oligonucleótidos: los oligonucleótidos de fosfodiéster (P=O) no sustituidos y sustituidos se pueden sintetizar en un sintetizador de ADN automático (Applied Biosystems modelo 394) utilizando la química de la fosforamidita convencional con oxidación por yodo.

Los fosforotioatos (P=S) se sintetizan de una manera similar a los oligonucleótidos de fosfodiéster con las siguientes excepciones: la tación se efectúa utilizando una solución al 10% p/v de 1,1-dioxido de 3,H-1,2-

5 benzoditiol-3-ona en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces fosfito. El tiempo de la etapa de reacción de tianción se incrementa a 180 seg y está precedida por la etapa de protección terminal normal. Después de la escisión de la columna de CPG y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55°C (12-16 hr), los oligonucleótidos se recuperan mediante precipitación con más de 3 volúmenes de etanol en una solución de NH<sub>4</sub>OAc 1 M. Los oligonucleótidos fosfinados se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.508.270.

10 Los oligonucleótidos de alquilfosfonato se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.469.863.

Los oligonucleótidos de 3'-desoxi-3'-metilfosfonato se pueden preparar como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.610.289 o 5.625.050.

15 Los oligonucleótidos de fosforamidita se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.256.775 o la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.366.878.

20 Los oligonucleótidos de alquilfosfonotioato se pueden preparar como se describe en las solicitudes PCT publicadas PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como Solicitud de Patente Internacional WO 94/17093 y WO 94/02499, respectivamente).

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

25 Los oligonucleótidos de fosfotriéster se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.023.243.

Los oligonucleótidos de boranofosfato se pueden preparar como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.130.302 y 5.177.198.

30 Oligonucleósidos: los oligonucleósidos conectados con metilmetilimino, también identificados como oligonucleósidos conectados con MMI, oligonucleósidos conectados metilendimetilhidrazo, también identificados como oligonucleósidos conectados con MDH, y oligonucleósidos conectados con metilencarbonilamino, también identificados como oligonucleósidos conectados con amida-3, y oligonucleósidos conectados con metilaminocarbonilo, también identificados como oligonucleósidos conectados con amida-4, así como compuestos oligoméricos de cadena principal mixta que tienen, por ejemplo, enlaces MMI y P=O o P=S alternos se pueden preparar como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.378.825; 5.386.023; 5.489.677; 5.602.240 y 5.610.289.

40 Los oligonucleósidos conectados con formacetal y tioformacetal se pueden preparar como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.264.562 y 5.264.564.

Los oligonucleósidos conectados con etilenoxi se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.618.

#### 45 **Ejemplo 24**

##### **Aislamiento de Oligonucleótidos**

50 Después de la escisión del soporte sólido de vidrio de poro controlado y desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55°C durante 12-16 horas, los oligonucleótidos u oligonucleósidos son recuperados mediante precipitación en NH<sub>4</sub>OAc 1 M con >3 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados se analizan mediante espectroscopia de masas por electropulverización (determinación del peso molecular) y mediante electroforesis en gel capilar. Las cantidades relativas de enlaces fosforotioato y fosfodiéster obtenidos en la síntesis se determinan mediante la razón de peso molecular correcto con respecto al producto -16 amu (+/-32 +/-48). Para algunos estudios 55 los oligonucleótidos se purifican mediante HPLC, como describen Chiang et al., J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con el material purificado por HPLC son generalmente similares a los obtenidos con el material no purificado mediante HPLC.

#### 60 **Ejemplo 25**

##### **Síntesis de Oligonucleótidos – Formato de Placa de 96 Pocillos**

65 Se pueden sintetizar oligonucleótidos por medio de la química de la fosforamidita en fase sólida P(III) en un sintetizador automático capaz de ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato de 96 pocillos. Se proporcionan conexiones internucleótido fosfodiéster mediante oxidación con yodo acuoso. Se generan conexiones

internucleótido fosforotioato mediante sulfuración utilizando 1,1-dióxido de 3,4-dihidro-1,2-benzoditiol-3-ona (Reactivo de Beaucage) en acetonitrilo anhidro. Se adquieren beta-cianoetil-diisopropil-fosforamiditas con la base protegida convencionales de proveedores comerciales (p. ej PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, o Pharmacia, Piscataway, NJ). Se sintetizan nucleósidos no convencionales mediante métodos convencionales o patentados. Se utilizan en forma de beta-cianoetildiisopropil-fosforamiditas con la base protegida.

Los oligonucleótidos se escinden del soporte y se desprotegen con NH<sub>4</sub>OH concentrado a una temperatura elevada (55-60°C) durante 12-16 horas y el producto liberado se seca después a vacío. El producto seco se resuspende después en agua estéril para proporcionar una placa maestra a partir de la cual se diluyen después todas las muestras de placas analíticas y de ensayo utilizando pipeteadores robotizados.

#### Ejemplo 26

#### Análisis de Oligonucleótidos utilizando un Formato de Placa de 96 Pocillos

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

#### Ejemplo 27

#### Cultivo celular y tratamiento de oligonucleótidos

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

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

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

Experimentos que implican tratamiento de células con compuestos oligoméricos:

Cuando las células alcanzan una confluencia apropiada, se tratan con compuestos oligoméricos utilizando un método de transfección como se ha descrito.

#### LIPOFECTINA<sup>™</sup>

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

Otros reactivos de transfección adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no están limitados a, CYTOFECTINA™, LIPOFECTAMINA™, OLIGOFECTAMINA™, y FUGENE™. Otros métodos de transfección adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no están limitados a, electroporación.

5

### Ejemplo 28

#### Análisis de inhibición con oligonucleótido de una expresión diana

Se puede analizar la modulación antisentido de una expresión diana de una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden cuantificar los niveles de ARNm diana, p. ej., mediante análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR), o PCR en tiempo real. Actualmente se desea la PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis mediante PCR se puede realizar sobre el ARN celular total o ARNm poli(A)+. Un método de análisis de ARN de la presente invención es el uso de ARN celular total como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia Northern también es rutinario en la técnica. La (PCR) cuantitativa en tiempo real se puede completar convenientemente utilizando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM® 7600, 7700, o 7900, asequible comercialmente de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizarlo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20

Los niveles de proteína de una diana se pueden cuantificar de varias maneras bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis (inmunotransferencia) Western, análisis de inmuoabsorción con enzima ligada (ELISA) o clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a una diana pueden ser identificados y obtenidos de una variedad de fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o se pueden preparar por medio de métodos de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales convencionales bien conocidos en la técnica. Los métodos de preparación de antisueros policlonales son ilustrados, por ejemplo, por Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, págs. 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997. La preparación de anticuerpos monoclonales es ilustrada, por ejemplo, por Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, págs. 11.4.1-11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

30

Los métodos de inmunoprecipitación son convencionales en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, págs. 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998. El análisis de transferencia (inmunotransferencia) Western es convencional en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, págs. 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997. Los análisis de inmuoabsorción con enzima ligada (ELISA) son convencionales en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, págs. 11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991.

35

### Ejemplo 29

#### Diseño de análisis fenotípicos y estudios *in vivo* para el uso de inhibidores de la diana

##### Análisis Fenotípicos

45

Una vez que los inhibidores de la diana han sido identificados por los métodos descritos en la presente memoria, los compuestos oligoméricos se investigan adicionalmente en uno o más análisis fenotípicos, teniendo cada uno criterios de valoración predictivos medibles de la eficacia en el tratamiento de una enfermedad o afección concreta.

50

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

55

En un ejemplo no limitante, se tratan las células que se ha determinado que son apropiadas para un análisis fenotípico concreto (esto es, células MCF-7 seleccionadas para estudios de cáncer de mama; adipocitos para estudios de obesidad) con inhibidores diana identificados a partir de los estudios *in vitro* así como compuestos de control a concentraciones óptimas que se determinan mediante los métodos descritos antes. Al final del período

65

de tratamiento, se analizan las células tratadas y no tratadas mediante uno o más métodos específicos para el análisis para determinar los resultados y criterios de valoración fenotípicos.

5 Los criterios de valoración fenotípicos incluyen cambios en los niveles de los componentes celulares tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas, sacáridos o metales. Las medidas del estado celular que incluyen el pH, la fase del ciclo celular, la absorción o la excreción de indicadores biológicos por la célula, también son criterios de valoración de interés.

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

### 15 **Estudios *in vivo***

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

### 20 **Ejemplo 30**

#### **Aislamiento de ARN**

#### ***Aislamiento de ARNm poli(A)+***

25 Se aísla ARNm poli(A)+ de acuerdo con Miura et al., (Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764). Otros métodos para el aislamiento de ARNm poli(A)+ son rutinarios en la técnica. En resumen, para las células desarrolladas sobre placas de agar de 96 pocillos, se elimina el medio de crecimiento de las células y se lava cada pocillo con 200 µL de PBS frío. Se añaden 60 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, NP-40 al 0,5%, complejo de vanadil-ribonucleósido 20 mM) a cada pocillo, la placa se agita suavemente y después se incuba a la temperatura ambiente durante cinco minutos. Se transfieren 55 µL de producto lisado a placas de 96 pocillos recubiertas con Oligo d(T) (AGCT Inc., Irvine CA). Las placas se incuban durante 60 minutos a la 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 transfiere a toallas de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado y después se seca al aire durante 5 minutos. Se añaden 60 µL de tampón de elución (Tris-HCl 5 mM pH 7,6), se precalienta a 70°C, se añade a cada pocillo, la placa se incuba sobre una placa caliente a 90°C durante 5 minutos, y 35 el producto eluido se transfiere después a una placa de 96 pocillos nueva.

Las células desarrolladas sobre 100 mm u otras placas convencionales se pueden tratar de un modo similar, utilizando volúmenes apropiados de todas las soluciones.

### 40 ***Aislamiento del ARN Total***

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

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

### **Ejemplo 31**

#### **Análisis de PCR Cuantitativa en Tiempo Real de los Niveles de ARNm Diana**

65

La cuantificación de los niveles de ARNm diana se completó mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM<sup>®</sup> 7600, 7700, o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este es un sistema de detección de fluorescencia, no basado en gel, de tubo cerrado que permite la cuantificación de alto rendimiento de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

en tiempo real. En oposición a la PCR convencional en la que los productos de amplificación son cuantificados después de completar la PCR, los productos de la PCR cuantitativa en tiempo real se cuantifican a medida que se acumulan. Esto se completa incluyendo en la reacción de PCR una sonda oligonucleotídica que hibrida específicamente entre los cebadores directo e inverso de la PCR, y contiene dos colorantes fluorescentes. Se une un colorante informador (p. ej., FAM o JOE, obtenidos de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) al extremo 5' de la sonda, se une un colorante extintor (p. ej., TAMRA, obtenido de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y los colorantes están intactos, la emisión del colorante informador es extinguida por la proximidad del colorante extintor 3'. Durante la amplificación, la hibridación de la sonda a la secuencia diana crea un sustrato que puede ser escindido por la actividad exonucleasa 5' de la polimerasa Taq. Durante la fase de extensión del ciclo de amplificación de la PCR, la escisión de la sonda por la polimerasa Taq libera el colorante informador del resto de la sonda (y por consiguiente del radical extintor) y se genera una señal de fluorescencia específica de la secuencia. Con cada ciclo, se escinden más moléculas de colorante informador de sus respectivas sondas, y se verifica la intensidad de fluorescencia a intervalos regulares mediante óptica láser montada en el Sistema de Detección ABI PRISM<sup>®</sup>. En cada análisis, una serie de reacciones paralelas que contienen diluciones seriadas de ARNm de muestras de control no tratadas genera una curva patrón que se utiliza para cuantificar el porcentaje de inhibición después del tratamiento de las muestras de ensayo con oligonucleótidos antisentido.

Antes del análisis de PCR cuantitativo, se evalúan grupos de cebadores-sondas específicos para el gen diana cuya capacidad para ser "multiplexado" con una reacción de amplificación de GAPDH se está midiendo. En la multiplexación, tanto el gen diana como el gen patrón interno GAPDH se amplifican concurrentemente en una única muestra. En este análisis, el ARNm aislado de las células no tratadas se diluye seriadamente. Cada dilución se amplifica en presencia de grupos de cebadores-sondas específicos para GAPDH solamente, gen diana solamente ("uni-plexación"), o ambos (multiplexación). Después de la amplificación por PCR, se generan curvas patrón de GAPDH y señal de ARNm diana como una función de la dilución a partir de las muestras tanto de uni-plexación como de multiplexación. Si tanto la pendiente como el coeficiente de correlación de GAPDH y las señales diana generadas a partir de las muestras de multiplexación están dentro del 10% de sus valores correspondientes generados a partir de las muestras de uni-plexación, se considera que el grupo de cebadores-sonda específico para esa diana es multiplexable. También se conocen en la técnica otros métodos de PCR.

Se obtuvieron los reactivos para la RT PCR de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La PCR en tiempo real RT, se llevó a cabo añadiendo 20 µL de cóctel para PCR (2,5 x tampón de PCR menos MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 6,6 mM, cada uno de los dATP, dCTP, dGTP y dTTP 375 µM cada uno, cada uno de los cebadores directo e inverso 375 nM, 125 nM de sonda, 4 Unidades de inhibidor de ARNasa, 1,25 Unidades de PLATINUM<sup>®</sup> Taq, 5 Unidades de transcriptasa inversa MuLV, y 2,5x colorante ROX) a placas de 96 pocillos que contenían 30 µL de solución de ARN total (20-200 ng). La reacción de RT se llevó a cabo mediante incubación durante 30 minutos a 48°C. Después de una incubación de 10 minutos a 95°C para activar PLATINUM<sup>®</sup> Taq, se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95°C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido de 60°C durante 1,5 minutos (hibridación/extensión).

Las cantidades de diana génica obtenidas mediante PCR en tiempo real, RT se normalizan utilizando cualquier nivel de expresión de GAPDH; un gen cuya expresión es constante, o cuantificando el ARN total utilizando RIBOGREEN<sup>®</sup> (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH se cuantifica mediante RT-PCR en tiempo real, que se hace funcionar simultáneamente con la diana, mediante multiplexación, o por separado. El ARN total se cuantifica utilizando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen<sup>®</sup> (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Los métodos de cuantificación de ARN por medio de RIBOGREEN<sup>®</sup> son ilustrados por Jones, L.J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998,265, 368-374).

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

## Ejemplo 32

### Cebadores y sondas específicos de la diana

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

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

Cebador directo: AATGGCTAAGTGAAGATGACAAATCAT (SEQ ID NO: 2)

Cebador inverso: TGACATATCATTACACCAGTTCGT (SEQ ID NO: 3)

Y la sonda de PCR:

FAM-TTGCAGCAATTCCTGTAAGCTGGAAAGG-TAMRA (SEQ ID NO: 4),

donde FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante extintor.

### Ejemplo 33

#### 15 Análisis de transferencia Western de los niveles de proteína diana

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

### 25 Ejemplo 34

#### Oligómeros con espacios 6-(R o S)-CH<sub>3</sub> y 6-(R o S)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> BNA 2-10-2 dirigidos a PTEN: estudio in vitro

De acuerdo con la presente invención, se sintetizaron compuestos oligoméricos y se sometieron a ensayo en busca de su capacidad para reducir la expresión de PTEN a lo largo de un intervalo de dosificaciones. Las células b.END se trataron con los oligómeros modificados 6-(R o S)-CH<sub>3</sub>-BNA (392748 y 392749 respectivamente) y 6-(R o S)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> (396004 y 396005 respectivamente) a concentraciones de 0,3125, 0,0625, 1,25, 2,5, 5, 10 o 20 nM utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Los niveles de expresión de PTEN se determinaron utilizando la PCR en tiempo real y se normalizaron para RIBOGREEN® como se ha descrito en otros ejemplos en la presente memoria. Las curvas dosis-respuesta resultantes se utilizaron para determinar la CE<sub>50</sub> como se muestra más abajo. Las T<sub>m</sub> se evaluaron en tampón fosfato 100 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7, a 260 nm utilizando oligómeros modificados 6-(R o S)-CH<sub>3</sub>-BNA o 6-(R o S)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> 4 µM y ARN complementario 4 µM.

SEQ ID NO.	NO./ISIS	Composición (5' a 3')	CE <sub>50</sub>	T <sub>m</sub> °C
05/392748		<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	10,3	58,9
05/392749		<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	6,4	59,1
05/396004		<b><u>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></u>TAGCACTGGCC<u>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></u></b>	6,0	56,9
05/396005		<b><u>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></u>TAGCACTGGCC<u>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></u></b>	5,0	57,6
05/392745		<b>C<sub>I</sub>U<sub>I</sub>TAGCACTGGCC<sub>I</sub>U<sub>I</sub></b>	7,5	58,6

Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita son nucleósidos 6-(R o S)-CH<sub>3</sub> BNA, los nucleósidos subrayados y en negrita son nucleósidos 6-(R o S)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> BNA y los subíndices R y S indican la configuración en el átomo de carbono 6. Es notable que los compuestos oligoméricos BNA modificados en la posición 6 muestran una mayor potencia a pesar del ligero descenso en la T<sub>m</sub>.

### 55 Ejemplo 35

#### Oligómeros con espacios 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA y 6-(R)-CH<sub>3</sub>-BNA 2-10-2 dirigidos a PTEN: estudio in vivo

Se inyectaron oligómeros modificados 6-CH<sub>3</sub>-BNA (6-S) o 6-(R)) dirigidos a PTEN a una dosis de 0,5 o 2 µmoles/kg en ratones Balb/c de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) dos veces por semana durante 3 semanas. Los ratones se sacrificaron 48 horas después de la administración final. Los tejidos del hígado se homogeneizaron y se cuantificaron los niveles de ARNm utilizando la PCR en tiempo real como se ha descrito en la presente memoria para la comparación con los niveles de control no tratados (%UTC).

SEQ ID NO./ISIS NO.	Composición (5' a 3')	dosis (µmoles/kg)	%UTC
s o l u c i ó n	s a l i n a	1 0 0	
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	2 , 0 3 1	
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	0 , 5 8 1	
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	2 , 0 2 3	
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	0 , 5 7 3	

Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita son nucleósido 6-CH<sub>3</sub>-BNA y los subíndices R y S indican la configuración en el átomo de carbono 6.

### Ejemplo 36

#### Oligómeros con espacios 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA y 6-(R)-CH<sub>3</sub>-BNA 2-10-2 dirigidos a PTEN: estudio in vivo

Se inyectaron una vez oligómeros modificados 6-CH<sub>3</sub>-BNA (6-(S) o 6-(R)) dirigidos a PTEN a una dosis de 1, 2, 4 o 8 µmoles/kg en ratones Balb/c de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración. Se homogeneizaron los tejidos del hígado y se cuantificaron los niveles de ARNm utilizando la PCR en tiempo real como se ha descrito en la presente memoria para la comparación con los niveles de control no tratados (%UTC).

SEQ ID NO./ISIS NO.	Composición (5' a 3')	dosis (µmoles/kg)	%UTC
s o l u c i ó n	s a l i n a	1 0 0	
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	1 8 9	
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	2 6 6	
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	4 3 5	
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	8	11
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	1 7 5	
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	2 5 1	
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	4 2 5	
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	8 9	

Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita son 6-CH<sub>3</sub>-BNA y los subíndice S y R indican la configuración en el átomo de carbono 6.

### Ejemplo 37

#### Oligómeros con espacios 6-(S)-CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-BNA y 6-(R)-CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-BNA 2-10-2 dirigidos a PTEN: estudio in vivo

Se inyectaron una vez oligómeros modificados 6-CH<sub>3</sub>-BNA (6-(S) o 6-(R)) dirigidos a PTEN a una dosis de 1, 2, 4 o 8 µmoles/kg (solamente se muestran más abajo los datos para 8 µmoles/kg) a ratones Balb/c de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración. Se homogeneizaron los tejidos del hígado y se cuantificaron los niveles de ARNm utilizando la PCR en tiempo real como se ha descrito en la presente memoria para la comparación con los niveles de control no tratados (%UTC).

SEQ ID NO. /ISIS NO.	Composición (5' a 3')	dosis ( $\mu$ moles/kg)	%UTC
5	s o l u c i ó n s a l i n a	1 0 0	
05/396004	<b><u>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></u></b> TAGCACTGGCC <b><u>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></u></b>	8 3 7	
05/396005	<b><u>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></u></b> TAGCACTGGCC <b><u>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></u></b>	8 3 7	

10 Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita y subrayados son nucleósidos 6-CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-BNA y los subíndices S y R indican la configuración en el átomo de carbono 6.

### Ejemplo 38

#### 15 Estabilidad a la nucleasa de los oligómeros modificados 6-(R o S)-CH<sub>3</sub>-BNA tratados con SVPD

La estabilidad a la nucleasa de los oligómeros modificados 6-(R o S)-CH<sub>3</sub>-BNA (392748 y 392749 respectivamente) se determinó utilizando fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD). El estudio incluía los respectivos espaciómeros no sustituidos en la posición 6 (4'-CH<sub>2</sub>-O-2' unido por puentes a BNA, 392745, subíndice 1) y el espaciómero 2'-O-MOE (2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>, 392753, subíndice e) como comparación. Cada oligómero se prepara como una mezcla de 500  $\mu$ L que contiene: 5  $\mu$ L de oligómero 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ L – fosfodiesterasa I @ 0,5 Unidades/mL en tampón SVPD (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 8 mM) concentración final 0,05 Unidades/mL, 445  $\mu$ L de tampón SVP. Las muestras se incubaron a 37°C en un baño de agua. Se tomaron alícuotas (100  $\mu$ L) a los 0, 1, 2 y 4 días con enzima de nueva aportación añadida los días 1 y 2. Se añadió EDTA a las alícuotas inmediatamente después de la separación para extinguir la actividad de la enzima. Las muestras se analizaron en IP HPLC/MS.

SEQ ID NO./ISIS NO.	Composición (5' a 3')	% completo el día 4
30	05/392748	<b><u>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></u></b> TAGCACTGGCC <b><u>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></u></b> >90
	05/392749	<b><u>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></u></b> TAGCACTGGCC <b><u>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></u></b> >70
35	05/392745	<b><u>C<sub>1</sub>U<sub>1</sub></u></b> TAGCACTGGCC <b><u>C<sub>1</sub>U<sub>1</sub></u></b> >40
	05/392753	<b><u>C<sub>e</sub>U<sub>e</sub></u></b> TAGCACTGGCC <b><u>C<sub>e</sub>U<sub>e</sub></u></b> >30

SEQ ID NO./ISIS NO.	% Composición a las 24 horas	% Composición a las 48 horas	% Composición a las 96 horas
40	0 5 / 3 9 2	7 4 8 1 0 0 %	8 9 % 9 2 %
	0 5 / 3 9 2	7 4 9 9 6 %	8 4 % 7 4 %
45	0 5 / 3 9 2	7 4 5 6 7 %	5 6 % 4 8 %
	0 5 / 3 9 2	7 5 3 5 8 %	4 6 % 3 6 %

50 Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita son nucleósidos modificados, los subíndices R y S indican la configuración en el átomo de carbono 6 para los nucleósidos 6-CH<sub>3</sub>-BNA, el subíndice e indica nucleósidos 2'-O-MOE y el subíndice 1 indica nucleósidos modificados 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'. Los compuestos que contienen BNA sustituido en 6-metilo (392748 y 392749) tuvieron una mejora marcada sobre el compuesto que contenía BNA no sustituido (392745).

### 55 Ejemplo 39

#### 60 Estabilidad a la nucleasa de oligómeros modificados 6-(R o S)-CH<sub>3</sub>-BNA, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA y 2'-O-MOE tratados con SVPD

Se determinó la estabilidad a la nucleasa de los oligómeros modificados 6-CH<sub>3</sub>-BNA utilizando fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD). Cada oligómero se preparó como una mezcla de 90  $\mu$ L que contenía 5  $\mu$ L de oligómero (2  $\mu$ L de oligómero 5  $\mu$ M y 3  $\mu$ L de oligómero marcado con P<sup>32</sup> 5'), 75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, y 10  $\mu$ L de 10X tampón (Tris-HCl 500 mM, NaCl 700 mM, y MgCl<sub>2</sub> 140 mM a pH 8,6). A tiempos iguales de 0 min, se separaron 9  $\mu$ L de la muestra de oligómero preparada antes y se añadieron a 10  $\mu$ L de tampón de parada (urea 6,67

M, formamida al 16,67% y EDTA 83,3 mM) seguido de 1 µL de H<sub>2</sub>O y se calentaron a 100°C durante 2,5 a 3 min. La cinética del análisis comenzó por la adición de 9 µL de SVPD (0,5 Unidades/mL). La concentración final de enzima fue 0,05 Unidades/mL. Cada alícuota de 10 µL de solución para la cinética del oligómero fue añadida a 10 µL de tampón de parada y desactivada por calor como se ha descrito antes. Los puntos de tiempo de la cinética se tomaron a los 1, 3, 9, 27, 80, 240 y 1290 min. Las muestras se analizaron mediante una ronda de PAGE acrilamida al 12% durante 2 horas a 45 Watos/gel.

SEQ ID NO./ISIS NO.	Composición (5' a 3')	modificación
06/395421	TTTTTTTTTTT <sub>e</sub> T <sub>e</sub>	Negrita 2'-O-MOE
07/395423	TTTTTTTTTTU <sub>l</sub> U <sub>l</sub>	Negrita 4'-CH <sub>2</sub> -O-2'
07/395424	TTTTTTTTTTU <sub>R</sub> U <sub>R</sub>	Negrita 6-(R)-CH <sub>3</sub>
07/395425	TTTTTTTTTTU <sub>S</sub> U <sub>S</sub>	Negrita 6-(S)-CH
06/7157	TTTTTTT	No modificado (2'-H)

Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita son nucleósidos modificados, los subíndices R y S indican la configuración en el átomo de carbono 6 para los nucleósidos 6-CH<sub>3</sub>-BNA, el subíndice e indica nucleósidos 2'-O-MOE y el subíndice l indica nucleósidos modificados 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'.

SEQ ID NO. ISIS No.	% Comp. a los 3 min.	% Comp. a los 27 min.	% Comp. a los 80 min.	% Comp. a los 240 min.	% Comp. a los 1290 min.
06/395421	68,7	27,9	1 7 , 2 1 1	, 6 9 , 0	
07/395423	32,6	4,7	2 , 5 2 ,	2 2 , 2	
07/395424	96,4	89,1	8 3 , 2 7 9	, 0 7 2 , 0	
07/395425	96,0	86,3	8 3 , 7 8 2	, 3 8 2 , 7	
06/7157	5,2	1,2	2 , 0 1	, 7 0 , 9	,

**Ejemplo 40**

**Oligómeros con espacios 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2-BNA, y 2'-O-MOE dirigidos a PTEN en un estudio de múltiples dosis, de tres semanas, in vivo**

Se inyectaron los oligómeros modificados 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA (2-10-2, oligómeros de 14 unidades), 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-BNA (2-10-2, oligómeros de 14 unidades) y 2'-O-MOE (5-10-5, oligómeros de 20 unidades) dirigidos a PTEN a una dosis de 3,2, 1,0, 0,32 y 0,1 µmoles/kg (solamente se muestran más abajo los datos de 3,2 y 1 µmoles/kg) a ratones Balb/c de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) dos veces por semana durante tres semanas. Los ratones se sacrificaron 48 horas después de la última administración. Los tejidos de hígado se homogeneizaron y se cuantificaron los niveles de ARNm utilizando la PCR en tiempo real como se ha descrito en la presente memoria para la comparación con los niveles de control no tratados (%UTC). La química del plasma y los pesos del hígado se determinaron después del sacrificio.

SEQ ID NO./ISIS NO.	Composición (5' a 3')	dosis	%UTC (µmoles/-kg)	ALT
s o l u c i ó n s a l i n a				
05/392749	<b>C<sub>s</sub>U<sub>s</sub></b> TAGCACTGGCC <sub>s</sub> U <sub>s</sub>	3 , 2	4 , 3 2 9 , 8	
05/392749	<b>C<sub>s</sub>U<sub>s</sub></b> TAGCACTGGCC <sub>s</sub> U <sub>s</sub>	1 3	6 2 4 , 5	
05/392063	<b>C<sub>l</sub>U<sub>l</sub></b> TAGCACTGGCC <sub>l</sub> U <sub>l</sub>	3 , 2	4 , 2 2 7 9 , 3	
08/392063	<sup>Me</sup> <b>C<sub>l</sub>T<sub>l</sub></b> TAGCACTGGC <sup>Me</sup> <b>C<sub>l</sub>T<sub>l</sub></b>	1 2	6 4 1 , 0	
09/116847	<b>C<sub>e</sub>T<sub>e</sub>G<sub>e</sub>C<sub>e</sub>T<sub>e</sub></b> AGCCTCTGGAT <sub>e</sub> T <sub>e</sub> T <sub>e</sub> G <sub>e</sub> A <sub>e</sub>	1 5	3 4 1 , 3	

Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita son posiciones modificadas, el subíndice s indica 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA, el subíndice l indica a 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA, el subíndice e indica 2'-O-MOE y <sup>Me</sup>C

indica un nucleósido de 5'-metilcitosina.

Al culminar el estudio, los animales del grupo al que se había administrado una dosificación elevada mostraron un incremento significativo en los pesos del hígado para los oligómeros que contenían 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA (392063, 3,2 µmoles/Kg grupo de dosificación) (153% con respecto a la solución salina). Por el contrario, los pesos del hígado para los oligómeros que contenían 6-(S)-CH<sub>3</sub> BNA (392749, 3,2 µmoles/Kg grupo de dosificación) fueron un 117% con respecto a la solución salina. Los pesos del hígado para los oligómeros que contenían 2'O-MOE (116847, 1,0 µmoles/Kg grupo de dosificación) fueron de 116% con respecto a la solución salina. Este ejemplo demuestra que la modificación 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA permite el diseño de oligómeros antisentido que mantienen la potencia conferida por el 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA con una mejora espectacular en los niveles de ALT sobre los compuestos modificados 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA.

#### Ejemplo 41

#### 15 Oligómeros con espacios 6-(R o S)-CH<sub>3</sub>, 6-(R o S)-CH<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'BNA 2-10-2 dirigidos a PTEN: estudio in vivo

Se inyectaron una vez los oligómeros con espacios 6-(R o S)-CH<sub>3</sub> modificados (396568 y 396024 respectivamente), 6-(R o S)-CH<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub> (396007 y 396008 respectivamente), 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA 2-10-2 dirigidos a PTEN a una dosis de 2,5, 5, 10 y 20 µmoles/kg (solamente 5 y 10 µmoles/Kg datos no mostrados) en ratones Balb/c de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones se sacrificaron 66 horas después de la administración. Los tejidos de hígado de homogeneizaron.

SEQ ID NO./ISIS NO.	Composición (5' a 3')	dosis (µmoles/kg)	ALT
s o l u c i ó n	s a l i n a	4 1 ,	3
05/396024	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	1 0 2 5 0	5
05/396024	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	5 7 2 ,	0
05/396568	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	1 0 2 3 4	3
05/396568	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	5 6 2 ,	0
05/396008	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	1 0 1 2 9	5
05/396008	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	5 4 9 ,	0
05/396007	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	1 0 4 9 ,	0
05/396007	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> TAGCACTGGCC <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	5 3 6 ,	3
08/392063	<sup>Me</sup> <b>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub></b> TAGCACTGGC <sup>Me</sup> <b>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub></b>	1 0 9 2 5	0
08/392063	<sup>Me</sup> <b>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub></b> TAGCACTGGC <sup>Me</sup> <b>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub></b>	5 3 7 3 ,	0

Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita son nucleósidos modificados, los subíndices R y S indican la configuración en el átomo de carbono 6 para los nucleósidos 6-CH<sub>3</sub>-BNA (solo en negrita) y 6-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>-BNA (en negrita y subrayado) indicados, el subíndice 1 indica nucleósidos 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' y <sup>Me</sup>C indica un nucleósido de 5'-metilcitosina.

Para los oligonucleósidos anteriores, uno (Isis No. 392063) no incluye un nucleósido que es quiral en el átomo de carbono 6, donde los otros cuatro (Isis Nos. 396024, 396568, 396008 y 396007) lo hacen. Específicamente, esos cuatro incluyen uno de tales nucleósidos en las posiciones 1, 2, 13 y 14. El que no lo hace tiene una toxicidad relativamente superior en el hígado en comparación con los cuatro nucleósidos que sí.

#### Ejemplo 42

#### Oligómeros con espacios 2-14-2 dirigidos a PTEN: estudio in vivo

Se inyectaron una vez oligómeros modificados 6-CH<sub>3</sub>-BNA dirigidos a PTEN a una dosis de 2 o 10 µmoles/kg a ratones Balb/c de seis semanas edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración. Se homogeneizaron tejidos de hígado y se cuantificaron los niveles de ARNm utilizando la PCR en tiempo real como se ha descrito en la presente memoria para la comparación con niveles del control no tratado (% UTC).

5

10

SEQ ID NO./ISIS NO.	Composición (5' a 3')	modificación
10/394420	<sup>m</sup> <b>C<sub>e</sub>T<sub>e</sub></b> GCTAGCCTCTGGATT <sub>e</sub> <b>T<sub>e</sub></b>	Negrita 2'-O-MOE
11/400522	<sup>m</sup> <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> GCTAGCCTCTGGATU <sub>R</sub> <b>U<sub>R</sub></b>	Negrita 6-(R)-CH <sub>3</sub>
11/400523	<sup>m</sup> <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> GCTAGCCTCTGGATU <sub>S</sub> <b>U<sub>S</sub></b>	Negrita 6-(S)-CH <sub>3</sub>
11/400524	<sup>m</sup> <b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> GCTAGCCTCTGGATU <sub>R</sub> <b>U<sub>R</sub></b>	Negrita 6-(R)-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>3</sub>
11/400525	<sup>m</sup> <b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> GCTAGCCTCTGGATU <sub>S</sub> <b>U<sub>S</sub></b>	Negrita 6-(S)-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>3</sub>

15

20

25

30

ISIS NO.	dosis (μmoles/kg)	%UTC	Desviación Típica
s o l u c i ó n s a l i n a	1 0	0 %	1 2 %
3 9 4 4 2 0	2 7 9 %	2 %	
3 9 4 4 2 0	1 0 2 6 %	1 1 %	
4 0 0 5 2 2	2 1 8 %	3 %	
4 0 0 5 2 2	1 0 4 %	0 %	
4 0 0 5 2 3	2 1 7 %	2 %	
4 0 0 5 2 3	1 0 4 %	1 %	
4 0 0 5 2 4	2 2 3 %	7 %	
4 0 0 5 2 4	1 0 4 %	0 %	
4 0 0 5 2 5	2 2 1 %	3 %	
4 0 0 5 2 5	1 0 3 %	0 %	

35

Todos los enlaces internucleósido son fosforotioato, los nucleósidos en negrita son nucleósidos modificados, los subíndices R y S indican la configuración en el átomo de carbono 6 para los nucleósidos 6-CH<sub>3</sub>-BNA y 6-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>-BNA indicados, el subíndice c indica nucleósidos 2'-O-MOE y <sup>M<sub>C</sub></sup>C indica un nucleósido de 5'-metilcitosina.

40

Si bien en la memoria anterior esta invención ha sido descrita con relación a algunas de sus realizaciones preferidas, y se han expuesto muchos detalles con fines ilustrativos, será evidente para los expertos en la técnica que la invención es susceptible de realizaciones adicionales y algunos de los detalles descritos en la presente memoria se pueden variar considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

45

50

55

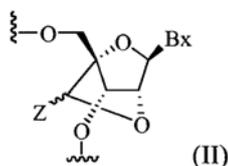
60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto oligomérico que tiene al menos un monómero de fórmula:

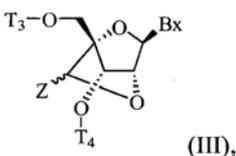
5



10

o de fórmula:

15



20

donde:

25

Bx es un radical alcalino heterocíclico;

T<sub>3</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado conectado o un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

30

T<sub>4</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado conectado o un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

35

donde al menos uno de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> es un grupo conector de internucleósidos anclado a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico; y Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tior o tio sustituido, donde, el término "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero que tiene al menos una región que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico.

40

2. El compuesto oligomérico de la reivindicación 1, que tiene al menos un monómero de fórmula (III) donde Z es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido

45

3. el compuesto oligomérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde cada uno de los grupo sustituidos está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos seleccionados independientemente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> y CN, donde cada uno de J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>.

50

4. El compuesto oligomérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde cada uno de los grupo sustituidos está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos seleccionados independientemente de halógeno, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub> y CN, donde cada uno de J<sub>1</sub>, y J<sub>2</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

55

5. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde cada Z es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido.

60

6. El compuesto oligomérico de la reivindicación 5 donde al menos una Z es metilo.

7. El compuesto oligomérico de la reivindicación 5 donde al menos una Z es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido.

8. El compuesto oligomérico de la reivindicación 7 donde cada uno de los mencionados grupos sustituyentes es alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

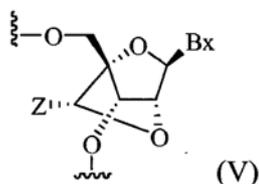
9. El compuesto oligomérico de la reivindicación 7 donde al menos una Z es CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-.

65

10. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde cada Z es metilo o CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-.

11. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 donde al menos un monómero de la mencionada fórmula tiene la configuración representada por la fórmula:

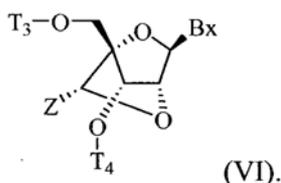
5



10

o la fórmula:

15



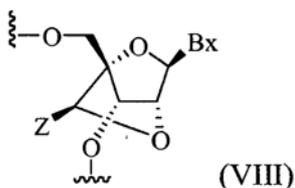
20

12. El compuesto oligomérico de la reivindicación 11 donde cada grupo Z de cada monómero de la mencionada fórmula está en la configuración representada por las fórmulas V o VI.

25

13. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en donde al menos un monómero tiene la configuración representada por la fórmula:

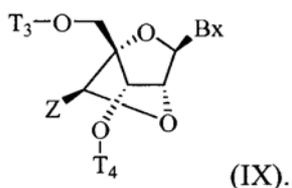
30



35

o la fórmula:

40



45

14. El compuesto oligomérico de la reivindicación 13 donde cada grupo Z de cada monómero de la mencionada fórmula está en la configuración representada por las fórmulas VIII o IX.

50

15. El compuesto oligomérico de la reivindicación 1, que tiene al menos un monómero de fórmula (III) donde Z es metilo.

55

16. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 donde T<sub>3</sub> es un grupo conector de internucleósidos unido a un compuesto oligomérico.

17. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 donde T<sub>4</sub> es un grupo conector de internucleósidos unido a un compuesto oligomérico.

60

18. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 donde al menos uno de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> comprende un grupo conector de internucleósidos seleccionado de fosfodiéster o fosforotioato.

19. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-18 que comprende al menos una región de al menos dos monómeros contiguos de la mencionada fórmula.

65

20. El compuesto oligomérico de la reivindicación 19 que comprende al menos dos regiones de al menos dos

monómeros contiguos de la mencionada fórmula.

- 5      **21.** El compuesto oligomérico de la reivindicación 20 que comprende un compuesto oligomérico interrumpido.
- 5      **22.** El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, que comprende adicionalmente al menos una región de aproximadamente 8 a aproximadamente 14 nucleósidos de  $\beta$ D-2'-deoxirribofuranosilo contiguos.
- 10     **23.** El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, que comprende adicionalmente al menos una región de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 nucleósidos de  $\beta$ D-2'-deoxirribofuranosilo contiguos.
- 15     **24.** El compuesto oligomérico de la reivindicación 19, que comprende una región de 2 a tres monómeros contiguos de la mencionada fórmula, una segunda región opcional de 1 ó 2 monómeros contiguos de la mencionada fórmula y una tercera región de 8 a 14 nucleósidos de  $\beta$ D-2'-deoxirribofuranosilo donde dicha tercera región está localizada entre las mencionadas primera y segunda regiones.
- 20     **25.** El compuesto oligomérico de la reivindicación 24 donde la mencionada tercera región consiste de 8 a 10 nucleósidos de  $\beta$ D-2'-deoxirribofuranosilo.
- 20     **26.** Un método *ex vivo* de inhibir la expresión génica que comprende poner en contacto una o más células o un tejido con un compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.
- 25     **27.** Un compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para su uso en un método terapéutico de inhibir la expresión génica, dicho método comprende poner en contacto un animal con el mencionado compuesto oligomérico.
- 25     **28.** Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, para su uso en terapia médica.
- 30     **29.** El uso de un compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, para la fabricación de un medicamento para inhibir la expresión génica.

35

40

45

50

55

60

65