

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 033**

51 Int. Cl.:

C07D 491/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2004 E 12199177 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2708541**

54 Título: **Derivados de 5,6 dihidroxi isoindol como conectores para la síntesis de oligómeros en fase sólida**

30 Prioridad:

13.11.2003 US 520179 P
16.12.2003 US 530477 P
21.04.2004 US 564649 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2015

73 Titular/es:

ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
2855 Gazelle Court
Carlsbad, CA 92010, US

72 Inventor/es:

VASULINGA, RAVIKUMAR;
ZHIWEI, WANG y
KUMAR, RAJU KRISHNA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

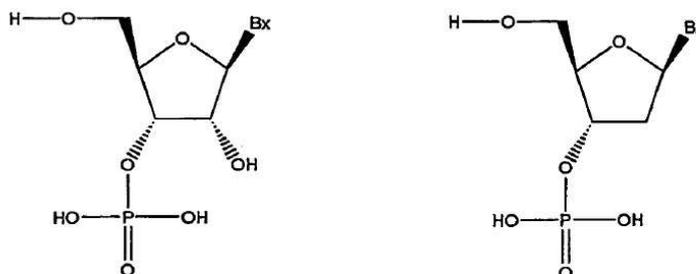
ES 2 535 033 T3

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).

5

Monómeros de nucleótido de origen natural

10



15

20

ribonucleótido

desoxirribonucleótido

25

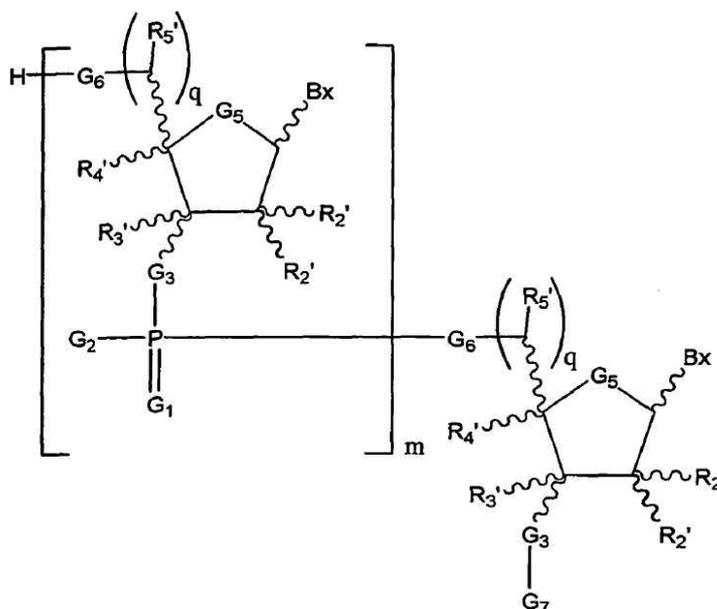
en los que cada Bx es una base nitrogenada, en los que el último resto es un nucleósido (es decir, un nucleótido sin el grupo fosfato 3').

30

Como se ha mencionado anteriormente, se han realizado a los oligonucleótidos diversas modificaciones químicas, con el fin de mejorar su afinidad, estabilidad, PK, Tox, y otras propiedades. En general, el término oligonucleótido, tal como se utiliza actualmente en la técnica, abarca, entre otros, los compuestos de fórmula:

Oligonucleótidos (General)

35



40

45

50

55

60

65

en la que m es un número entero de 1 a aproximadamente 100, cada uno de G₁ es O o S, cada G₂ es OH o SH, cada G₃ es O, S, CH₂ o NH, cada G₅ es un resto divalente tal como O, S, CH₂, CFH, CF₂-CH=H-, etc., cada R₂' es H, OH, O-rg, en la que rg es un grupo protector eliminable, un sustituyente 2', o junto con R⁴ⁱ forma un puente, cada R₃' es H, un sustituyente, o junto con R₄' forma un puente, cada R₄' es H, un sustituyente, junto con R₂' forma un puente, junto con R₃' forma un puente, o junto con R₅' forma un puente, cada q es 0 ó 1, cada uno de R₅' es H, un sustituyente, o junto con R₄' forma un puente, cada G₆ es O, S, CH₂ o NH, y cada G₇ es H, PO₃H₂, o un grupo conjugado, y cada Bx es una base nitrogenada, tal como se describe en el presente documento (es decir, natural o modificada).

Los métodos convencionales de síntesis de oligonucleótidos incluyen los métodos en fase sólida descritos por primera vez por Caruthers *et al.* (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.750.666, que se incorpora en el presente documento por referencia, especialmente las columnas 3-58, en las que se describen los materiales de partida y los métodos generales de preparación de oligonucleótidos, y especialmente los oligonucleótidos de fosforotioato, cuyas partes se incorporan específicamente en el presente documento por referencia). Estos métodos fueron mejorados más tarde por Köster *et al.* (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° RE 34.069, que se incorpora en el presente documento por referencia, especialmente las columnas, en las que se describen, cuyas partes se incorporan específicamente en el presente documento por referencia). Estos métodos han sido mejorados adicionalmente por varios inventores, como se analiza con más detalle más adelante. Los métodos de síntesis de ARN se describen, entre otros, en las patentes de EE.UU. N°s 6.111.086, 6.008.400, y 5.889.136, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad. Resultan especialmente pertinentes las columnas 7-20 del documento EE.UU. 6.008.400, que se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.

El proceso general de fabricación de un oligonucleótido por el método de Köster *et al.* puede describirse de la siguiente manera:

En primer lugar, se prepara un cebador de síntesis por unión covalente de un nucleósido adecuado a un medio de soporte sólido (SS) a través de un conector. Un cebador de síntesis de este tipo es el siguiente:

20

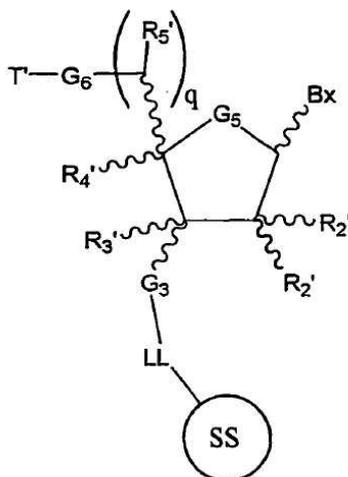
Soporte de síntesis (General)

25

30

35

40



45

50

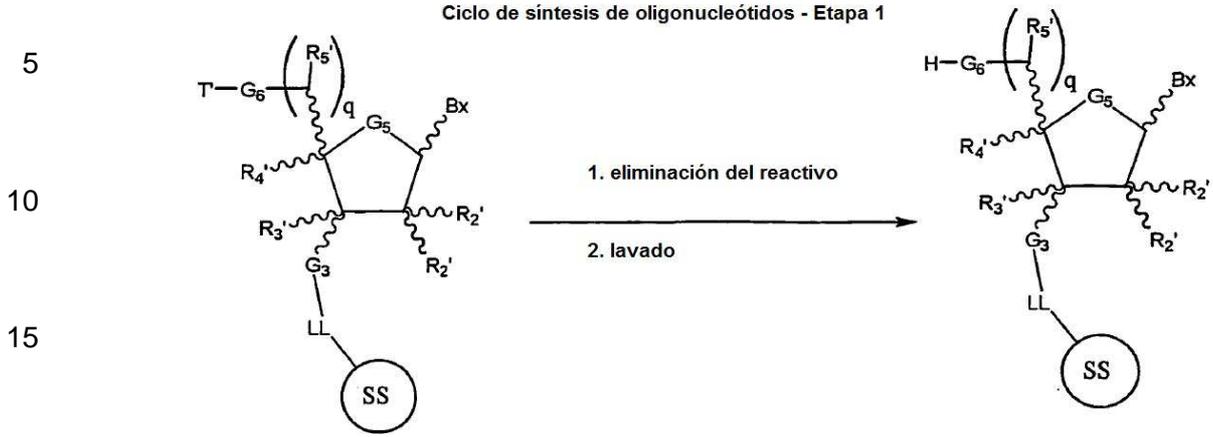
55

60

65

en el que SS es el medio de soporte sólido, LL es un grupo de unión que une el nucleósido al medio de soporte sólido por medio de G₃. El grupo de unión es generalmente un grupo bifuncional, que covalentemente une el nucleósido 3' terminal (y por lo tanto el oligonucleótido naciente) al medio de soporte sólido durante la síntesis, pero que se escinde en condiciones ortogonales a las condiciones en las que se elimina el grupo protector 5', y si procede, cualquier grupo protector 2'. T' es un grupo protector eliminable, y las restantes variables ya han sido definidas, y se describen con más detalle en el presente documento. Los cebadores de síntesis adecuados pueden adquirirse en Amersham Biosciences con el nombre comercial Primer Support 200™. A continuación, el medio de soporte que tiene el cebador de síntesis unido al mismo puede hincharse en un disolvente adecuado, por ejemplo acetonitrilo, e introducirse en una columna de un instrumento de síntesis en fase sólida adecuado, tal como uno de los sintetizadores disponibles en Amersham Biosciences, tal como un sintetizador de ADN/ARN de la marca AKTA OligoPilot™ u OligoProcess™.

La síntesis se lleva a cabo del extremo 3' al 5' del oligómero. En cada ciclo, se llevan a cabo las siguientes etapas: (1) eliminación de T', (2) acoplamiento, (3) oxidación, (4) protección terminal. Cada una de las etapas (1)-(4) puede ir, y generalmente va, seguida de una o más etapas de lavado, de manera que se introduce en la columna un disolvente limpio para lavar los materiales solubles de la columna, empujar los reactivos y/o activadores a través la columna, o ambos. Las etapas (1)-(4) están representadas a continuación:

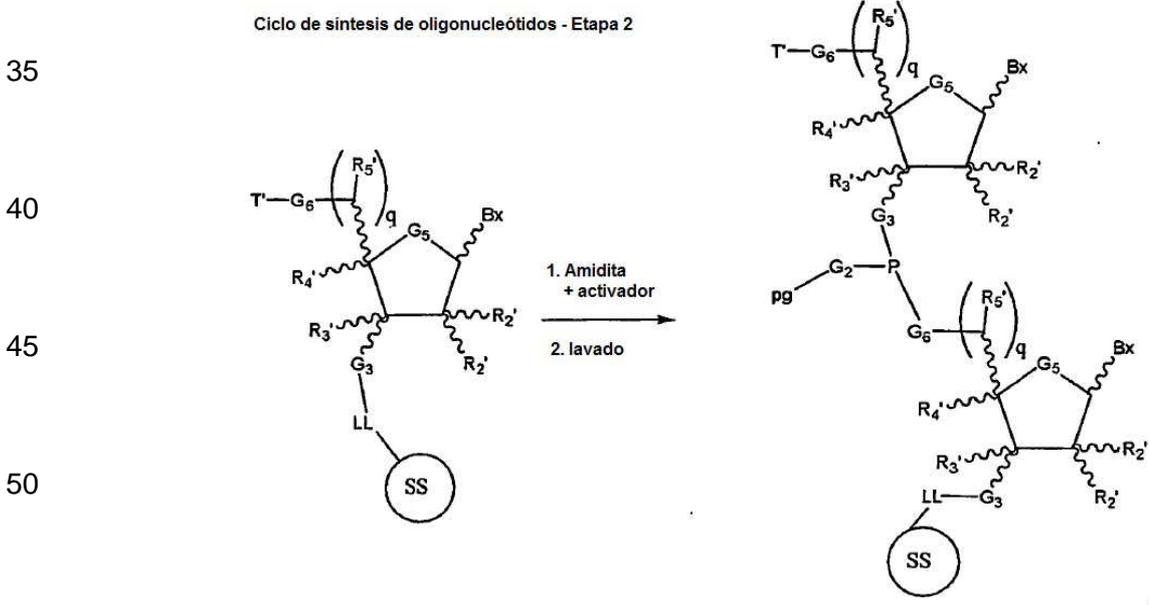


25

En general, T' se selecciona para ser eliminable en condiciones ortogonales a las utilizadas para escindir el oligonucleótido del medio de soporte sólido al final de la síntesis, así como las utilizadas para eliminar otros grupos protectores utilizados durante la síntesis. Un grupo protector para la síntesis de oligonucleótidos reconocido en la técnica es DMT (4,4'-dimetoxitritilo). El grupo DMT resulta especialmente útil ya que es eliminable en condiciones débilmente ácidas. Por lo tanto, un reactivo de eliminación aceptable es DCA al 3% en un disolvente adecuado, tal como acetonitrilo. El disolvente de lavado, si se utiliza, puede ser convenientemente acetonitrilo.

30

El medio de soporte sólido puede ser un medio de soporte de perlas poliméricas o vidrio poroso controlado. Algunos soportes poliméricos se describen en las siguientes patentes: US 6.016.895, US 6.043.353, US 5.391.667 y 6.300.486, cada una de las cuales se incorpora específicamente en el presente documento por referencia.



60

65

en la que pg es un grupo protector de fósforo, tal como un grupo cianoetilo. Para obtener información sobre la fabricación de la amidita véase, Köster *et al.*, *supra*:

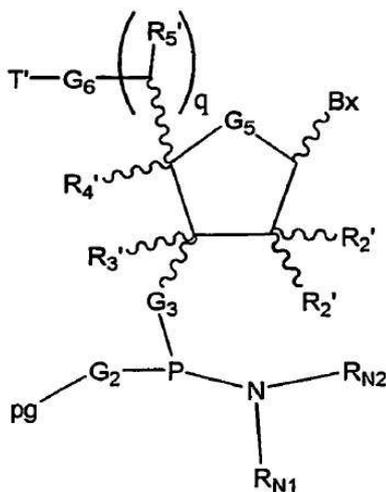
Amidita (General)

5

10

15

20



25

30

en la que $NR_{N1}R_{N2}$ es un grupo saliente amina, tal como diisopropilamino, y para la descripción de un activador adecuado (por ejemplo, tetrazol). Otros métodos de fabricación de amiditas y amiditas adecuadas, se exponen en las siguientes patentes: US 6.133.438, US 5.646.265, US 6.124.450, US 5.847.106, US 6.001.982, US 5.705.621, US 5.955.600, US 6.160.152, US 6.335.439, US 6.274.725, US 6.329.519, cada una de las cuales se incorpora específicamente en el presente documento por referencia, especialmente en lo que se refiere a la fabricación de amiditas. Los activadores adecuados se exponen en la patente de Caruther *et. al.* y en la patente de Köster *et. al.* En las siguientes patentes se exponen activadores especialmente adecuados: US 6.031.092 y US 6.476.216, cada una de las cuales se incorpora expresamente en el presente documento por referencia.

35

La siguiente etapa del ciclo de síntesis es la oxidación, lo que indica que la especie P(III) se oxida a un estado de oxidación P(V) con un oxidante adecuado:

Ciclo de síntesis de oligonucleótidos - Etapa 3

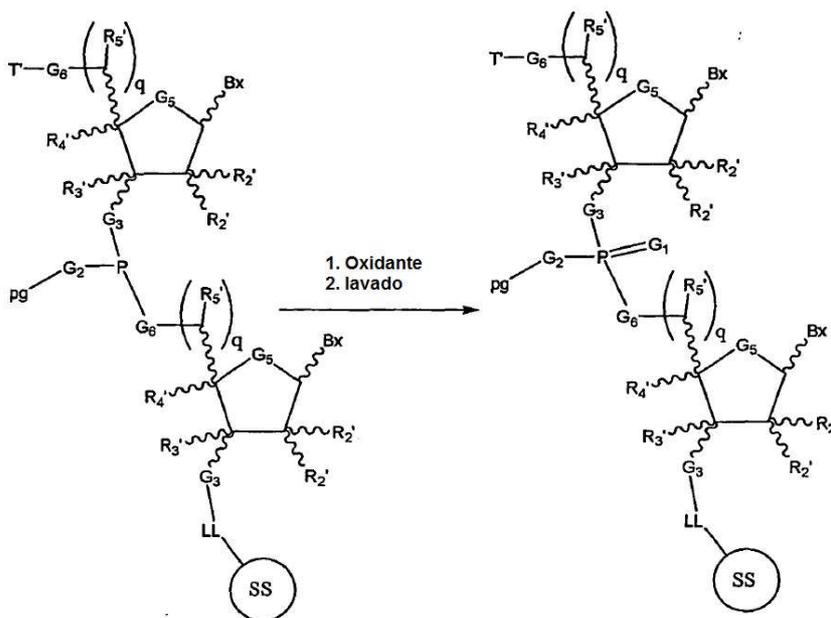
40

45

50

55

60



en la que G_1 es O o S.

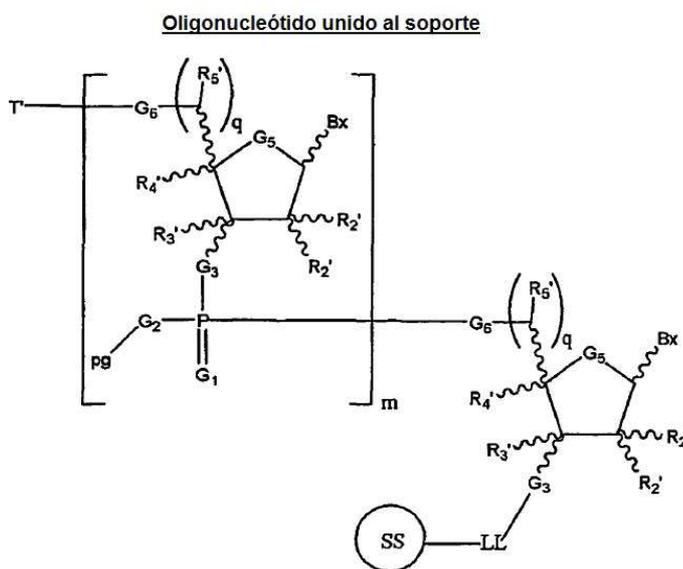
65

El oxidante es un agente oxidante adecuado para introducir G_1 . En el caso en el que G_1 es oxígeno, se expone un oxidante adecuado en la patente de Caruthers *et. al.*, anteriormente indicada. En los casos en los que G_2 es azufre,

el oxidante también puede denominarse agente de tianción o reactivo de transferencia de azufre. Los agentes de tianción adecuados incluyen el denominado reactivo de Beaucage, 3H-1,2-benzotiol, bisulfuro de fenilacetilo (también denominado PADS; véanse por ejemplo las patentes: US 6.114.519 y 6.242.591, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia) y bisulfuros de tiuram (por ejemplo, bisulfuro de N,N,N',N'-tetrametiltiuram, descrito en la patente de EE.UU. N° 5.166.387). El lavado puede ser un disolvente adecuado, tal como acetonitrilo.

La etapa de oxidación va seguida de una etapa de protección terminal, que aunque no se ilustra en el presente documento, es una etapa importante para la síntesis, ya que hace que los grupos 5'-OH libres, que no han experimentado acoplamiento en la etapa 1, queden bloqueados y no se acoplen en posteriores ciclos de síntesis. Se exponen reactivos de protección terminal adecuados en Caruthers *et al.*, Köster *et al.*, y en otras patentes que se describen en el presente documento. Los reactivos de protección terminal adecuados incluyen una combinación de anhídrido acético y N-metilimidazol.

Las etapas (1)-(4) del ciclo de síntesis se repiten (si así se desea) n-1 veces para producir un oligonucleótido unido al soporte sólido:



en la que cada una de las variables es como se define en el presente documento.

En general, el grupo protector pg puede eliminarse mediante un método como el descrito por Caruthers *et al.* o Köster *et al.*, *supra*. Cuando pg es un grupo cianoetilo, resulta generalmente adecuada la metodología de Köster *et al.*, por ejemplo, la reacción con una solución básica, para eliminar el grupo protector de fósforo. En algunos casos resulta deseable evitar la formación de aductos tales como el grupo N1-cianoetil timidina. En estos casos, resulta deseable incluir en el reactivo una amina terciaria, tal como trietilamina (TEA) como se describe en la patente de EE.UU. N° US 6.465.628, que se incorpora expresamente en el presente documento por referencia. En general, cuando las bases nitrogenadas están protegidas, se desprotegen en condiciones básicas. El oligonucleótido desprotegido se escinden del medio de soporte sólido para dar el siguiente oligonucleótido protegido en 5':

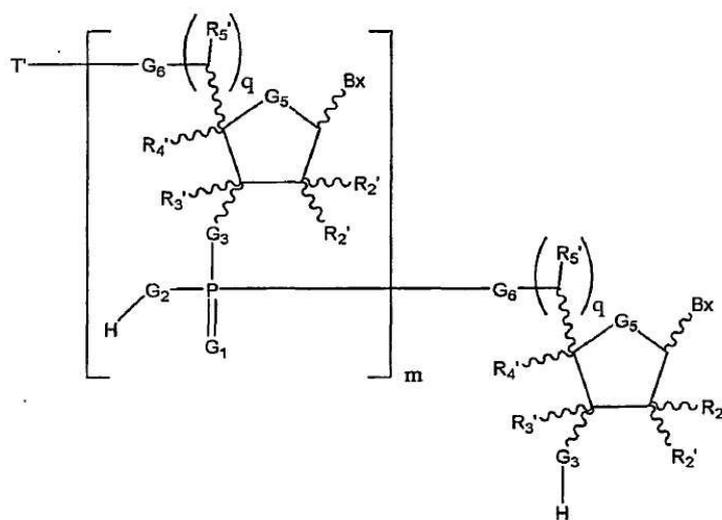
Oligonucleótido protegido en 5' libre

5

10

15

20



25

que a continuación puede purificarse por cromatografía líquida de fase inversa, desprotegerse en el extremo 5' en ácido acético, desalarse, liofilizarse o secarse de otro modo, y almacenarse en una atmósfera inerte hasta que se necesite. Opcionalmente, puede derivatizarse el grupo G₃H con un grupo conjugado. El oligonucleótido resultante puede visualizarse como que tiene la fórmula:

30

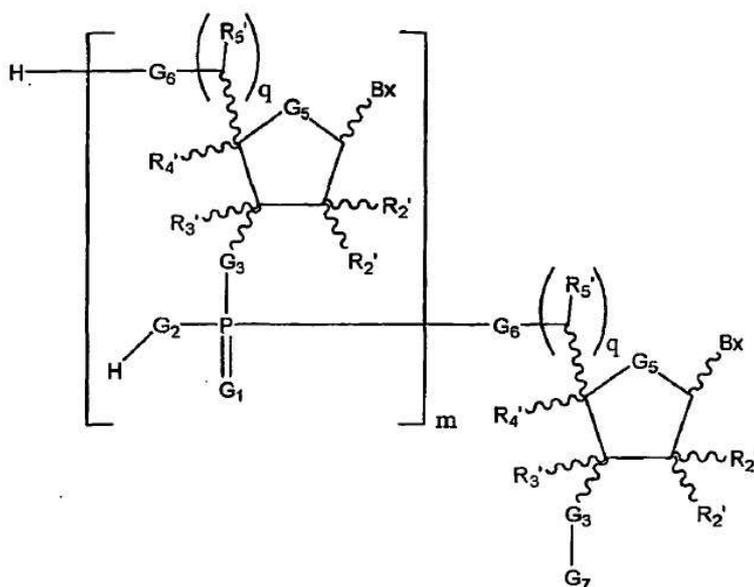
Oligonucleótido

35

40

45

50



55

Aunque se han realizado muchas mejoras en la calidad y los costes de la síntesis de oligonucleótidos, aún queda por hacer una serie de mejoras. Por ejemplo, en la síntesis de oligonucleótidos a menudo aparecen impurezas. Aunque las cantidades de estas impurezas son generalmente pequeñas, resulta deseable, cuando sea posible, eliminar incluso las trazas de impurezas, especialmente cuando los oligonucleótidos están destinados al uso farmacéutico, incluyendo los ensayos farmacológicos y el uso terapéutico.

60

Los métodos convencionales de preparación de soportes de síntesis sólidos unidos a succinilo requieren procesos relativamente complejos que están protegidos como conocimiento patentado por los proveedores de soportes sintéticos. La logística de pedidos y suministro determina que los soportes de síntesis deben solicitarse generalmente meses antes del momento en el que van a utilizarse, y pueden permanecer sin utilizarse durante días, semanas o incluso meses después de haberse sintetizado pero antes de utilizarse. Se ha descubierto que

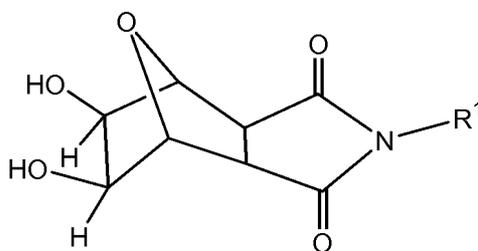
65

determinados soportes de síntesis puede degradarse al estar en reposo durante períodos de tiempo, por ejemplo, por la pérdida de los grupos protectores de las bases nitrogenadas protegidas. Se ha demostrado que la pérdida de estos grupos protectores puede dar lugar a especies de alto peso molecular, por ejemplo, "branchmers", que se producen cuando un componente básico de oligonucleótido se acopla a un OH o NH₂ exocíclico de una base nitrogenada, dando lugar de ese modo a una especie ramificada que a su vez puede prolongarse. Por ejemplo, se ha demostrado que el grupo protector benzoilo convencional para la 5-metil-2'-O-metoxietil citosina (5-MeMOEC) se pierde relativamente rápido del 5-MeMOEC unido al medio de soporte sólido, proporcionando de ese modo un nitrógeno primario exocíclico como posible punto de ramificación durante la síntesis siguiente.

Por lo tanto existe la necesidad de un soporte de síntesis adecuado para la síntesis de oligómeros que pueda utilizarse junto con diversos medios de soporte. Existe además la necesidad de un soporte de síntesis que pueda prepararse sin recurrir a métodos complejos o patentados para su síntesis. Ventajosamente, un soporte de síntesis de este tipo sería susceptible de acoplamiento a un medio de soporte *in situ* o bajo demanda, y/o que no estaría sujeto a degradación, tal como la pérdida de los grupos protectores del grupo funcional exocíclico, antes y/o durante la síntesis. También resultaría deseable que un soporte de síntesis de este tipo estuviera fácilmente disponible de fuentes comerciales.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe compuestos de fórmula:



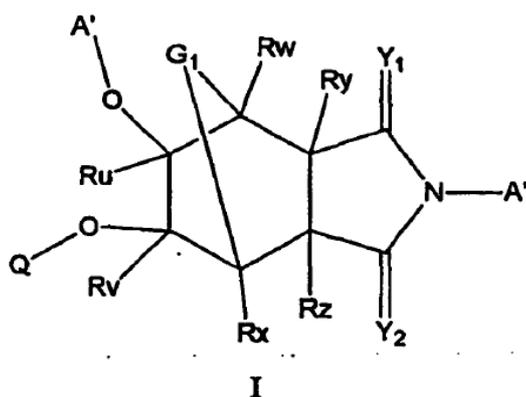
en la que R¹ es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo no saturado, heteroarilo o acilo, el que R¹ está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes.

Los compuestos de la presente invención proporcionan una fácil unión de restos químicos nacientes, tal como nucleósidos, nucleótidos, otros oligómeros y productos químicos combinatorios, a un medio de soporte tal como un soporte sólido o parcialmente soluble. Por lo tanto no es necesario tener una especie diferente de resto de unión para las nucleósido amiditas comúnmente utilizadas, tales como dA amidita protegida, dG amidita protegida, T amidita, dC amidita protegida, etc. 5-metil dC amidita protegida, 2'-O-metoxietil A amidita protegida, 2'-O-metoxietil G amidita protegida, 2'-O-metoxietil T amidita protegida, 2'-O-metoxietil C amidita protegida, 2'-O-metoxietil 5-metil C amidita protegida, 5-propinil dC amidita protegida, 5-propinil dU amidita protegida, (en las que, en cada caso, "protegida" se refiere a la protección de la amina exocíclica con, por ejemplo, isobutirilo, benzoílo), etc.

Otros aspectos y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto para el experto en la materia tras la consideración de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En la presente se divulgan compuestos de Fórmula I:



5 en la que uno de entre A' y A'' es H o un grupo bloqueante, o uno de A' o A'' es SM o L-SM, en la que SM es un medio de soporte, y L es un resto de unión, el otro de entre A' y A'' es H o un grupo bloqueante; cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo o alquinilo sustituido; Y₁ e Y₂ son cada uno independientemente del otro O, S, NR₁ CH₂ o CR₁R₁, en la que R₁ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo o alquinilo sustituido; G₁ es O, S o NR', en la que R' es H o un grupo bloqueante; T es H, un grupo lábil, un resto nucleosídilo, un resto nucleosídilo protegido, un resto nucleosídilo unido a través de un conector de fósforo (por ejemplo un resto triéster de fosfitidilo, fosfodiéster, diéster de fosforotioato o fosfotriéster), un oligonucleotidilo protegido o un resto oligonucleotidilo.

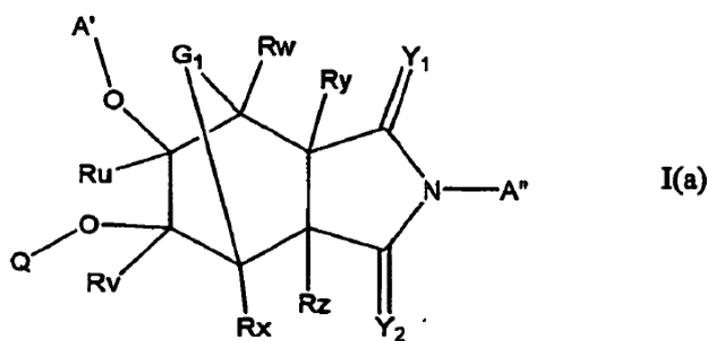
10 En algunas formas de realización preferentes, los compuestos de Fórmula I son conectores unidos a soporte de Fórmula I(a):

15

20

25

30



35

40

45

50

55

60

65

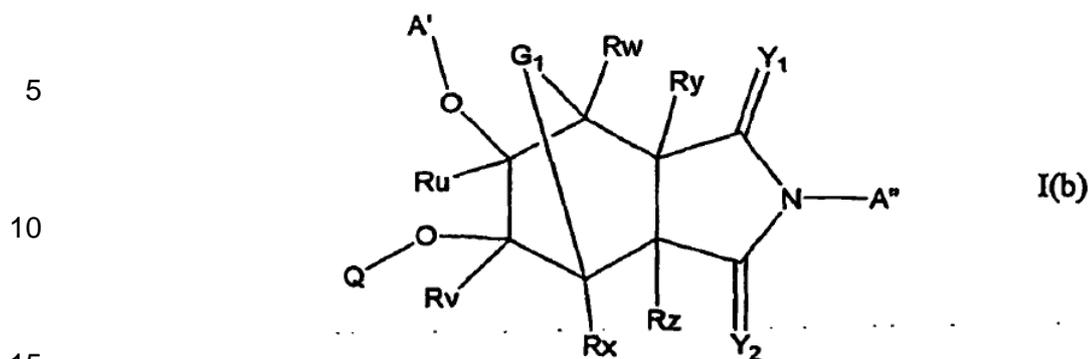
en la que uno de entre A' y A'' es SM o L-SM, en la que SM es un medio de soporte, y es L un resto de unión, el otro de entre A' y A'' es H o un grupo bloqueante; cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo o alquinilo sustituido; Y₁ e Y₂ son cada uno independientemente del otro O, S, NR₁ CH₂ o CR₁R₁, en la que R₁ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo o alquinilo sustituido; G₁ es O, S o NR', en la que R' es H o un grupo bloqueante; T es H, un grupo lábil, un resto nucleosídilo, un resto nucleosídilo protegido, un resto nucleosídilo unido a través de un conector de fósforo (por ejemplo un resto triéster de fosfitidilo, fosfodiéster, diéster de fosforotioato o fosfotriéster), un oligonucleotidilo protegido o un resto oligonucleotidilo.

En algunas formas de realización preferentes de Fórmula I(a), A' es SM o L-SM, en la que L y SM se han definido anteriormente, y A'' es bg, en la que bg es un grupo bloqueante como se describe con más detalle en el presente documento. En las formas de realización especialmente preferentes, A' es L-SM.

En otras formas de realización preferentes de Fórmula I(a), A' es bg y A'' es SM o L-SM, en la que bg, SM y L-SM se han definido anteriormente.

En algunas formas de realización preferentes de Fórmula I(a), T' es un grupo lábil en medio ácido. En las formas de realización especialmente preferentes de Fórmula I(a), T es un grupo lábil en medio ácido seleccionado de entre grupos trifenilmetilo opcionalmente sustituidos o pixilo opcionalmente sustituidos. En tales compuestos, los sustituyentes opcionales son los grupos arilo de los grupos trifenilmetilo o pixilo respectivos. Los grupos lábiles especialmente preferentes incluyen MMT (4-metoxitrifenilmetilo), DMT (4,4'-dimetoxitrifenilmetilo), pixilo (9-fenilxantenilo), o pixilo sustituido (9-fenilxantenilo con uno o más sustituyentes en los anillos arilo del resto xantenilo; los sustituyentes adecuados son halógeno, alquilo C₁-C₁₂, preferentemente alquilo C₁-C₄ y C₁-C₁₂, preferentemente alcoxi C₁-C₄). La selección del grupo lábil apropiado es posible basándose, entre otros, en la estabilidad del medio de soporte (SM) y el grupo de unión (L) al ácido. En general, el trifenilmetilo (tritilo) y sus derivados (DMT y MMT se denominan comúnmente "grupos tritilo") requerirán un pH más bajo para su eliminación que el 9-fenilxantenilo y las variantes sustituidas de 9-fenilxantenilo (denominados en el presente documento "grupos pixilo"). El experto en la materia debe elegir el grupo lábil que se elimine casi completamente en condiciones que sean compatibles con el medio de soporte y el conector, teniendo en cuenta otros factores tales como el coste relativo del grupo lábil, el coste de los reactivos de eliminación, la disponibilidad y desechabilidad de los reactivos y disolventes, etc. En general, se favorecen los grupos pixilo por su mayor labilidad en ácidos de pKa relativamente alta, tales como el ácido acético, mientras que se favorecen los grupos tritilo por su abundancia relativa en la economía, pero generalmente requieren ácidos de pKa menor, tales como ácidos acéticos clorados (por ejemplo, ácido dicloroacético (DCA)), que se favorecen menos debido a cuestiones ecológicas, para su eliminación.

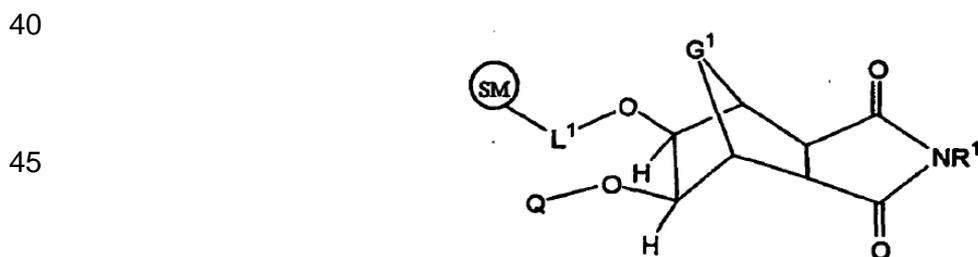
- 5 Cuando T es un grupo lábil, por ejemplo un grupo lábil en medio ácido, puede eliminarse para producir formas de realización en las que T es H. Como tales formas de realización se producen generalmente en el proceso de fabricación de un oligonucleótido, que es un uso preferente para los compuestos de Fórmula I(a), también resultan preferentes tales formas de realización en las que T es H.
- 10 Cuando T es H, puede hacerse reaccionar el grupo OH libre formado por T y el O al que está fijado con una especie capaz de unir un resto nucleosídico opcionalmente protegido al O. Tales especies incluirán amiditas, H-fosfonatos y fosfotriésteres, especialmente amiditas y H-fosfonatos.
- 15 En algunas formas de realización preferentes, G_1 es O, S o NH o N-bg, en la que bg es como se ha definido anteriormente.
- 20 En algunas formas de realización preferentes, G_1 es O, S o N-bg. En formas de realización preferentes concretas, G_1 es O o S, siendo O especialmente preferente. En otras formas de realización preferentes concretas, G_1 es N-bg, en la que bg es un grupo no lábil o un grupo lábil en medio básico. Los grupos no lábiles específicos que pueden mencionarse en este contexto son alquilo C_1 - C_{12} (preferentemente alquilo C_1 - C_4), alquilo C_1 - C_{12} (preferentemente C_1 - C_4) sustituido, fenilo, naftilo, antraceno, norbornilo, cicloalquilo C_3 - C_{12} (preferentemente C_5 - C_8), y fenilo sustituido, naftilo, antraceno, norbornilo, cicloalquilo C_3 - C_{12} (preferentemente C_5 - C_8). Los sustituyentes adecuados en los grupos alquilo, fenilo, naftilo, antraceno, norbornilo y cicloalquilo son F, Cl, Br, I, NO_2 , dialquilamino, alcoxi, alquiltio, etc. Los sustituyentes adecuados adicionales en los grupos fenilo, naftilo, antraceno, norbornilo y cicloalquilo incluyen al menos un grupo alquilo C_1 - C_4 .
- 25 En algunas formas de realización divulgadas en la presente, Y_1 e Y_2 son independientemente O, S, CH_2 o $C(\text{alquilo})_2$, en la que el alquilo es alquilo C_1 - C_{12} , preferentemente alquilo C_1 - C_4 . En las formas de realización especialmente preferentes, Y_1 e Y_2 son independientemente O, S, $C(CH_3)_2$, $CH(CH_3)$ o CH_2 .
- 30 Se divulgan en la presente compuesto en los que G_1 es O, Y_1 es O e Y_2 es O.
Se divulgan en la presente compuesto en los que G_1 es S, Y_1 es O e Y_2 es O.
Se divulgan en la presente compuesto en los que G_1 es O, Y_1 es S e Y_2 es S.
Se divulgan en la presente compuesto en los que, G_1 es S, Y_1 es S e Y_2 es S.
- 35 En algunas formas de realización preferentes, cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz está seleccionado independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C_1 - C_{12} , preferentemente alquilo C_1 - C_4 .
- 40 En algunas formas de realización preferentes, al menos uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es un sustituyente. En otras formas de realización preferentes, al menos un par de variables, Ru y Rv, Rx y Rw, o Ry y Rz, es un sustituyente. En las formas de realización especialmente preferentes, al menos un par de variables, Ru y Rv, Rx y Rw, o Ry y Rz, es un sustituyente seleccionado de entre alquilo C_1 - C_{12} , incluso más preferentemente alquilo C_1 - C_4 . En otras formas de realización preferentes, cada uno o Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H.
- 45 En algunas formas de realización preferentes, G_1 , Y_1 e Y_2 son cada uno O, y cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son cada uno independientemente H o alquilo C_1 - C_4 . En las formas de realización especialmente preferentes, G_1 , Y_1 e Y_2 son cada uno O y Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son cada uno H o metilo. En las formas de realización ejemplares, G_1 , Y_1 e Y_2 son cada uno O y Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz, son cada uno H.
- 50 Un medio de soporte adecuado puede ser cualquier medio que facilite la separación del compuesto de Fórmula I(a) y los derivados del mismo como se describe en detalle en el presente documento, a partir de una solución que comprende reactivo, reaccionante o disolvente de lavado. En algunos casos, el medio de soporte será un medio de soporte en fase sólida, tal como una perla polimérica o un vidrio de poro controlado. En otros casos, el medio de soporte será un soporte parcialmente soluble, que permita que el compuesto de Fórmula I(a) y los derivados de la misma sean solubles en una solución que tenga una polaridad característica determinada, pero insolubles en una solución que tenga una polaridad característica diferente. Los soportes parcialmente solubles adecuados incluyen soportes de polímero de polietilenglicol, que son generalmente solubles en soluciones orgánicas menos polares, pero que pueden hacerse insolubles tras la adición de un disolvente más polar, tal como un alcohol (por ejemplo metanol o etanol). Otros soportes semisólidos adecuados incluyen soportes de quitosano, que son de forma similar relativamente solubles en soluciones menos polares. El experto en la materia debe reconocer que es necesario elegir polímeros de mayor peso molecular (ya sea polietilenglicol (PEG), quitosano o algún otro soporte parcialmente soluble) para solubilizar no sólo los compuestos de Fórmula I(a), sino también los derivados de la misma.
- 55 En algunas formas de realización, se proporcionan composiciones de Fórmula I(b):
- 60
- 65



20 en la que uno de entre A' y A'' es SM o L-SM, en la que SM es un medio de soporte, y L es un resto de unión, el otro de entre A' y A'' es H o un grupo bloqueante; cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo o alquinilo sustituido; Y₁ e Y₂ son cada uno independientemente uno del otro O, S, NR₁ CH₂ o CR₁R₁, en la que R₁ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo o alquinilo sustituido; G₁ es O, S o NR', en la que R' es H o un grupo bloqueante; T es H, un grupo lábil, un resto nucleosidilo, un resto nucleosidilo protegido, un resto nucleosidilo unido a través de un conector de fósforo (por ejemplo un resto triéster de fosfitidilo, fosfodiéster, diéster de fosforotioato o fosfotriéster), un oligonucleotidilo protegido o un resto oligonucleotidilo.

30 Algunas formas de realización descritas en el presente documento del compuesto de Fórmula I(b) son aquellas en las que cada uno de A' y A'' es H. Tales compuestos resultan útiles como productos intermedios en la fabricación de conectores unidos a soporte de Fórmula I(a). Otras formas de realización descritas en el presente documento del compuesto de Fórmula I(b) son aquellas en las que uno de A' es H y A'' es un grupo bloqueante, como se ha descrito anteriormente. Tales compuestos resultan útiles como productos intermedios en la fabricación de conectores unidos a soporte de Fórmula I(a). Otras formas de realización descritas en el presente documento del compuesto de Fórmula I(b) son aquellas en las que A' es un grupo bloqueante, como se ha descrito anteriormente, y A'' es H. Tales compuestos resultan útiles como productos intermedios en la fabricación de conectores unidos a soporte de Fórmula I(a).

35 En algunas formas de realización, se proporcionan soportes de fórmula:



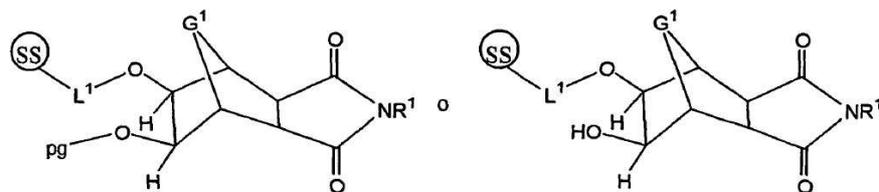
50 en la que SM es un medio de soporte, por ejemplo, un medio de soporte sólido o parcialmente soluble, L¹ es un resto de unión, G¹ es O, S, NR², en la que R² es distinto de H; Q es H o pg, en la que pg es un grupo protector, y R¹ es un grupo bloqueante.

55 En formas de realización concretas, SM es un soporte sólido, G¹ es O, y R¹ es un grupo alquilo, arilo, acilo, aralquilo, arilacilo, cicloalquilo (que puede estar parcialmente deshidrogenado), heteroarilo o heteroarilacilo opcionalmente sustituido adicionalmente. En algunas formas de realización preferentes, R¹ es un grupo arilo, tal como fenilo, naftilo, o antraceno opcionalmente sustituido adicionalmente. En algunas formas de realización preferentes, R¹ es heteroarilo opcionalmente sustituido, tal como piridilo (por ejemplo, pirid-2-ilo, pirid-3-ilo, pirid-4-ilo, o variantes de los mismos sustituidas adicionalmente), pirimidilo (por ejemplo, pirimid-2-ilo, pirimid-4-ilo, pirimid-5-ilo, o variantes de los mismos sustituidas adicionalmente), tiofenilo (por ejemplo, tiofen-2-ilo, tiofen-3-ilo, o variantes de los mismos sustituidas adicionalmente), furanilo (furan-2-ilo, furan-3-ilo, o variantes de los mismos sustituidas adicionalmente), quinolinilo (por ejemplo, quinolin-2-ilo, quinolin-3-ilo, quinolin-4-ilo, quinolin-6-ilo, quinolin-7-ilo, o variantes de los mismos sustituidas adicionalmente). En algunas formas de realización preferentes, R¹ es alquilo opcionalmente sustituido, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, i-butilo, n-pentanilo, isooctanilo o dodecanilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes. En algunas formas

de realización preferentes, R^1 es acilo opcionalmente sustituido adicionalmente, preferentemente acilo C_1-C_{12} , y más preferentemente acilo C_1-C_8 , tal como formilo, acetilo, propanoilo, butanoilo, octanoilo, etc.

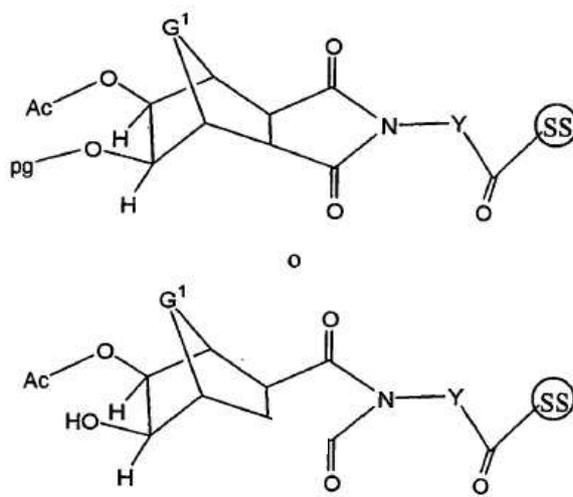
5 Los sustituyentes adicionales para los grupos definidos anteriormente para R^1 , cuando R^1 es alquilo, acilo, arilo o heteroarilo, incluyen F, Cl, Br, I, O-(alquilo C_1-C_{12}) (por ejemplo, O-metilo, O-etilo y O-isopropilo), O-(acilo C_1-C_{12}), NO_2 , arilo o heteroarilo. Cuando R^1 es arilo o heteroarilo, los sustituyentes de R^1 incluyen adicionalmente grupos alquilo y/o acilo.

10 En algunas formas de realización de la invención, se proporcionan soportes de síntesis de fórmula:



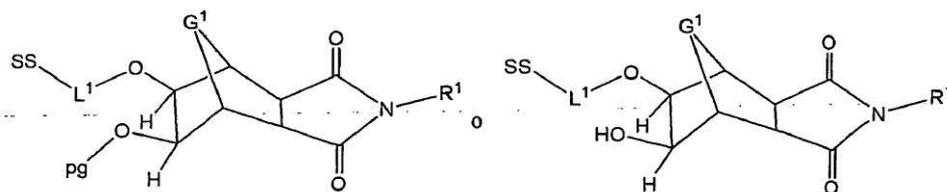
20 en las que SS es un medio de soporte sólido, L^1 es un conector, G^1 es O, S o NR^2 , R^2 es un sustituyente distinto de H, pg es un grupo protector y R^1 es un sustituyente distinto de H.

25 En algunas formas de realización de la invención, se proporcionan soportes de síntesis de fórmula:



50 en las que SS es un medio de soporte sólido, Y es un grupo divalente, G^1 es O, S o NR^2 , R^2 es un sustituyente distinto de H, y Ac y pg son grupos protectores ortogonales entre sí.

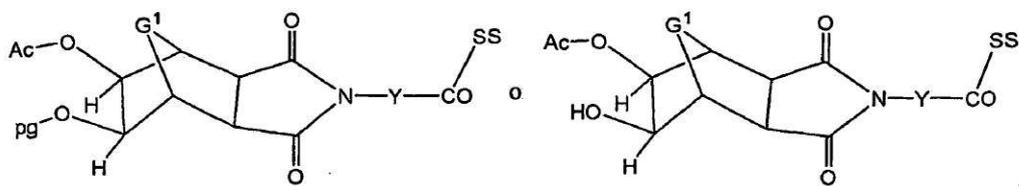
55 En algunas formas de realización, se proporcionan compuestos de fórmula:



65 en las que SS es un medio de soporte sólido, L^1 es un conector divalente que une el soporte sólido a O, pg es un grupo protector, G^1 es O, S, NR^2 , R^2 es un sustituyente distinto de H, y R^1 es un sustituyente distinto de H.

En otras formas de realización, se proporcionan compuestos de fórmula:

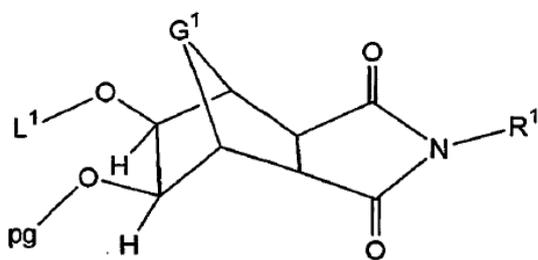
5



10 en las que SS es un medio de soporte sólido, Y es un grupo divalente, G¹ es O, S, NR², R² es un sustituyente distinto de H, Ac es un grupo bloqueante acetilo y pg es un grupo protector. En algunas formas de realización de la invención, el grupo bloqueante acetilo Ac y el grupo protector pg son ortogonales entre sí. En algunas formas de realización, Ac es lábil en medio básico y pg es lábil en medio ácido.

15 En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

20

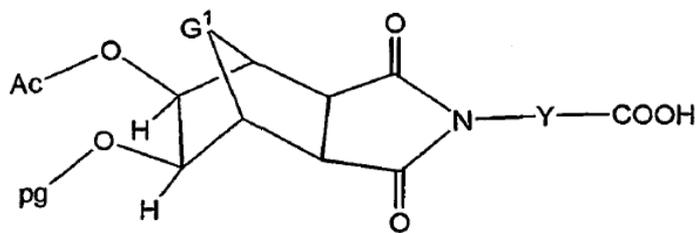


25

30 en la que las variables se definen en el presente documento, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

35



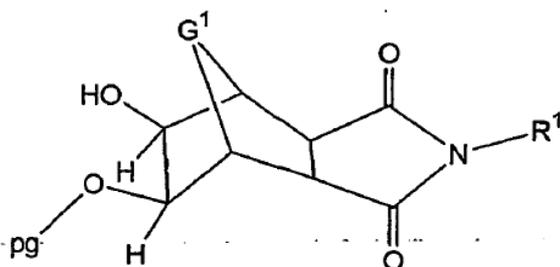
40

45

en la que las variables se definen en el presente documento, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

50



55

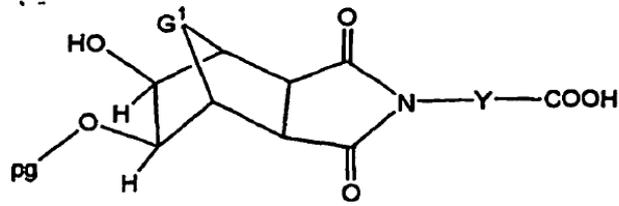
60

65 en la que las variables se definen en el presente documento, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

5

10



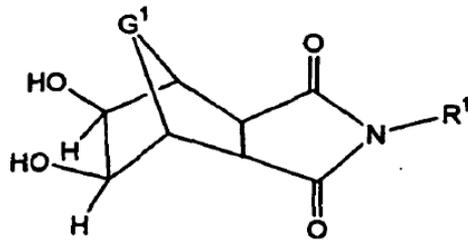
en la que las variables se definen en el presente documento, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente.

15

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

20

25



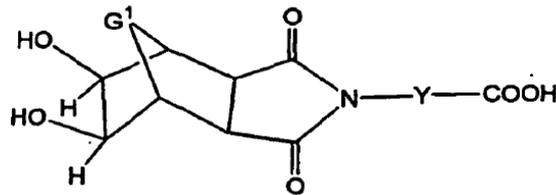
en la que las variables se definen en el presente documento, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente.

30

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

35

40



en la que las variables se definen en el presente documento, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente.

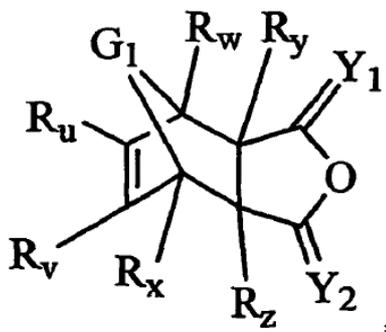
45

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

50

55

60



en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente, cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo, Y₁ es O, S, CH₂, o CR_yR_y, en la que cada uno de R_{y1} y R_{y1} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido, Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{y2}R₂, en la que cada uno de R_{y2} y R_{y2} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido.

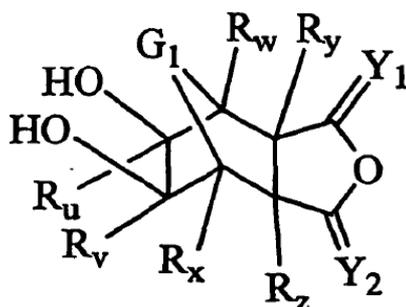
65

En formas de realización adicionales de la presente divulgación se encuentran compuestos de fórmula

5

10

15



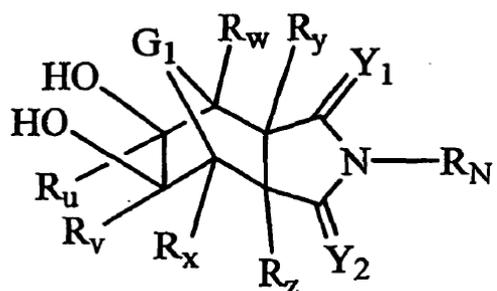
20 en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente, cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo, Y₁ es O, S, CH₂, o CR_yR_{y'}, en la que cada uno de R_{y1'} y R_{y1''} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido, Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{y2'}R_{y2''}, en la que cada uno de R_{y2'} y R_{y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido.

25 En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

25

30

35



40 en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente; cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y₁ es O, S, CH₂, o CR_yR_{y'}, en la que cada uno de R_{y1'} y R_{y1''} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{y2'}R_{y2''}, en la que cada uno de R_{y2'} y R_{y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; y R_N es H o un sustituyente.

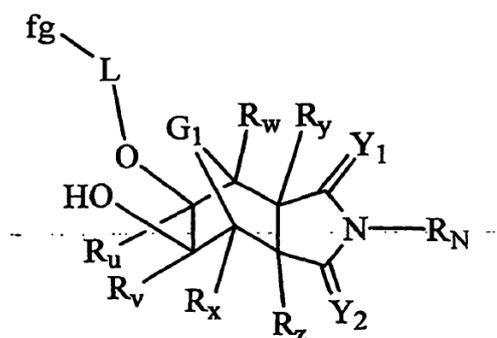
45 En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

45

50

55

60



65 en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente; cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y₁ es O, S, CH₂, o CR_yR_{y'}, en la que cada uno de R_{y1'} y R_{y1''} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{y2'}R_{y2''}, en la que cada uno de R_{y2'} y R_{y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido.

y R_{y2^*} es alquilo C_1-C_{12} opcionalmente sustituido; R_N es H o un sustituyente; y L es un grupo de unión y fg es un grupo funcional.

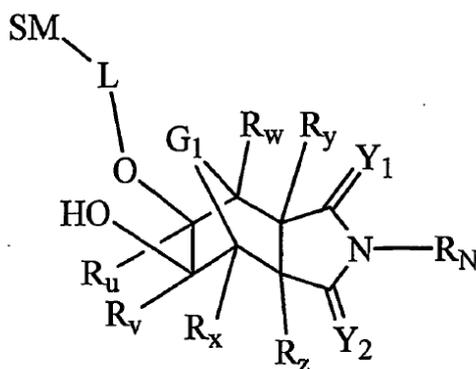
En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

5

10

15

20



en la que G^1 es O, S o NR^1 , R^1 es H o un sustituyente; cada uno de R_u , R_v , R_w , R_x , R_y y R_z es independientemente H, alquilo C_1-C_{12} , arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y_1 es O, S, CH_2 , o $CR_yR_{y^*}$, en la que cada uno de R_{y1^*} y R_{y1^*} es independientemente alquilo C_1-C_{12} opcionalmente sustituido; Y_2 es O, S, CH_2 , o $CR_{y2^*}R_{2^*}$, en la que cada uno de R_{y2^*} y R_{y2^*} es alquilo C_1-C_{12} opcionalmente sustituido; R_N es H o un sustituyente; L es un grupo de unión y fg es un grupo funcional; y SM es un medio de soporte.

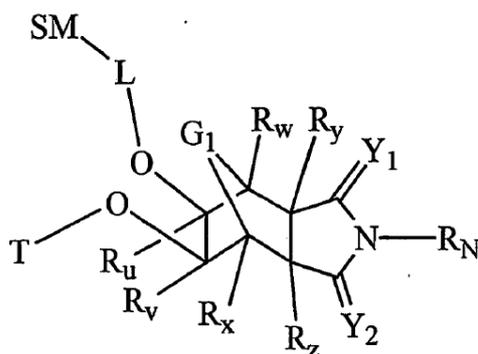
25

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

30

35

40



en la que G^1 es O, S o NR^1 , R^1 es H o un sustituyente; cada uno de R_u , R_v , R_w , R_x , R_y y R_z es independientemente H, alquilo C_1-C_{12} , arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y_1 es O, S, CH_2 , o $CR_yR_{y^*}$, en la que cada uno de R_{y1^*} y R_{y1^*} es independientemente alquilo C_1-C_{12} opcionalmente sustituido; Y_2 es O, S, CH_2 , o $CR_{y2^*}R_{2^*}$, en la que cada uno de R_{y2^*} y R_{y2^*} es alquilo C_1-C_{12} opcionalmente sustituido; R_N es H o un sustituyente; L es un grupo de unión y fg es un grupo funcional; T es un grupo protector lábil; SM es un medio de soporte.

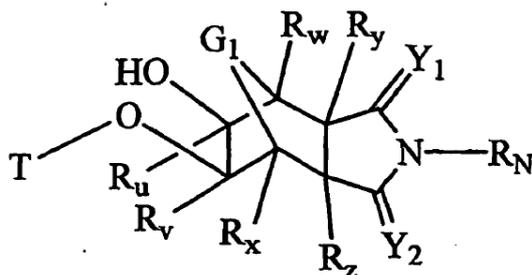
45

50

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

55

60

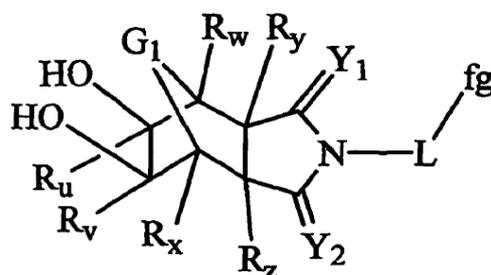


65

en la que G^1 es O, S o NR^1 , R^1 es H o un sustituyente; cada uno de R_u , R_v , R_w , R_x , R_y y R_z es independientemente H, alquilo C_1-C_{12} , arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y_1 es O, S, CH_2 , o $CR_yR_{y^*}$, en la que cada uno de R_{y1^*} y R_{y1^*} es

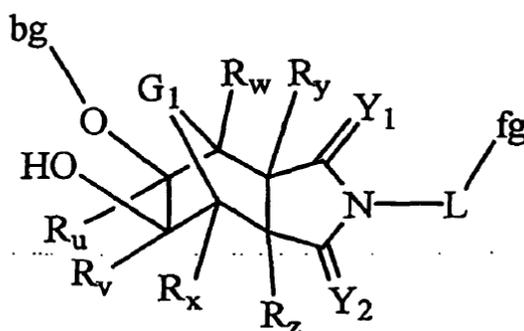
independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{Y2'}R_{2''}, en la que cada uno de R_{Y2'} y R_{Y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; R_N es H o un sustituyente; y T es un grupo protector lábil.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:



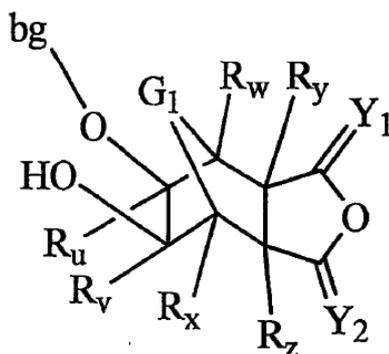
en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente; cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y₁ es O, S, CH₂, o CR_{Y1'}R_{Y1''}, en la que cada uno de R_{Y1'} y R_{Y1''} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{Y2'}R_{2''}, en la que cada uno de R_{Y2'} y R_{Y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; R_N es H o un sustituyente; L es un grupo de unión; y fg es un grupo funcional.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:



en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente; cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y₁ es O, S, CH₂, o CR_{Y1'}R_{Y1''}, en la que cada uno de R_{Y1'} y R_{Y1''} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{Y2'}R_{2''}, en la que cada uno de R_{Y2'} y R_{Y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; R_N es H o un sustituyente; L es un grupo de unión; fg es un grupo funcional; y bg es un grupo bloqueante.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:



en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente; cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y₁ es O, S, CH₂, o CR_{Y1'}R_{Y1''}, en la que cada uno de R_{Y1'} y R_{Y1''} es

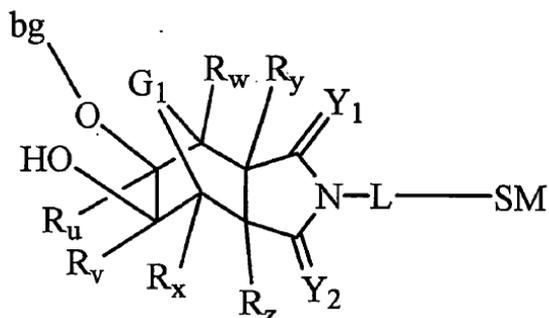
independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{Y2}R_{2'}, en la que cada uno de R_{Y2}' y R_{Y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

5

10

15



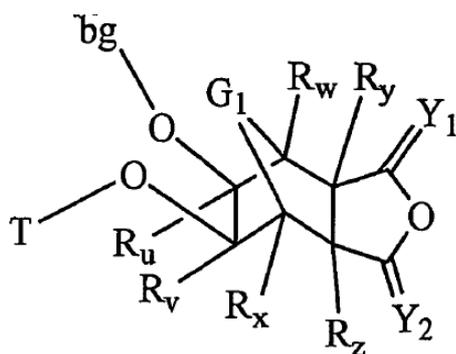
en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente; cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y₁ es O, S, CH₂, o CR_{Y1}R_{Y1'}, en la que cada uno de R_{Y1}' y R_{Y1''} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{Y2}R_{2'}, en la que cada uno de R_{Y2}' y R_{Y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; L es un grupo de unión; fg es un grupo funcional; bg es un grupo bloqueante; y SM es un medio de soporte.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

30

35

40



en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente; cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y₁ es O, S, CH₂, o CR_{Y1}R_{Y1'}, en la que cada uno de R_{Y1}' y R_{Y1''} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{Y2}R_{2'}, en la que cada uno de R_{Y2}' y R_{Y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; y bg es un grupo bloqueante y T es un grupo protector lábil.

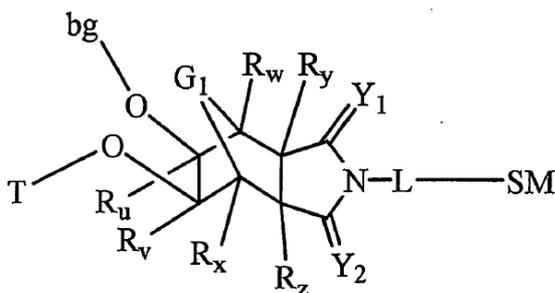
En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

50

55

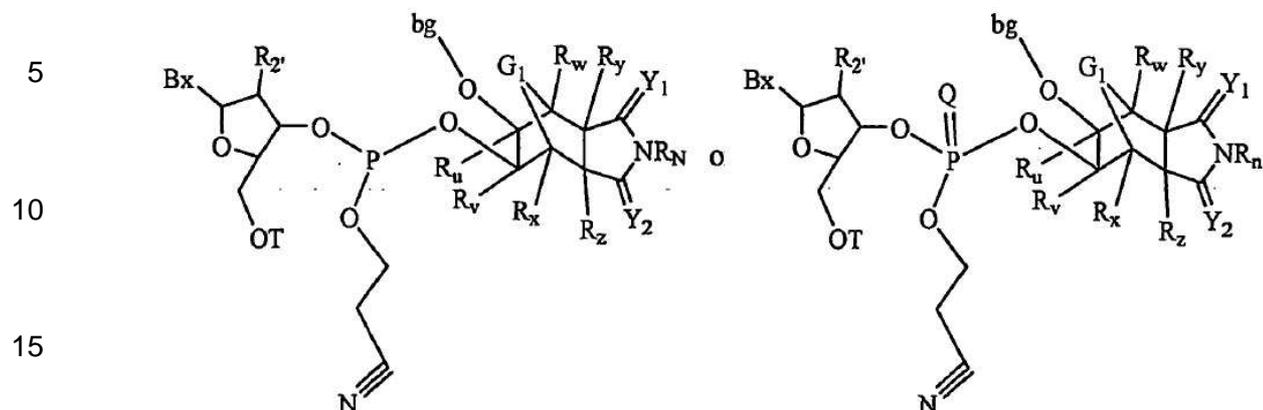
60

65



en la que G¹ es O, S o NR¹, R¹ es H o un sustituyente; cada uno de R_u, R_v, R_w, R_x, R_y y R_z es independientemente H, alquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y₁ es O, S, CH₂, o CR_{Y1}R_{Y1'}, en la que cada uno de R_{Y1}' y R_{Y1''} es independientemente alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; Y₂ es O, S, CH₂, o CR_{Y2}R_{2'}, en la que cada uno de R_{Y2}' y R_{Y2''} es alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; R_N es H o un sustituyente; L es un grupo de unión y fg es un grupo funcional; bg es un grupo bloqueante; SM es un medio de soporte; T es un grupo protector lábil.

En la presente se divulgan compuestos de la fórmula:

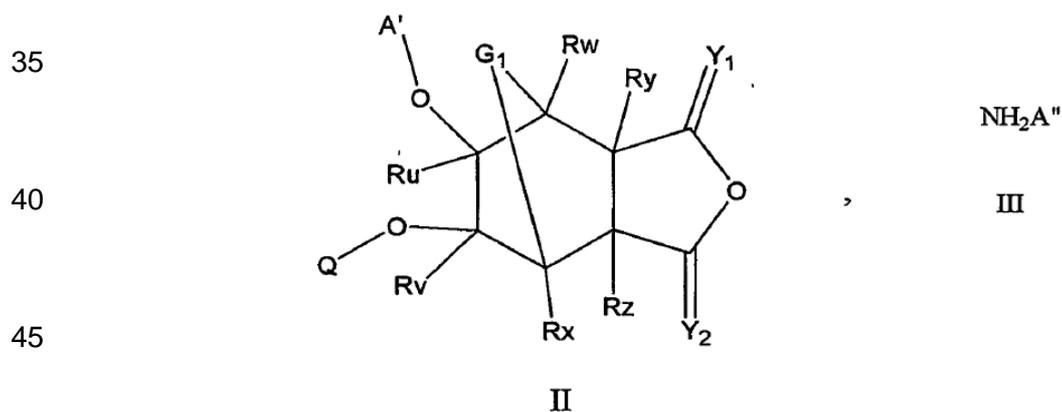


20 en las que G^1 es O, S o NR^1 , R^1 es H o un sustituyente; cada uno de R_u , R_v , R_w , R_x , R_y y R_z es independientemente H, alquilo C_1 - C_{12} , arilo, heteroalquilo, arilalquilo; Y_1 es O, S, CH_2 , o $CR_yR_{y'}$, en las que cada uno de $R_{y1'}$ y $R_{y1''}$ es independientemente alquilo C_1 - C_{12} opcionalmente sustituido; Y_2 es O, S, CH_2 , o $CR_{y2}R_{2'}$, en las que cada uno de $R_{y2'}$ y $R_{y2''}$ es alquilo C_1 - C_{12} opcionalmente sustituido; R_n es H o un sustituyente; L es un grupo de unión y fg es un grupo funcional; SM es un medio de soporte; Bx es una base nitrogenada que está opcionalmente sustituida; T es un grupo protector lábil; y Q es O o S.

25

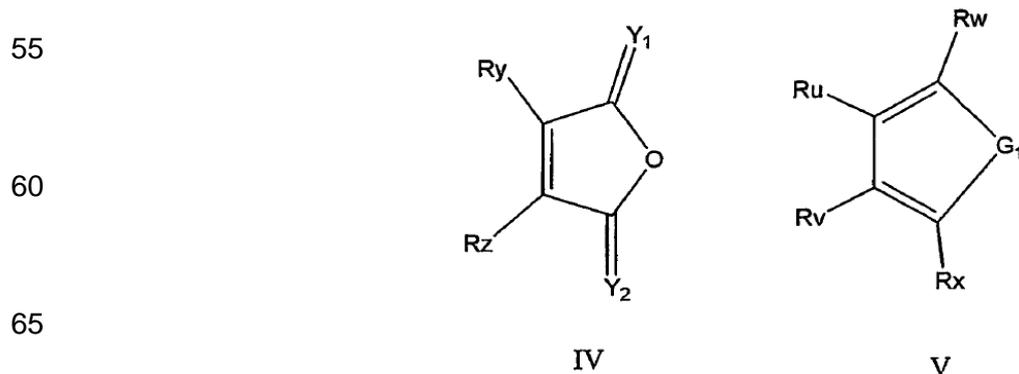
PROCESOS DE PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

30 Los compuestos de Fórmula (I) pueden fabricarse por reacción de un compuesto de Fórmula II con un compuesto de Fórmula III:



50 en las que cada una de las variables ha sido descrita anteriormente.

Los compuestos de Fórmula II pueden sintetizarse por reacción de Diels-Alder a partir de dienófilo IV y dieno V:

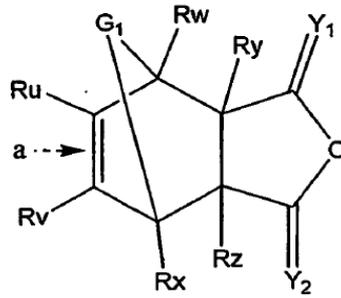


que juntos forman el producto intermedio A:

5

10

15



A

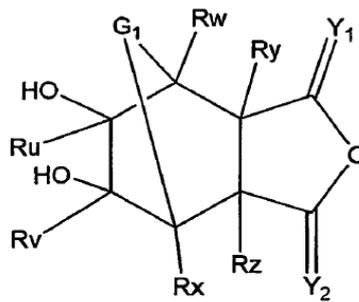
20

La adición de grupos hidroxilo a través del doble enlace a da como resultado el producto intermedio B:

25

30

35



B

40

que puede derivatizarse para formar un compuesto de Fórmula II, anteriormente indicada.

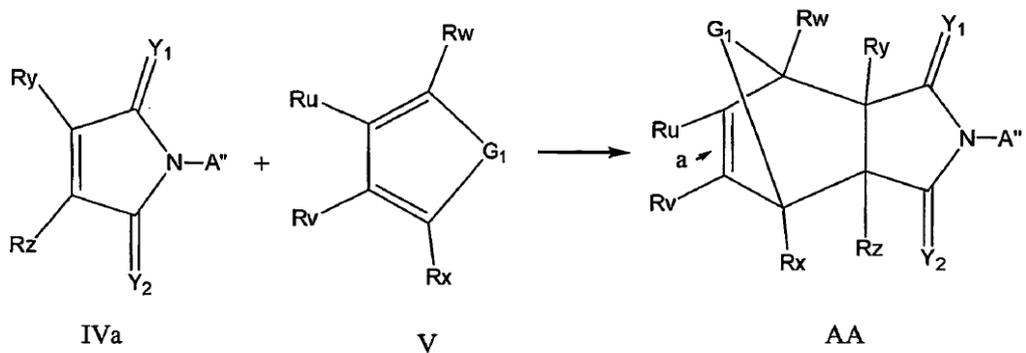
En otras formas de realización, los compuestos de Fórmula I pueden fabricarse por medio de la siguiente ruta:

Se hace reaccionar un dienófilo IV con un dieno V para formar un producto intermedio AA:

45

50

55



IVa

V

AA

60

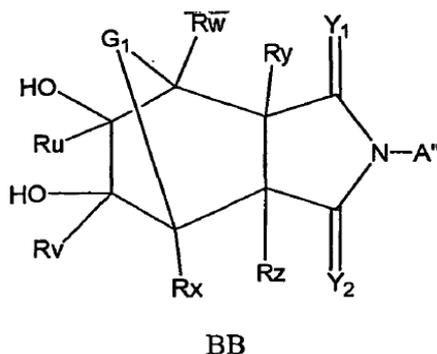
Pueden añadirse grupos hidroxilo a través del doble enlace a, para formar el producto intermedio BB:

65

5

10

15



que a continuación puede derivatizarse para formar el compuesto de Fórmula I, como se ha descrito anteriormente.

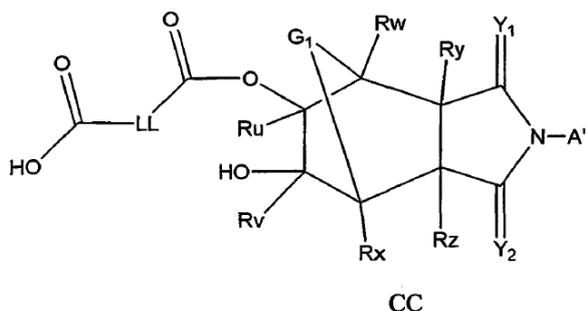
20

En algunas formas de realización de BB, AA'' es H. Tales formas de realización pueden derivatizarse por reacción de BB con diácido, cloruro de diácido, anhídrido de diácido, etc., para producir un compuesto de fórmula:

25

30

35



40

45

50

55

en la que LL es un grupo divalente tal como alquileo, cicloalquileo, arileno, heterociclilo, heteroarileno, y las demás variables son como se ha descrito anteriormente. Los grupos LL alquileo ejemplares incluyen alquileo C₁-C₁₂ (por ejemplo, preferentemente metileno, etileno (por ejemplo, etil-1,2-eno), propileno (por ejemplo, propil-1,2-eno, propil-1,3-eno), butileno, (por ejemplo, butil-1,4-eno, 2-metil-propil-1,3-eno), pentileno, hexileno, heptileno, octileno, decileno, dodecileno), etc. Los grupos cicloalquileo ejemplares incluyen grupos cicloalquileo C₃-C₁₂, tal como ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentanilo-1,3-eno, ciclohexil-1,4-eno, etc. Los grupos LL arileno ejemplares incluyen grupos arileno monocíclicos o bicíclicos que tienen de 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono, por ejemplo fenil-1,2-eno, naftil-1,6-eno, naftil-2,7-eno, antraceno, etc. Los grupos heterociclilo ejemplares dentro del alcance de la invención incluyen grupos arilo monocíclico o bicíclico que tienen de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 átomos de carbono y de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 heteroátomos, tales como N, O y S, en los que los restos cíclicos pueden estar parcialmente deshidrogenados. Determinados grupos heteroarilo que pueden mencionarse como dentro del alcance de la invención incluyen: pirrolidinilo, piperidinilo (por ejemplo, 2,5-piperidinilo, 3,5-piperidinilo), piperazinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, tetrahydroquinazolinilo, tetrahydroquinoxalinilo, etc. Los grupos heteroarileno ejemplares incluyen grupos arilo monocíclicos o bicíclicos que tiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 átomos de carbono y de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 heteroátomos, tales como N, O y S. Determinados grupos heteroarilo que pueden mencionarse como dentro del alcance de la invención incluyen: piridileno (por ejemplo, piridil-2,5-eno, piridil-3,5-eno), pirimidinilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, etc.

60

65

Los reactivos adecuados para introducir el grupo HOCO-LL-CO anteriormente indicado incluyen diácidos (HO₂C-LL-CO₂H). Los diácidos especialmente adecuados incluyen ácido malónico (LL es metileno), ácido succínico (LL es el 1,2-etileno), ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, y ácido ftálico. Otros reactivos adecuados para introducir el HOCO-LL-CO anteriormente indicado incluyen anhídridos de diácido. Los anhídridos de diácido especialmente adecuados incluyen anhídrido malónico, anhídrido succínico, anhídrido glutárico, anhídrido adípico, anhídrido pimélico, y anhídrido ftálico. Otros reactivos adecuados para introducir el HOCO-LL-CO incluyen ésteres de diácido, haluros de diácido, etc. Un reactivo especialmente preferente para introducir el HOCO-LL-CO es anhídrido succínico.

El compuesto de fórmula puede unirse a un soporte por medio del ácido carboxílico terminal del grupo HOCO-LL-CO, por medio de un grupo reactivo en el medio de soporte. En algunas formas de realización, el ácido carboxílico terminal forma un enlace amida con un reactivo de amina en la superficie del soporte. En otras formas de realización, el ácido carboxílico terminal forma un éster con un grupo OH en el medio de soporte. En algunas formas de realización, el ácido carboxílico terminal puede sustituirse con un terminal de haluro de ácido, éster de ácido, anhídrido de ácido, etc. Los haluros de ácido específicos incluyen yoduros, bromuros y cloruros carboxílicos. Los ésteres específicos incluyen metilo, etilo, y otros ésteres de alquilo C₁-C₁₀. Los anhídridos específicos incluyen formilo, acetilo, propanoilo, y otros ésteres de alcanóilo C₁-C₁₀ del grupo ácido carboxílico terminal del compuesto de fórmula CC.

En formas de realización concretas de Fórmula I, Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son independientemente H o alquilo C₁-C₄; Y₁ e Y₂ son independientemente uno del otro, O o S; G₁ es O, S, N-alquilo (en la que el alquilo es alquilo C₁-C₁₀), N-arilo (en la que el arilo es arilo C₆-C₁₄) o N-cicloalquilo (en la que el cicloalquilo es monocicloalquilo o bicicloalquilo C₃-C₁₂); y A" es H, alquilo C₁-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂, monocicloarilo, bicicloarilo o tricicloarilo C₆-C₁₄.

En los compuestos especialmente preferentes de Fórmula I, Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son independientemente H o metilo; Y₁ e Y₂ son ambos O; G₁ es O, S, N-metilo, N-etilo, N-n-propilo, N-isopropilo, N-n-butilo, N-isobutilo, N-s-butilo o N-t-butilo, N-fenilo, N-ciclopentilo, N-ciclohexilo o N-cicloheptilo; y A" es H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₅-C₁₀, o fenilo.

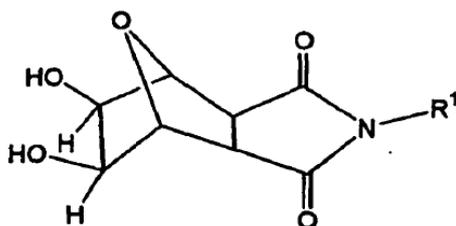
En los compuestos especialmente preferentes de Fórmula I, Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son independientemente H o metilo, siendo al menos uno metilo; Y₁ e Y₂ son ambos O; G₁ es O, S, N-metilo, N-etilo, N-n-propilo, N-isopropilo, N-n-butilo, N-isobutilo, N-s-butilo o N-t-butilo, N-fenilo, N-ciclopentilo, N-ciclohexilo o N-cicloheptilo; y A" es H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₅-C₁₀, o fenilo.

En algunas formas de realización preferentes de los compuestos de Fórmula I, al menos dos de entre Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son H, y los demás son sustituyentes distintos de H. En las formas de realización especialmente preferentes, al menos dos de entre Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son H, los demás son sustituyentes distintos de H; e Y₁ e Y₂ son ambos O. En las formas de realización especialmente preferentes, al menos dos de entre Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son H, y los demás son sustituyentes distintos de H; Y₁ e Y₂ son ambos O y G₁ es O o S. En las formas de realización especialmente preferentes específicas, al menos dos de entre Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son H, y los demás son sustituyentes distintos de H; Y₁ e Y₂ son ambos O; G₁ es O o S; y A" es H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₅-C₁₀, o fenilo. En otras formas de realización preferentes específicas, al menos dos de entre Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz son H, y los demás son sustituyentes distintos de H; Y₁ e Y₂ son ambos O; G₁ es O y A" es H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₅-C₁₀, o fenilo.

En algunas formas de realización preferentes de los compuestos de Fórmula I, cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H. En las formas de realización especialmente preferentes cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H; e Y₁ e Y₂ son ambos O. En las formas de realización especialmente preferentes, cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H; Y₁ e Y₂ son ambos O y G₁ es O o S. En las formas de realización especialmente preferentes específicas, cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H; Y₁ e Y₂ son ambos O; G₁ es O o S; y A" es H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₅-C₁₀, o fenilo. En otras formas de realización preferentes específicas, cada uno de Ru, Rv, Rw, Rx, Ry y Rz es H; Y₁ e Y₂ son ambos O; G₁ es O y A" es H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₅-C₁₀, o fenilo.

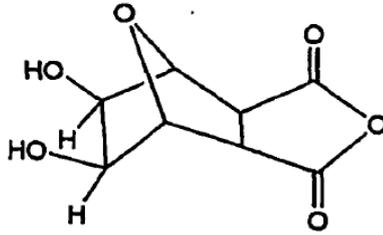
En algunos compuestos divulgados en la presente, Y₁ e Y₂ son S.
En algunos compuestos divulgados en la presente, G₁ es O o S.
En algunos compuestos divulgados en la presente, A" es H, alquilo C₁-C₄ o fenilo.

En una forma de realización adicional de la presente divulgación se encuentra un proceso de preparación de un producto de fórmula:



en la que R¹ es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R¹ está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

5

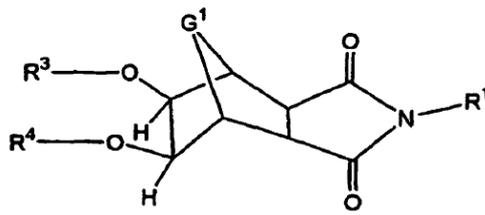


10

15

con un compuesto de fórmula: $\text{NH}_2\text{-R}^1$, en la que arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R^1 está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, en condiciones suficientes para producir el producto. En una forma de realización adicional de la presente invención se encuentra un proceso de preparación de un producto de fórmula:

20

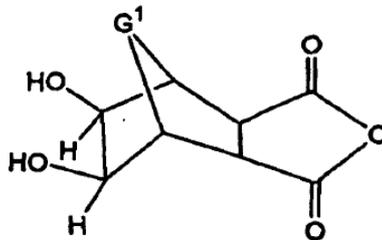


25

30

en la que G^1 es O, R^3 es H, R^4 es pg, en la que pg es un grupo protector; R^1 es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R^1 está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

35

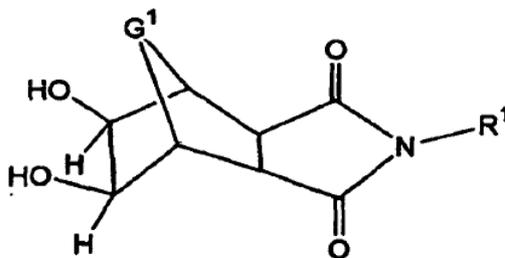


40

45

con un reaccionante de fórmula: H_2NR^1 en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida de fórmula:

50



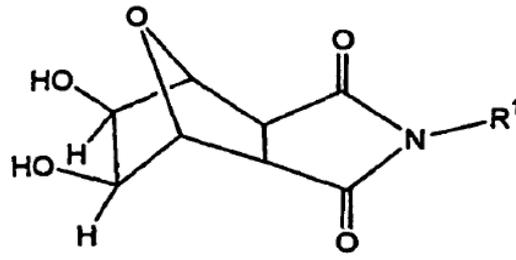
55

60

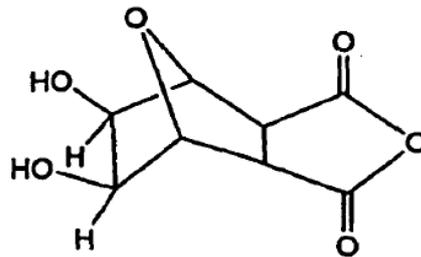
y hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg , en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar el producto.

65

En la presente se divulga un proceso para hacer la invención, por ejemplo un producto de la fórmula:

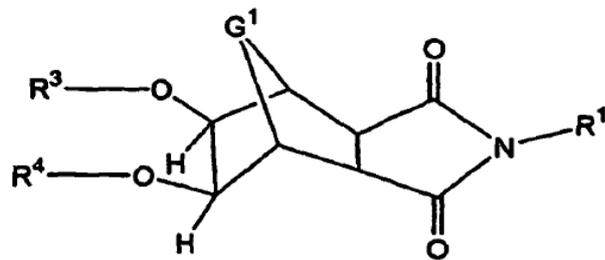


en la que R¹ es fenilo, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:



con un compuesto de fórmula: NH₂-R¹, en la que R¹ es fenilo, en condiciones suficientes para producir el producto.

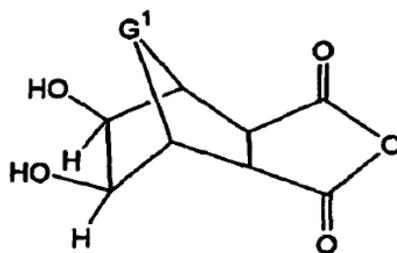
En una forma de realización adicional de la presente divulgación se encuentra un proceso de preparación de un producto de fórmula:



45

50

en la que G¹ es O, S o NR², en la que R² es un miembro del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo, en la que R² está opcionalmente sustituido adicionalmente, y en la que cada R² contiene opcionalmente una o más insaturaciones; R³ es H, R⁴ es pg, en la que pg es un grupo protector; R¹ es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R¹ está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

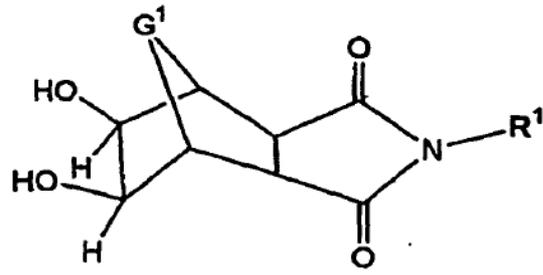


65

con un reaccionante de fórmula: H₂NR¹ en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida de fórmula:

5

10



15

y hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar el producto.

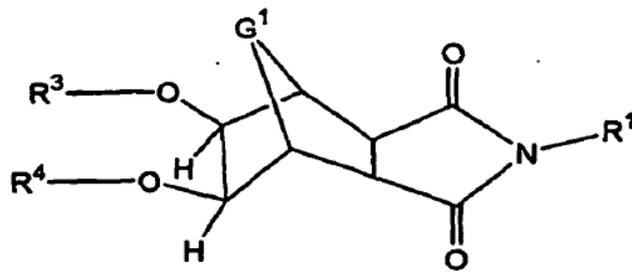
20

El proceso según la reivindicación 125, en la que R¹ es arilo opcionalmente sustituido o alquilo sustituido con arilo opcionalmente sustituido.

En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:

25

30

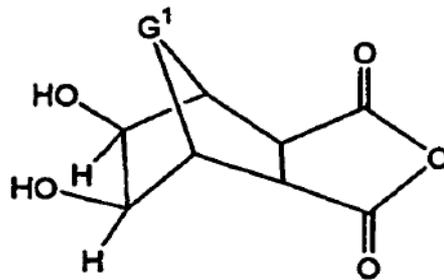


35

en la que G¹ es O, R³ es H, R⁴ es pg, en la que pg es un grupo protector; R¹ es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R¹ está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

40

45



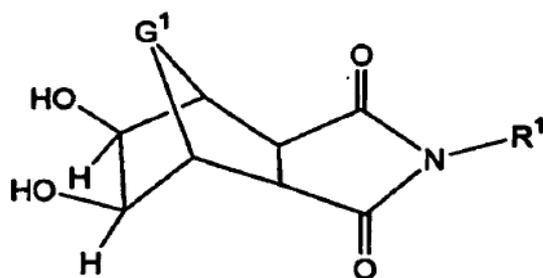
50

con un reaccionante de fórmula: H₂NR¹ en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida fórmula:

55

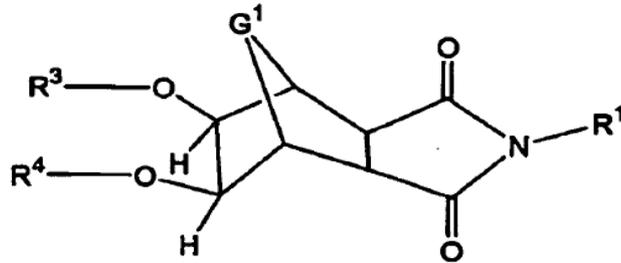
60

65

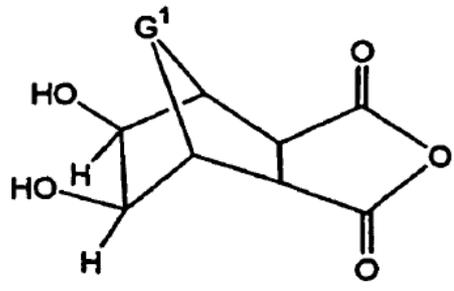


y hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar el producto.

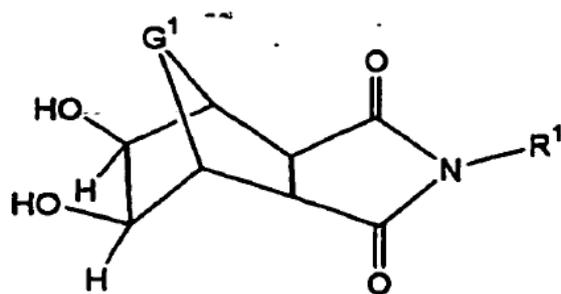
En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:



en la que G¹ es O, R³ es H, R⁴ es pg, en la que pg es un grupo protector; y R¹ es fenilo, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

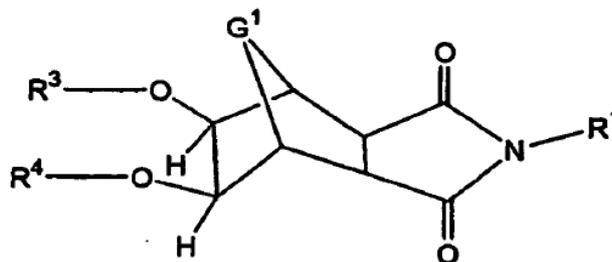


en la que G¹ es O, con un compuesto de fórmula: NH₂-R₁, en la que R¹ es fenilo, en condiciones suficientes para producir un producto intermedio de imida de fórmula:

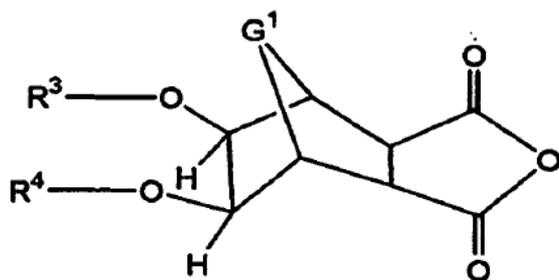


y hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula: Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector en condiciones suficientes para producir el producto.

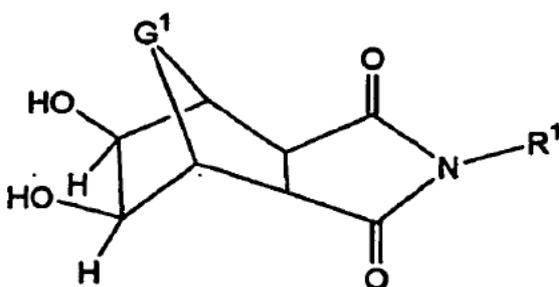
En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:



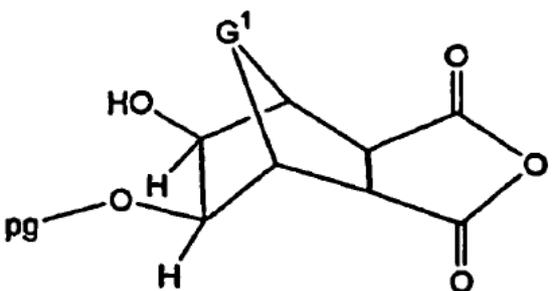
en la que G^1 es O, S o NR^2 , en la que R^2 es un miembro del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo, en la que R^2 está opcionalmente sustituido adicionalmente y en la que cada R^2 contiene opcionalmente una o más insaturaciones; R^3 es L^1 , en la que L^1 es un resto de unión, R^4 es pg, en la que pg es un grupo protector; R^1 es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R^1 está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:



con un reaccionante de fórmula: H_2NR^1 en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida fórmula:

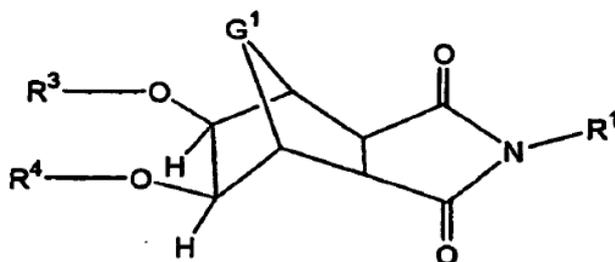


hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar un producto intermedio protegido de fórmula:



y a continuación hacer reaccionar el producto intermedio protegido con un reactivo adecuado para introducir el resto L^1 , en condiciones adecuadas para producir el producto. El proceso según la reivindicación 140, en la que R^1 es arilo opcionalmente sustituido o alquilo sustituido con arilo opcionalmente sustituido.

En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:

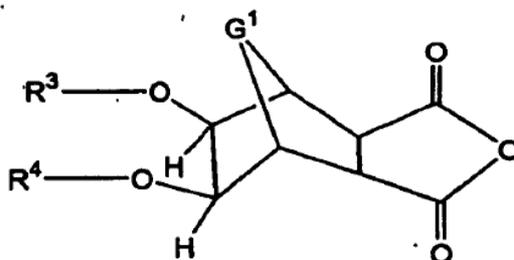


en la que G^1 es O; R^3 es L^1 , en la que L^1 es un resto de unión, R^4 es pg, en la que pg es un grupo protector; R^1 es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R^1 está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

5

10

15

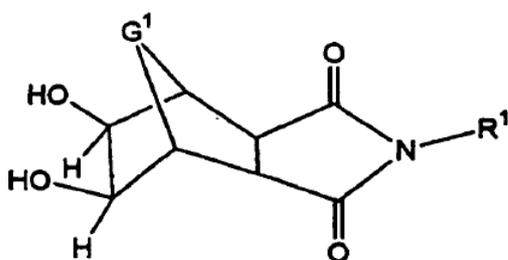


con un reaccionante de fórmula: H_2NR^1 en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida de fórmula:

20

25

30

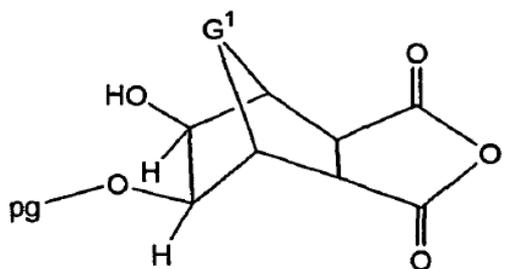


hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar un producto intermedio protegido de fórmula:

35

40

45



y a continuación hacer reaccionar el producto intermedio protegido con un reactivo adecuado para introducir el resto L^1 , en condiciones adecuadas para producir el producto. El proceso según la reivindicación 151, en la que R^1 es arilo opcionalmente sustituido o alquilo sustituido con arilo opcionalmente sustituido.

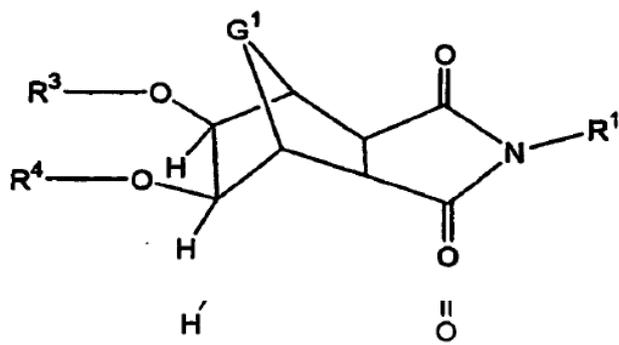
50

En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:

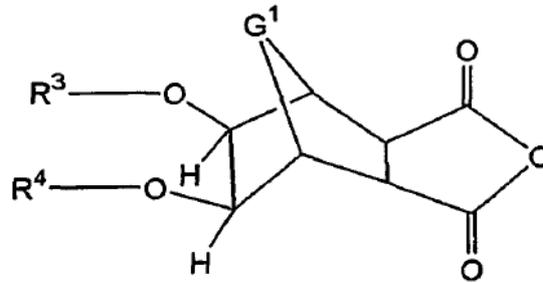
55

60

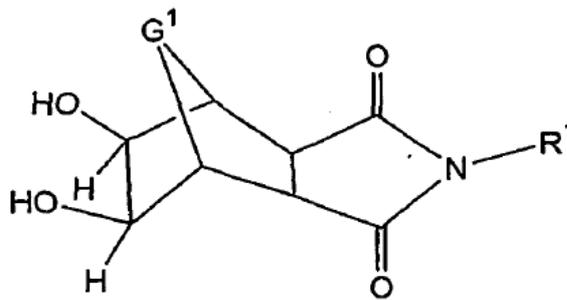
65



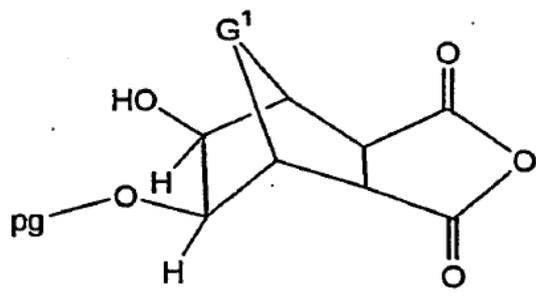
en la que G^1 es O, S o NR^2 , en la que R^2 es un miembro del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo, en la que R^2 está opcionalmente sustituido adicionalmente y en la que cada R^2 contiene opcionalmente una o más insaturaciones; R^3 es L^1 -SS, en la que L^1 es un resto de unión y SS es un medio de soporte sólido, R^4 es pg, en la que pg es un grupo protector; R^1 es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R^1 está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:



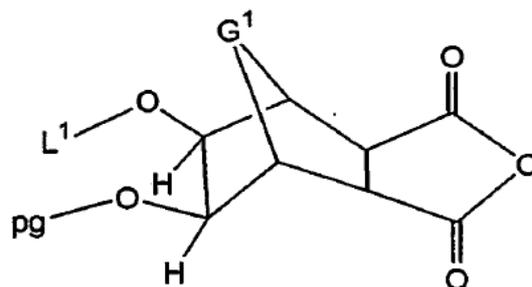
con un reaccionante de fórmula: H_2NR^1 en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida de fórmula:



hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar un producto intermedio protegido de fórmula:



y a continuación hacer reaccionar el producto intermedio protegido con un reactivo adecuado para introducir el resto L^1 , en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de soporte de fórmula:

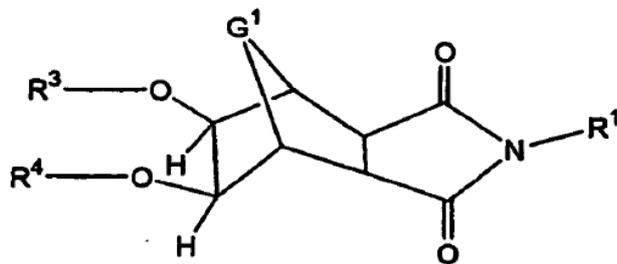


y a continuación hacer reaccionar el producto intermedio de soporte con un medio de soporte sólido en condiciones adecuadas para producir el producto.

En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:

5

10



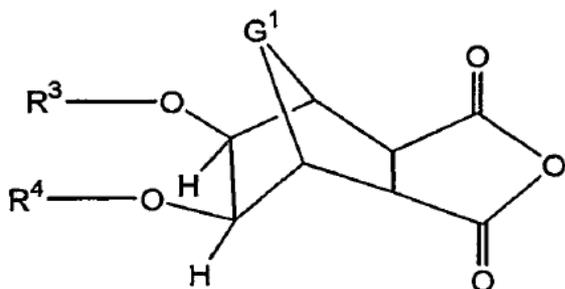
15

en la que G^1 es O; R^3 es L^1 -SS, en la que L^1 es un resto de unión y SS es un medio de soporte sólido, en la que L^1 es un resto de unión, R^4 es pg, en la que pg es un grupo protector; R^1 es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R^1 está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

20

25

30

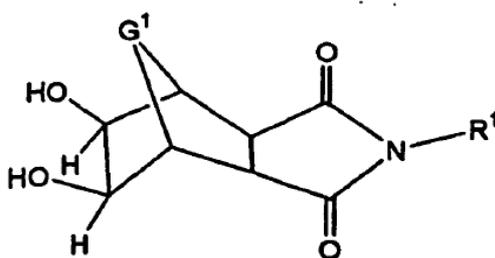


35

con un reaccionante de fórmula: H_2NR^1 en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida de fórmula:

40

45

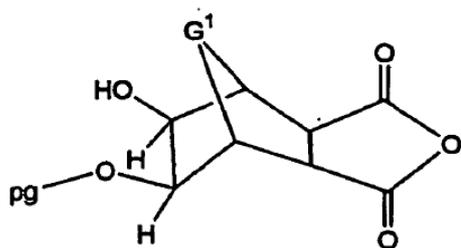


50

hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar un producto intermedio protegido de fórmula:

55

60

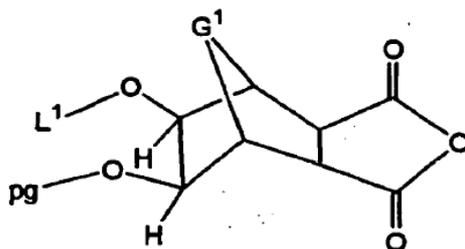


65

y a continuación hacer reaccionar el producto intermedio protegido con un reactivo adecuado para introducir el resto L^1 , en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de soporte de fórmula:

5

10



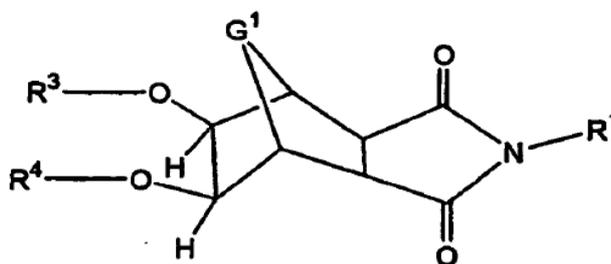
15

y hacer reaccionar el producto intermedio de soporte con un medio de soporte sólido que tiene un grupo funcional adecuado en condiciones adecuadas para producir el producto.

En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:

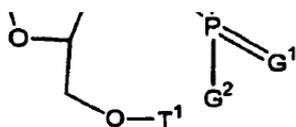
20

25



30

35



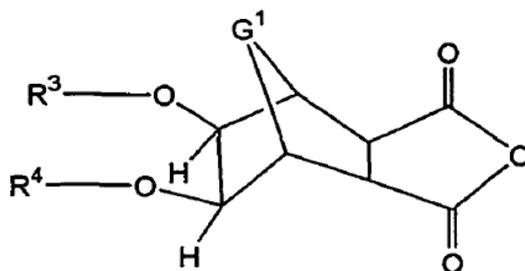
40

en la que B^1 es una base nitrogenada, G^1 es O o S, G^2 es OT^2 , ST^2 o NR^{N^N} , R^{2i} es un H, OH, OH protegido o un sustituyente; T^1 es un grupo protector, G^1 es O, S o NR^2 , en la que R^2 es un miembro del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo, en la que R^2 está opcionalmente sustituido adicionalmente y en la que cada R^2 contiene opcionalmente una o más insaturaciones; R^3 es L^1-SS , en la que L^1 es un resto de unión y SS es un medio de soporte sólido, R^4 es pg, en la que pg es un grupo protector; R^1 es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R^1 está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

45

50

55



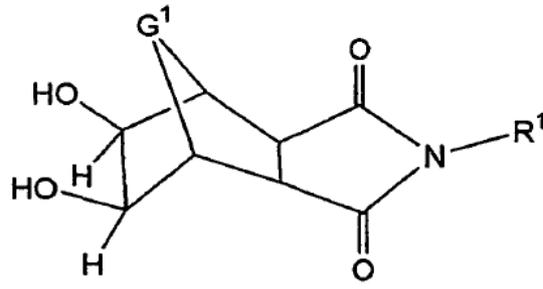
60

con un reaccionante de fórmula: H_2NR^1 en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida de fórmula:

65

5

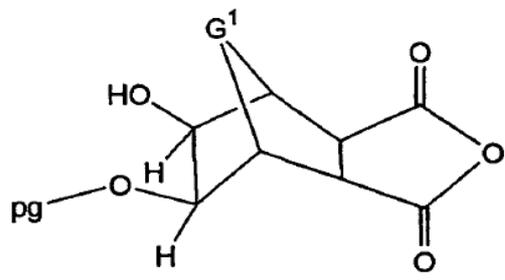
10



15 hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar un producto intermedio protegido de fórmula:

20

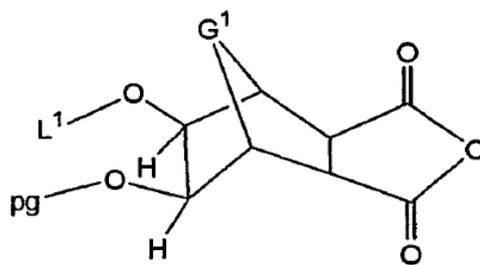
25



30 y a continuación hacer reaccionar el producto intermedio protegido con un reactivo adecuado para introducir el resto L¹, en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de soporte de fórmula:

35

40

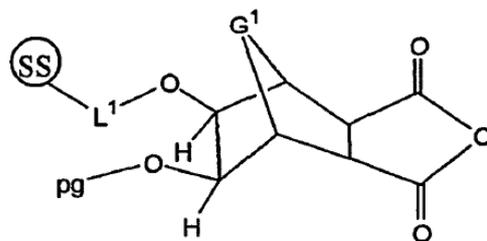


45

y a continuación hacer reaccionar el producto intermedio de soporte con un medio de soporte sólido en condiciones adecuadas para producir un soporte de síntesis de oligonucleótidos de fórmula:

50

55



60

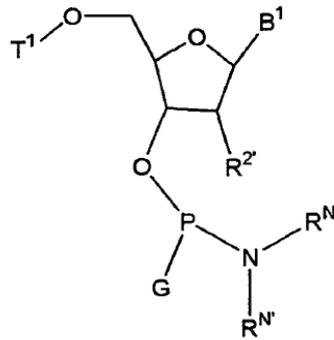
hacer reaccionar el soporte síntesis de oligonucleótidos con un ácido para eliminar el pg y formar un soporte de síntesis de oligonucleótidos desprotegido, a continuación hacer reaccionar el soporte de síntesis de oligonucleótidos desprotegido con un nucleósido activado:

65

5

10

15

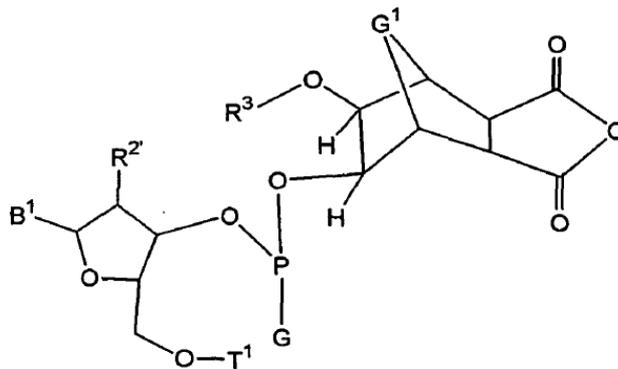


20

en el que G es OT², ST² o NR^NR^{N'}, en el que T² es un grupo bloqueante y R^N y R^{N'} son independientemente alquilo o junto con el N al que están fijados forman una estructura de anillo heterocíclico, en condiciones adecuadas para producir el producto intermedio:

25

30



35

y oxidar el producto intermedio para formar el producto.

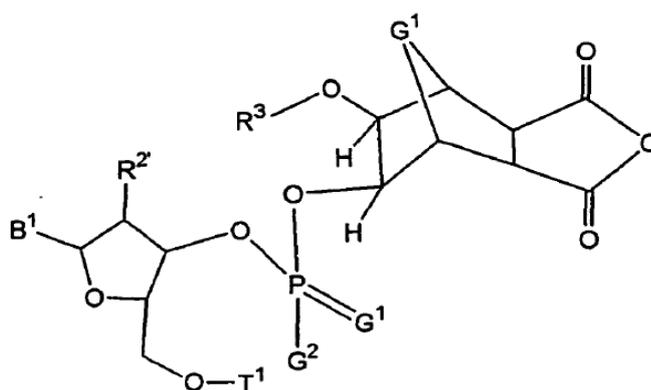
40

En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:

45

50

55



60

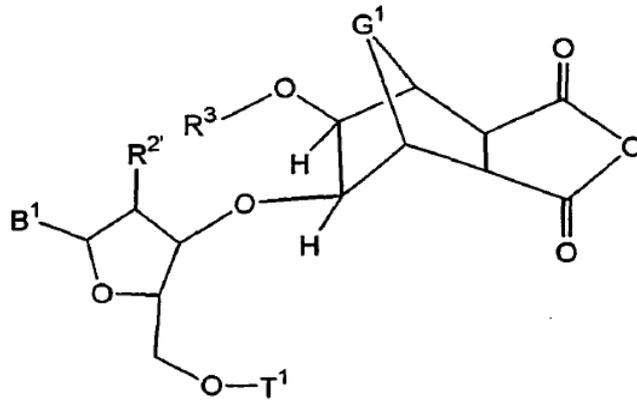
en la que B¹ es una base nitrogenada, R² es un H, OH, OH protegido o un sustituyente; T¹ es un grupo protector; G¹ es O; R³ es L¹-SS, en la que L¹ es un resto de unión y SS es un medio de soporte sólido, en la que L¹ es un resto de unión, R⁴ es pg, en la que pg es un grupo protector; R¹ es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R¹ está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

65

5

10

15

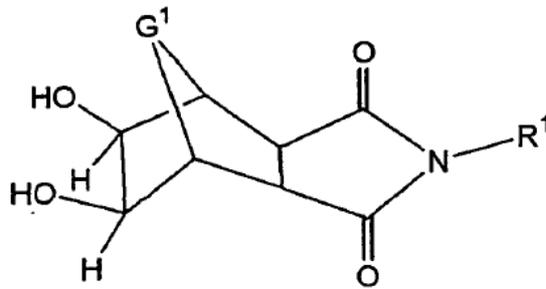


20

con un reaccionante de fórmula: H_2NR^1 en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de imida de fórmula:

25

30



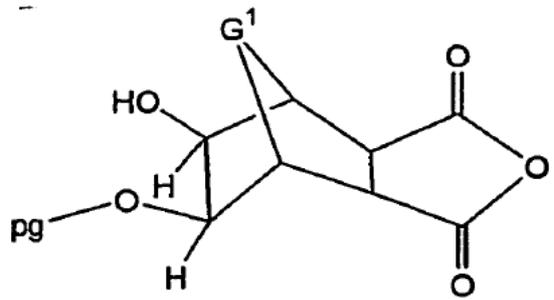
35

hacer reaccionar el producto intermedio de imida con un compuesto de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar un producto intermedio protegido de fórmula:

40

45

50

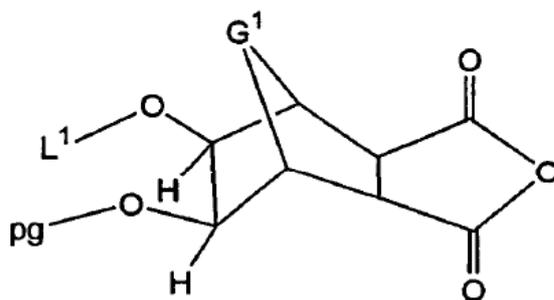


55

y a continuación hacer reaccionar el producto intermedio protegido con un reactivo adecuado para introducir el resto L¹, en condiciones adecuadas para producir un producto intermedio de soporte de fórmula:

60

65

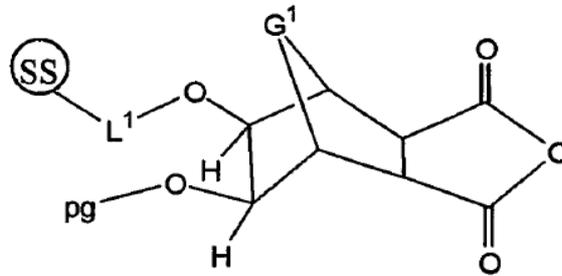


y hacer reaccionar el producto intermedio de soporte con un medio de soporte sólido que tiene un grupo funcional adecuado en condiciones adecuadas para producir un soporte de síntesis de oligonucleótidos de fórmula:

5

10

15



20

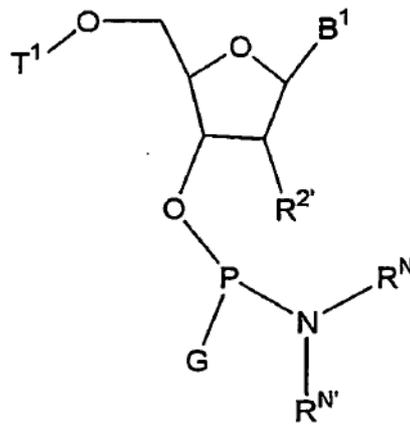
hacer reaccionar el soporte síntesis de oligonucleótidos con un ácido para eliminar el pg y formar un soporte de síntesis de oligonucleótidos desprotegido, a continuación hacer reaccionar el soporte de síntesis de oligonucleótidos desprotegido con un nucleósido activado:

25

30

35

40



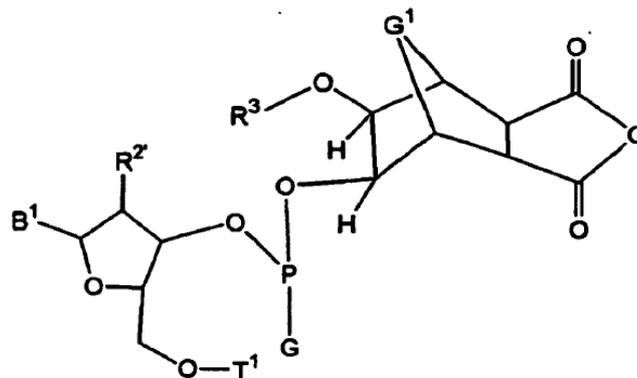
en el que G es OT², ST² o NR^NR^{N'}, en el que T² es un grupo bloqueante y R^N y R^{N'} son independientemente alquilo o junto con el N al que están fijados forman una estructura de anillo heterocíclico, en condiciones adecuadas para producir el producto intermedio:

45

50

55

60



y oxidar el producto intermedio para formar el producto. El proceso según la reivindicación, en la que R¹ es arilo opcionalmente sustituido o alquilo sustituido con arilo opcionalmente sustituido.

65

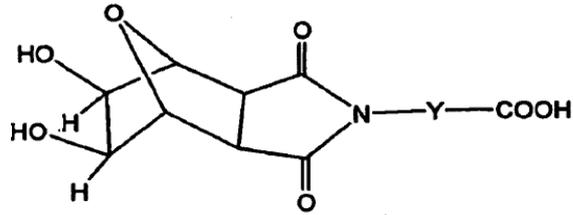
En las formas de realización preferentes del presente proceso, pg es un grupo 4,4'-dimetoxitriifenilmetilo, un grupo 4-metoxitriifenilmetilo, un grupo pixilo o un grupo pixilo sustituido adicionalmente; el reactivo adecuado para introducir el resto L¹ es un anhídrido, un anhídrido cíclico, o más concretamente un anhídrido succínico; B¹ es un miembro del

grupo que consiste en timinilo, citosinilo, uridinilo, 5-metilcitosinilo, guanilo y adeninilo; $R^{2'}$ es un sustituyente 2' seleccionado de entre H, OH, F, OMe, OCH_2CH_2OMe , $OCH_2CH_2CH_2NH_2$, u OY, en el que Y es un grupo protector eliminable; T^1 es un grupo protector lábil en medio ácido seleccionado de entre un grupo 4,4'-dimetoxitriifenilmetilo, un grupo 4-metoxitriifenilmetilo, un grupo pixilo o un grupo pixilo sustituido adicionalmente.

5

En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:

10

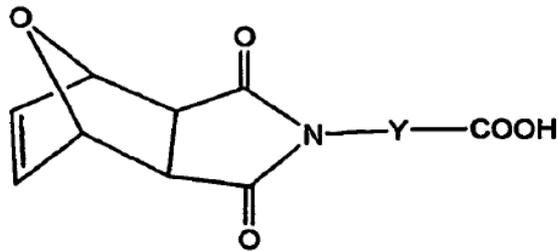


15

20

en la que Y es alquileo, cicloalquileo, arileno, heteroarileno, arilalquileo, alcarileno, o alquilenarilalquileo, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

25



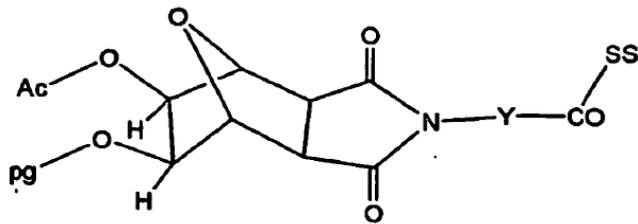
30

35

con un reactivo oxidante adecuado para formar el producto, en la que el reactivo oxidante adecuado es H_2O_2 , opcionalmente en presencia de un catalizador.

En la presente se divulga un proceso para hacer un producto de la fórmula:

40

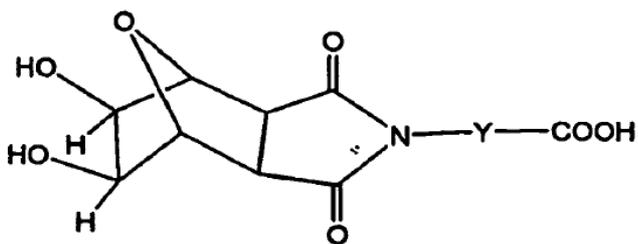


45

50

en la que Y es alquileo, cicloalquileo, arileno, heteroarileno, arilalquileo, alcarileno, o alquilenarilalquileo, SS es un medio de soporte sólido, Ac es un grupo bloqueante acilo y pg es un grupo protector del proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula:

55



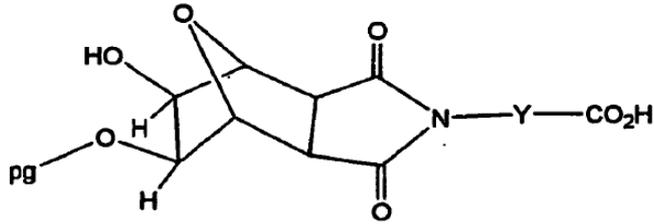
60

65

con un reactivo protector de fórmula Ig-pg, en la que Ig es un grupo saliente y pg es un grupo protector, para formar un producto intermedio protegido de fórmula:

5

10

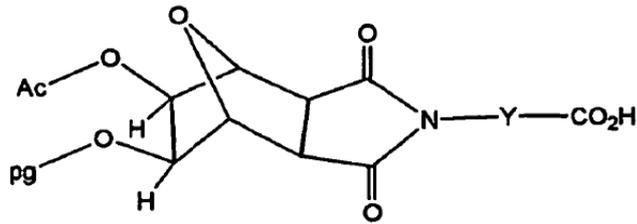


15 y hacer reaccionar el producto intermedio protegido con un reactivo de acilación para formar un producto intermedio bloqueado-prottegido de fórmula:

20

25

30



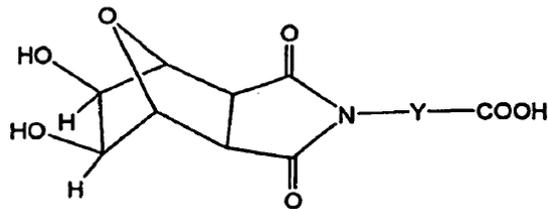
en la que Ac es un grupo bloqueante, y hacer reaccionar el producto intermedio bloqueado-prottegido con un medio de soporte sólido adecuado para formar el producto.

35

En una forma de realización adicional de la presente divulgación se encuentra un proceso de preparación de un producto de fórmula:

40

45

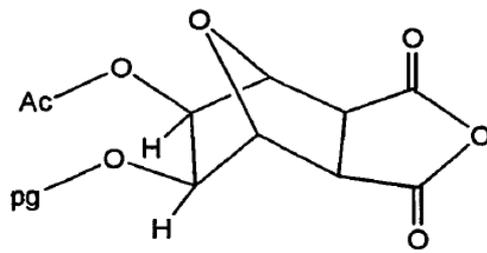


en la que Y es alquileno, cicloalquileno, arileno, heteroarileno, arilalquileno, alcarileno, o alquilenarilalquileno, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula:

50

55

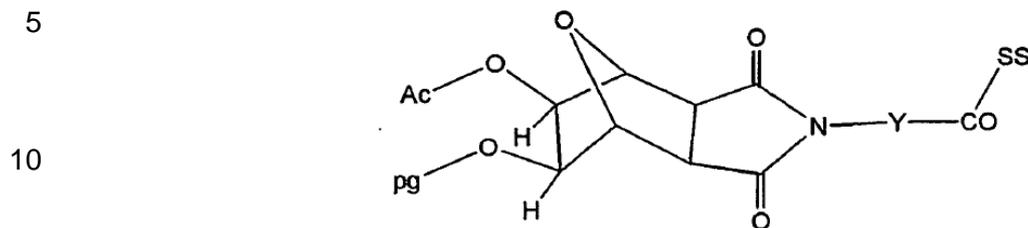
60



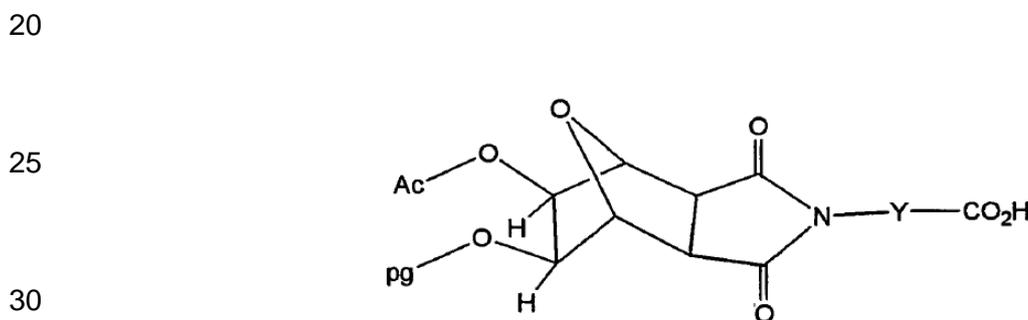
en la que Ac es un grupo bloqueante y pg es un grupo protector, con un reactivo de fórmula NH₂-Y-COOH en condiciones adecuadas para producir el producto.

65

En una forma de realización adicional de la presente invención se encuentra un proceso de preparación de un producto de fórmula:



15 en la que Y es alquileo, cicloalquileo, arileno, heteroarileno, arilalquileo, alcarileno, o alquilenarilalquileo, SS es un medio de soporte sólido, Ac es un grupo bloqueante acilo y pg es un grupo protector del proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula:



35 en la que Ac es un grupo bloqueante, y hacer reaccionar el producto intermedio bloqueado-prottegido, con un medio de soporte sólido adecuado SS para formar el producto.

Bases nitrogenadas

40 Las bases nitrogenadas Bx pueden ser iguales o diferentes, e incluyen las bases nitrogenadas naturales adenina (A), guanina (G), timina (T), uracilo (U) y citosina (C), así como bases nitrogenadas modificadas. Las bases nitrogenadas modificadas incluyen restos heterocíclicos que están relacionados estructuralmente con las bases nitrogenadas naturales, pero que han sido modificados químicamente para conferir determinada propiedad a la base nitrogenada modificada que no poseen las bases nitrogenadas naturales. La expresión "base nitrogenada", tal como se utiliza en el presente documento, pretende ser sinónimo de "base de ácido nucleico o mimético de la misma". En general, una base nitrogenada es cualquier subestructura que contiene uno o más átomos o grupos de átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno con una base de un oligonucleótido.

50 Tal como se utilizan en el presente documento, las bases nitrogenadas "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 bases nitrogenadas modificadas incluyen otras bases nitrogenadas sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil(-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquinilo de las bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracil(pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo especialmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las bases nitrogenadas modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas de g tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), pirido indol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las bases nitrogenadas modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se sustituye con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las bases nitrogenadas adicionales incluyen las descritas en la patente de E.EU.U. N° 3.687.808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por English *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.

5 Algunas de estas bases nitrogenadas resultan especialmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones 5-metilcitosina han demostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6°C-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Ratón, 1993, págs. 276-278) y actualmente resultan las sustituciones de bases preferentes, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

10 También se divulgan en la presente modificaciones adicionales en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Por ejemplo, una modificación adicional de los oligonucleótidos conjugados a ligando de la presente invención implica la unión química al oligonucleótido de uno o más conjugados o restos no ligando adicionales que mejoran la actividad, la distribución celular o la absorción celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen pero no se limitan a restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1989, 86, 6553), ácido cólico (Manoharan *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan *et al.*, Ann N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306; Manoharan *et al.*, Bioorg Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo restos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1993, 75, 49), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969), o ácido acético adamantano (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995 36, 3651), un resto palmitilo (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923).

30 También se divulgan en la presente los oligonucleótidos que comprenden al menos un nucleótido que porta un sustituyente 2' seleccionado de entre OH, F, O-alquilo (por ejemplo, O-metilo), S-alquilo, N-alquilo, O-alqueno, S-alqueno, N-alqueno; O-alquino, S-alquino, N-alquino; O-alquilo-O-alquilo, en las que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno o alquino C₂ a C₁₀, sustituidos o no sustituidos, respectivamente. Resultan especialmente preferentes O[(CH₂)_gO]_hCH₃, O(CH₂)_gOCH₃, O(CH₂)_gNH₂, O(CH₂)_gCH₃, O(CH₂)_gONH₂, y O(CH₂)_gON[(CH₂)_gCH₃]₂, en los que g y h son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferentes comprenden uno de los siguientes en la posición 2' : alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. Una modificación 2' preferente incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta, 1995, 78 486-504). Una modificación preferente adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, conocido también como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos que se presentan más adelante en el presente documento, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetil-amino-etoxi-etilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂, también descrito en los ejemplos que se presentan más adelante en el presente documento.

50 Otras modificaciones preferentes incluyen 2'-metoxi(2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi(2'-O-CH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alil(2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alil(2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro(2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arábino (arriba) o en la posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arábino preferente es 2'-F. También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos unidos en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido 5' terminal.

55 Los grupos sustituyentes de azúcar especialmente útiles incluyen O[(CH₂)_gO]_hCH₃, O(CH₂)_gOCH₃, O(CH₂)_gNH₂, O(CH₂)_gCH₃, O(CH₂)_gONH₂, y O(CH₂)_gON[(CH₂)_gCH₃]₂, en la que g y h son de 1 a aproximadamente 10.

60 Algunos compuestos oligoméricos especialmente útiles de la invención contienen al menos un nucleósido que tiene uno de los siguientes grupos sustituyentes: alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂ NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un compuesto oligomérico, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto oligomérico, y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. Una modificación preferente incluye 2'-metoxietoxi[2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE] (Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferente adicional es 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE. Los grupos sustituyentes aminooxi representativos se

describen en la solicitud de patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente con número de serie 09/344.260, presentada el 25 de junio de 1999, titulada "Aminoxy-Functionalized Oligomers", y en la solicitud de patente de Estados Unidos con número de serie 09/370.541, presentada el 9 de agosto de 1999, titulada "Aminoxy-Functionalized Oligomers and Methods for Making Same".

5 Otras modificaciones 2' especialmente ventajosas incluyen 2'-metoxi(2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro(2'-F). También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones en los nucleósidos y oligómeros, en concreto la posición 3' del azúcar en el nucleósido 3' terminal o en una posición 3' de un nucleósido que tenga un enlace de la posición 2', tales como un oligómero unido en 2'-5' y en la posición 5' de un nucleósido 5' terminal. Los oligómeros pueden tener también miméticos de azúcares tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo.

15 Los grupos sustituyentes 2' acetamido representativos de los oligonucleótidos preferentes que pueden producirse mediante los métodos de la presente invención se describen en la patente de Estados Unidos 6.147.200 que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Los grupos sustituyentes dimetilaminoetiloxietilo representativos se describen en la solicitud de patente internacional PCT/US99/17895, titulada "2'-O-Dimethylaminoethoxyethyl-Modified Oligonucleotides", presentada el 06 de agosto de 1999, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido a cualquiera de los restos hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. En la formación de los oligonucleótidos, los grupos fosfato se unen covalentemente a nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal pueden unirse para formar una estructura circular por hibridación o por formación de un enlace covalente, sin embargo, resultan generalmente preferentes las estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura del oligonucleótido, los grupos fosfato son conocidos comúnmente como los que forman los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido. El enlace internucleosídico normal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

25 Aunque la presente invención puede adaptarse para producir oligonucleótidos para cualquier uso final deseado (por ejemplo, como sondas utilizadas en la reacción en cadena de la polimerasa), un uso preferente de los oligonucleótidos es en la terapéutica antisentido. Un modo de acción que se emplea a menudo en la terapéutica antisentido es el denominado mecanismo de ARNasa H, de manera que se introduce una hebra de ADN en una célula, donde el ADN hibrida con una hebra de ARN. El híbrido ADN-ARN es reconocido por una endonucleasa, la ARNasa H, que escinde la hebra de ARN. En los casos normales, la hebra de ARN es ARN mensajero (ARNm), que, después de haber sido escindido, no puede traducirse en el correspondiente secuencia de proteínas o péptidos en los ribosomas. De esta manera, el ADN puede emplearse como agente para modular la expresión de determinados genes.

30 Los procesos divulgados en la presente son aplicables a la producción de oligonucleótidos que comprenden al menos un nucleótido que tiene un resto de azúcar bicíclico, es decir, un nucleótido LNA (oligonucleótidos en los que las posiciones 2' y 4' están conectadas por un puente) también forma dúplex con ARN, LNA o ADN complementario con altas afinidades térmicas. Los espectros de dicroísmo circular (DC) muestran que los dúplex que implican LNA totalmente modificado (especialmente LNA:ARN) se asemejan estructuralmente a un dúplex de ARN:ARN en forma de A. El examen con resonancia magnética nuclear (RMN) de un dúplex de LNA:ADN confirmó la conformación 3'-endo de un monómero de LNA. También se ha demostrado el reconocimiento del ADN bicatenario que sugiere la invasión de la hebra por el LNA. Los estudios de las secuencias desapareadas demuestran que los LNA obedecen las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick con una selectividad generalmente mejorada en comparación con las correspondientes hebras de referencia no modificadas.

45 Los LNA en los que el grupo 2'-hidroxilo se une al átomo de carbono 4' del anillo de azúcar, formando de ese modo un enlace 2'-C,4'-C-oximetileno, formando de este modo un resto de azúcar bicíclico. El enlace puede ser un grupo metileno (-CH₂)_n que se une mediante puentes al átomo de oxígeno en 2' y al átomo de carbono en 4' en el que n es 1 ó 2 (Singh *et al.*, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456). El LNA y los análogos de LNA presentan estabilidades térmicas del dúplex muy altas con el ARN y el ADN complementario (T_m = +3 a +10 C), estabilidad frente a la degradación 3'-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. Otros grupos puente preferentes incluyen el puente 2'-desoxi-2'-CH₂OCH₂-4'.

55 Conectores internucleosídicos alternativos

Además de los enlaces internucleosídicos diéster de fosfato y diéster de fosforotioato, se conocen en la técnica otros conectores internucleosídicos. Los métodos de la presente invención son aplicables a la síntesis de oligonucleótidos que comprenden cadenas principales de diéster de fosfato completas o diéster de fosforotioato completas, sin embargo, también se contemplan en su totalidad o en parte dentro del contexto de la presente invención los compuestos quiméricos que tengan más de un tipo de enlace internucleosídico, así como oligómeros que tengan enlaces diéster no-fosfato/fosforotioato, como se describe con más detalle más adelante.

65 Los enlaces diéster no-fosfato/fosforotioato ejemplares contemplados dentro de la experiencia de la técnica incluyen: fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros fosfonatos de alquilo, incluyendo fosfonatos

de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfonatos y boranofosfonatos. Los enlaces adicionales incluyen: tiodiéster (-OC(O)-S-), tionocarbamato (-OC(O)(NJ)-S-), siloxano (-O-Si(J)₂-O-), carbamato (-OC(O)-NH- y NH-C(O)-O-), sulfamato (-OS(O)(O)-N- y NS(O)(O)-N-), morfolino sulfamida (-OS(O)(N(morfolino)-), sulfonamida (-O-SO₂-NH-), sulfuro (-CH₂-S-CH₂-), sulfonato (-O-SO₂-CH₂-), N,N'-dimetilhidrazina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-), tioformacetal (-SCH₂-O-), formacetal (-O-CH₂-O-), tiocetal (-SC(J)₂-O-), cetal (-OC(J)₂-O-), amina (-NH-CH₂-CH₂-), hidroxilamina (-CH₂-N(J)-O-), hidroxilimina (-CH=NO-), e hidrazinilo (-CH₂-N(H)-N(H)-).

En cada una de las subestructuras anteriores relativas a los enlaces internucleosídicos, J indica un grupo sustituyente que es comúnmente un grupo alquilo o hidrógeno o un grupo más complicado que varía de un tipo de enlace a otro.

Además de los grupos de unión como los descritos anteriormente que implican la modificación o sustitución de los átomos -O-P-O- de un enlace natural, se encuentran incluidos dentro del alcance de la presente invención los grupos de unión que incluyen la modificación del grupo 5'-metileno así como uno o más de los átomos -O-P-O-. Los enlaces de este tipo están bien documentados en la técnica anterior e incluyen sin limitación los siguientes: amidas (-CH₂-CH₂-N(H)-C(O)) y -CH₂-ON=CH-; y alquil-fósforo (-C(J)₂-P(=O)(DO)-C(J)₂-C(J)₂). J es como se ha descrito anteriormente.

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se preparan generalmente, como se ha descrito anteriormente, en un medio de soporte sólido, por ejemplo, un medio de soporte sólido. En general se une primero un primer sintón (por ejemplo, un monómero, tal como un nucleósido) a un medio de soporte sólido, y a continuación se sintetiza el oligonucleótido por acoplamiento secuencial de monómeros al sintón unido al soporte sólido. Este alargamiento iterativo da finalmente como resultado un compuesto oligomérico final u otro polímero tal como un polipéptido. Los medios de soporte sólidos adecuados pueden ser solubles o insolubles, o pueden poseer solubilidad variable en diferentes disolventes para permitir el crecimiento del polímero unido al soporte sólido dentro o fuera de la solución, según se desee. Los medios de soporte tradicionales, tales como los medios de soporte sólidos son en su mayor parte insolubles y se colocan de manera rutinaria en recipientes de reacción mientras los reactivos y disolventes reaccionan con y/o lavan la cadena en crecimiento hasta que el oligómero alcance la longitud diana, después de lo cual se escinde del soporte y, en caso necesario, se trata adicionalmente para producir el compuesto polimérico final. Los enfoques más recientes han introducido soportes solubles que incluyen soportes de polímeros solubles para permitir precipitar y disolver el producto sintetizado iterativamente en los puntos deseados en la síntesis (Gravert *et al.*, Chem. Rev., 1997, 97, 489-510).

La expresión "medio de soporte" pretende incluir todas las formas de soporte conocidas por el experto en la materia para la síntesis de compuestos oligoméricos y compuestos relacionados, tales como péptidos. Algunos medios de soporte representativos que son aplicables a los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: vidrio de poro controlado (CPG); vidrio de poro controlado con oxalilo (véase, por ejemplo, Alul, *et al.*, Nucleic Acids Research 1991, 19, 1527); partículas que contienen sílice, tales como perlas de vidrio poroso y gel de sílice tal como el formado por la reacción del tricloro-[3-(4-clorometil)fenil]propilsilano y perlas de vidrio poroso (véase Parr y Grohmann. Angew. Chem. Internat. Ed. 1972, 11, 314, que es comercializado con la marca comercial "PORASIL E" por Waters Associates, Framingham, Mass., EE.UU.); el monoéster de 1,4-dihidroximetilbenceno y sílice (véase Bayer y Jung, Tetrahedron Lett., 1970, 4503, que es comercializado con la marca comercial "BIOPAK" por Waters Associates); TENTAGEL (véase, por ejemplo, Wright, *et al.*, Tetrahedron Letters 1993, 34, 3373); matriz de perlas de copolímero de estireno/divinilbenceno reticulado o POROS, un copolímero de poliestireno/divinilbenceno (disponible en Perceptive Biosystems); medio de soporte soluble, polietilenglicol PEG (véase Bonora *et al.*, Organic Process Research & Development, 2000, 4, 225-231).

En las formas de realización concretas de la invención, SM es un medio de soporte sólido.

En las formas de realización concretas de la invención, SM es un medio de soporte semisólido, tal como polietilenglicol, quitosano, etc. Una ventaja del quitosano como medio de soporte es que posee naturalmente un grupo amino terminal, que resulta conveniente para unirse a un grupo ácido terminal como se ha descrito en referencia a la fórmula CC, anteriormente indicada.

Otros medios de soporte aplicables a la presente invención incluyen, sin limitación, el soporte PEPS, una película de polietileno (PE) con injertos de poliestireno (PS) pendientes de cadena larga (peso molecular del orden de 10⁶, véase Berg, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 8024 y la solicitud de patente internacional WO 90/02749). La capacidad de carga de la película es tan alta como la de una matriz de perlas con la flexibilidad adicional para dar cabida a múltiples síntesis simultáneamente. La película de PEPS puede fabricarse en forma de láminas discretas marcadas, sirviendo cada una como un compartimento individual. Durante todas las etapas idénticas de los ciclos de síntesis, las láminas se mantienen juntas en un único recipiente de reacción para permitir la preparación simultánea de una multitud de péptidos a una velocidad próxima a la de un solo péptido mediante los métodos convencionales.

Además, los experimentos con otras geometrías del polímero PEPS tal como, por ejemplo, de fieltro no tejido, red de punto, varillas o placas de micropocillos no han indicado ninguna limitación de la eficacia de síntesis.

5 Otros medios de soporte aplicables a la presente invención incluyen, sin limitación, partículas basadas en copolímeros de dimetilacrilamida reticulados con N,N'-bisacriloletilendiamina, incluyendo una cantidad conocida de N-terc-butoxicarbonil-beta-alanil-N'-acrilolhexametilendiamina. Por lo general se añaden varias moléculas espaciadoras por medio del grupo beta-alanilo, seguido posteriormente por las subunidades de restos de aminoácidos. Además, el monómero que contiene beta-alanilo puede sustituirse con un monómero de acrilolil sarcosina durante la polimerización para formar perlas de resina. La polimerización va seguida de reacción de las perlas con etilendiamina para formar partículas de resina que contienen aminas primarias como funcionalidad unida covalentemente. Los soportes basados en poli(acrilamida) son relativamente más hidrófilos que los soportes basados en poliestireno y se utilizan normalmente con disolventes apróticos polares que incluyen dimetilformamida, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona y similares (véase Atherton, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 6584, Bioorg. Chem. 1979, 8, 351, y J.C.S. Perkin 1538 (1981)).

15 Otros medios de soporte aplicables a la presente invención incluyen, sin limitación, un compuesto de una resina y otro material que es también sustancialmente inerte a las condiciones de reacción de síntesis orgánica empleadas. Un compuesto ejemplar (véase Scott, *et al.*, J. Chrom. Sci., 1971, 9, 577) utiliza partículas de vidrio recubiertas con un polímero de estireno reticulado hidrófobo que contiene grupos clorometilo reactivos, y es suministrado por Northgate Laboratories, Inc, de Hamden, Connecticut, EE.UU. Otro compuesto ejemplar contiene un núcleo de polímero de etileno fluorado sobre el que se ha injertado poliestireno (véase Kent y Merrifield, Israel J. Chem. 1978, 17, 243 y van Rietschoten en Peptides 1974, Y. Wolman, Ed., Wiley and Sons, Nueva York, 1975, págs. 113-116). Medios de soporte sólidos contiguos distintos de PEPS, tales como láminas de algodón (Lebl y Eichler, Peptide Res. 1989, 2, 232) y membranas de polipropileno recubiertas con hidroxipropilacrilato (Daniels, *et al.*, Tetrahedron Lett. 1989, 4345). Varillas de polietileno injertadas con ácido acrílico y placas de microtitulación de 96 pocillos para inmovilizar las cadenas peptídicas en crecimiento y para llevar a cabo la síntesis compartimentada. (Geysen, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1984, 81, 3998). Una "bolsa de té" que contiene las perlas de polímero utilizadas tradicionalmente. (Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1985, 82, 5131). El uso simultáneo de dos soportes diferentes con diferentes densidades (Tregear, Chemistry and Biology of Peptides, J. Meienhofer, ed., Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, 1972 págs. 175-178). La combinación de recipientes de reacción por medio de un colector (Gorman, Anal. Biochem., 1984, 136, 397). Síntesis en fase sólida en columnas múltiples (por ejemplo, Krchnak, *et al.*, Int. J Peptide Protein Res., 1989, 33, 209), y Holm y Meldal, en "Proceedings of the 20th European Peptide Symposium", G. Jung y E. Bayer, eds., Walter de Gruyter & Co., Berlín, 1989 págs. 208-210). Papel de celulosa (Eichler, *et al.*, Collect. Checa. Chem. Commun., 1989, 54, 1746). También se ha descrito la síntesis de péptidos mediada por soporte (véase, Synthetic Peptides: A User's Guide, Gregory A. Grant, Ed. Oxford University Press, 1992; US-A-4.415.732; 4.458.066; 4.500.707; 4.668.777; 4.973.679; 5.132.418; 4.725.677 y Re-34.069)

40 Debe entenderse que los compuestos de la presente invención se desvían del estado de la técnica en que resultan útiles en la síntesis química en fase sólida como restos de unión sin traza, es decir, no se transfieren átomos al producto de síntesis después de la escisión del conector sin traza. En una forma de realización preferente, los compuestos de la presente invención resultan especialmente útiles como resto de unión sin traza para la síntesis de oligonucleótidos en un medio de soporte sólido.

45 Los equipos disponibles en el mercado utilizados de manera rutinaria para la síntesis basada en medios de soporte de compuestos oligoméricos y compuestos relacionados son comercializados por varios proveedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Puede emplearse, además o de manera alternativa, cualquier otro medio para tal síntesis conocido en la técnica. Técnicas en fase sólida adecuadas, incluyendo las técnicas de síntesis automatizadas, se describen en F. Eckstein (ed.), Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, Oxford University Press, Nueva York (1991).

50 Los compuestos de la presente invención, que resultan especialmente útiles como resto de unión sin traza para la síntesis de oligonucleótidos en un medio de soporte sólido, son aplicables a las condiciones de síntesis convencionales basadas en amidita empleadas en los sintetizadores automatizados.

55 En el contexto de la presente invención, la expresión "empuje de reactivo" se refiere a un volumen de disolvente que está sustancialmente libre de cualquier compuesto activo (es decir, reactivo, activador, subproducto, u otra sustancia distinta del disolvente), volumen de disolvente que se introduce en la columna con el fin, y con el efecto, de empujar una solución de reactivo sobre y a través de la columna por delante de una solución de reactivo posterior. Un empuje de reactivo no necesita ser un volumen de columna completo, aunque en algunos casos puede incluir uno o más volúmenes de columna. En algunas formas de realización, un empuje de reactivo comprende al menos el volumen mínimo necesario para eliminar sustancialmente el reactivo, los subproductos y/o el activador de una sección transversal de la columna situada inmediatamente por delante de la parte frontal formada por la solución de reactivo utilizada para la etapa de síntesis inmediatamente posterior. Un compuesto activo, sea un reactivo, un subproducto o un activador, se considera sustancialmente eliminado si la concentración del compuesto en una sección transversal de la columna en la que se encuentra la parte frontal de la siguiente solución de reactivo, es suficientemente baja para no influir sustancialmente en la actividad de la siguiente solución de reactivo. El experto en la materia

reconocerá que este volumen de disolvente necesario para un "empuje de reactivo" variará dependiendo del disolvente, la solubilidad en el disolvente de los reactivos, los activadores, los subproductos, etc., que haya en la columna, las cantidades de reactivos, activadores, subproductos, etc. que se vayan a eliminar de la columna, etc. Se considera dentro del dominio del experto en la materia la selección de un volumen apropiado para cada empuje de reactivo, especialmente con la mirada puesta en los Ejemplos, que se presentan más adelante.

Tal como se utiliza en el presente documento, a menos que "lavado de columna" se modifique de otro modo, tiene el mismo significado que "empuje de reactivo". En algunas formas de realización de la invención, lavado de columna puede implicar que se permite pasar al menos un volumen de columna a través de la columna antes de aplicar a la columna la solución de reactivo posterior. Cuando se especifica un volumen de columna (CV) del lavado de columna, esto indica que para el lavado de columna se utiliza un volumen de disolvente equivalente al volumen interior de la columna sin empaquetar.

En el contexto de la presente invención, un disolvente de lavado es un disolvente que no contiene sustancialmente ningún compuesto activo que se aplique a una columna entre las etapas de síntesis. Una "etapa de lavado" es una etapa en la que se aplica a la columna un disolvente de lavado. Tanto "empuje de reactivo" como "lavado de columna" están incluidos dentro de esta definición de "etapa de lavado".

Un disolvente de lavado puede ser un compuesto químico puro o una mezcla de compuestos químicos, siendo el disolvente capaz de disolver un compuesto activo.

En algunos procesos divulgados en la presente un disolvente de lavado utilizado en una de las etapas de lavado puede comprender un porcentaje de acetonitrilo, que no supere el 50% v/v

La secuencia de las etapas de protección terminal y de oxidación puede invertirse, si se desea. Es decir, la protección terminal puede preceder o seguir a la oxidación. Además, con la selección de un reactivo de tación adecuado, las etapas de oxidación y protección terminal pueden combinarse en una sola etapa. Por ejemplo, se ha descubierto sorprendentemente que la protección terminal con anhídrido acético puede llevarse a cabo en presencia de bisulfuro de N,N'-dimetilditiuram.

Pueden utilizarse diversos disolventes en la reacción de oxidación. Los disolventes adecuados se identifican en las patentes de Caruthers *et al.* y Köster *et al.*, citada en el presente documento. La patente de Cole *et al.* describe el acetonitrilo como disolvente para el bisulfuro de fenilacetilo. Otros disolventes adecuados incluyen tolueno, xantenos, diclorometano, etc.

Los reactivos para escindir un oligonucleótido de un soporte se exponen, por ejemplo, en las patentes de Caruthers *et al.* y Köster *et al.*, como se cita en el presente documento. Se consideran buenas prácticas escindir el oligonucleótido que contiene nucleótidos de timidina (T) en presencia de una amina alquilada, tal como trietilamina, cuando el grupo protector de fósforo es $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, porque se sabe que esto evita la creación de nucleótidos de timidina cianoetilados (CNET). La evitación de aductos de CNET se describe en general en la patente de EE.UU. Nº 6.465.628, que se incorpora en el presente documento por referencia, y especialmente los Ejemplos en las columnas 20-30, que se incorporan específicamente por referencia. En otras formas de realización preferentes, se pueden eliminar los grupos protectores de fósforo en presencia de una amina alquilada, lo que elimina de manera eficaz el grupo protector en condiciones que no provocarán la formación de CNET (por ejemplo, temperatura ambiente). A continuación, esta etapa de desprotección de fósforo puede ir seguida de una etapa de lavado. A continuación, la etapa de desprotección de fósforo, o de lavado opcional, va seguida de la etapa de escisión, por ejemplo, eliminación de los grupos protectores de amina exocíclica (por ejemplo, grupos benzoilo y/o isobutirilo) y la escisión del oligonucleótido del soporte en condiciones convencionales (base fuerte y calor).

El oligonucleótido puede tratarse por procedimientos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo por cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alta resolución (por ejemplo, HPLC de fase inversa), precipitación diferencial, etc. En algunas formas de realización de acuerdo con la presente invención, el oligonucleótido se escinde de un medio de soporte sólido, mientras el grupo protector 5'-OH está todavía en el nucleósido final. A continuación, se somete este denominado oligonucleótido "DMT-on" (o "tritol-on") a cromatografía, después de lo cual el grupo DMT se elimina por tratamiento en un ácido orgánico, después de lo cual el oligonucleótido se desala y purifica adicionalmente para formar un producto final. Este procedimiento también funcionará bien cuando el grupo protector lábil en medio ácido sea pixilo o pixilo sustituido, ya que el oligonucleótido "pixil-on" está convenientemente separado de las secuencias "shortmer" (fallo) con protección terminal mediante HPLC de fase inversa.

Los grupos protectores 5'-hidroxilo pueden ser cualquier grupo que se elimine selectivamente en condiciones adecuadas. En concreto, el grupo 4,4'-dimetoxitriifenilmetilo (DMT) es un grupo favorecido para la protección en la posición 5', ya que se escinde fácilmente en condiciones ácidas (por ejemplo, en presencia de ácido dicloroacético (DCA), ácido tricloroacético (TCA), o ácido acético. La eliminación del DMT a partir del oligonucleótido unido al soporte se realiza generalmente con DCA (por ejemplo, de aproximadamente el 3 por ciento a aproximadamente el 10 de DCA (v/v) en un disolvente adecuado. La eliminación del oligonucleótido después de la escisión desde el

soporte se realiza generalmente con ácido acético. Cuando el grupo protector 5'-hidroxilo es pixilo o pixilo sustituido, pueden utilizarse un ácido con un pKa superior a la del DCA, ya que los grupos pixilo son generalmente lábiles a ácidos con pKa superior a la de los grupos tritilo. En algunas formas de realización, los grupos pixilo o pixilo sustituidos pueden eliminarse con ácido acético.

5 Como se describe en el presente documento, los oligonucleótidos pueden prepararse como quimeras con otros restos oligoméricos. En el contexto de la presente invención, la expresión "compuesto oligomérico" se refiere a una estructura polimérica capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucleico, y un "resto oligomérico" una porción de un compuesto oligomérico de este tipo. Los compuestos oligoméricos incluyen oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados y miméticos de oligonucleótidos. Los compuestos oligoméricos pueden ser lineales o circulares, y pueden incluir ramificaciones. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y cuando son bicatenarios, pueden incluir protuberancias. En general, un compuesto oligomérico comprende una cadena principal de subunidades monoméricas unidas en la que cada subunidad monomérica unida está fijada directa o indirectamente a un resto de base heterocíclica. Los enlaces que unen las subunidades monoméricas, las subunidades monoméricas y los restos de base heterocíclica pueden ser de estructura variable, lo que da lugar a una pluralidad de motivos para los compuestos oligoméricos resultantes, que incluyen hemímeros, "gapmers" y quimeras. Como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de base del nucleósido es normalmente un resto de base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleósido" se refiere a los nucleósidos que están unidos por enlaces internucleosídicos que no tienen átomos de fósforo. Los enlaces internucleosídicos 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. Estos enlaces internucleosídicos incluyen, pero no se limitan a, siloxano, sulfuro, sulfóxido, sulfona, acetilo, formacetilo, tioformacetilo, metileno, formacetilo, tioformacetilo, alquenilo, sulfamato; metilenimino, metilenhidrazino, sulfonato, sulfonamida, amida y otros que tienen partes componentes N, O, S y CH₂ mixtas.

Las fosforamiditas utilizadas en la síntesis de oligonucleótidos están disponibles en diversas fuentes comerciales (se incluyen: Glen Research, Sterling, Virginia; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, Nueva Jersey; Inc. Cruachem, Aston, Pensilvania; Chemgenes Corporation, Waltham, Massachusetts; Proligo LLC, Boulder, Colorado; PE Biosystems, Foster City, California; Beckman Coulter Inc., Fullerton, California). Estas fuentes comerciales comercializan fosforamiditas de alta pureza que generalmente tienen una pureza superior al 98%. Los que no ofrece una pureza general para todas las amiditas comercializadas incluirán en la mayoría de los casos un ensayo con cada lote adquirido que proporcione al menos la pureza de la fosforamidita concreta adquirida. Las fosforamiditas disponibles en el mercado están preparadas en su mayoría para la síntesis automatizada de ADN y, como tal, están preparadas para su uso inmediato para sintetizar las secuencias de oligonucleótidos deseadas. Las fosforamiditas pueden prepararse mediante los métodos descritos, por ejemplo, por Caruthers *et al.* (US 4.415.732; 4.458.066; 4.500.707; 4.668.777; 4.973.679; y 5.132.418) y Köster *et al.* (US RE 34.069).

40 Pueden fabricarse oligonucleótidos bicatenarios, tal como ARN bicatenario, de acuerdo con los métodos según la presente invención, tal como se describen en el presente documento. En el caso de la síntesis de ARN, es necesario proteger el grupo 2'-OH del reactivo de amidita con grupos protectores eliminables apropiados. Los grupos protectores adecuados para el 2'-OH se describen en las patentes de EE.UU. N^{os} 6.008.400, 6.111.086 y 5.889.136. Un grupo protector 2' especialmente adecuado para la síntesis de ARN es el grupo protector ACE como se describe en el documento US 6.111.086. En algunas formas de realización, se considera ventajoso utilizar un grupo protector 5' diferente para las amiditas utilizadas en la síntesis de ARN. En el documento US 6.008.400 se exponen grupos protectores en 5' adecuados. Un grupo protector 5' especialmente adecuado es el grupo trimetilsililoxi (TMSO) como se muestra en el documento US 6.008.400. Véase especialmente el ejemplo 1, las columnas 10-13. Las hebras separadas de los ARN bicatenarios pueden sintetizarse por separado y, a continuación hibridarse para formar el oligonucleótido bicatenario (dúplex).

Uso de los oligonucleótidos

55 Los compuestos antisentido preferentes ejemplares incluyen secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas desde el extremo 5' terminal de uno de los compuestos antisentido ilustrativos preferentes (siendo las restantes bases nitrogenadas un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente cadena arriba del extremo 5' terminal del compuesto antisentido que es capaz de hibridar específicamente con el ácido nucleico diana y que continua hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas). De forma similar, los compuestos antisentido preferentes están representados por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas desde el extremo 3' terminal de uno de los compuestos antisentido ilustrativos preferentes (siendo las restantes bases nitrogenadas un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente cadena abajo del extremo 3' terminal del compuesto antisentido que es capaz de hibridar específicamente con el ácido nucleico diana y que continua hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas). Un experto en la materia, una vez provisto de los compuestos antisentido preferentes derivados

empíricamente ilustrados en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar compuestos antisentido preferentes adicionales.

Los compuestos antisentido y otros compuestos de la invención, que hibridan con la diana e inhiben la expresión de la diana, se identifican a través de la experimentación, y las secuencias representativas de estos compuestos en el presente documento se identifican como formas de realización preferentes de la invención. Aunque en el presente documento se exponen secuencias específicas de los compuestos antisentido, un experto en la materia reconocerá que estas sirven para ilustrar y describir formas de realización concretas dentro del alcance de la presente invención. Un experto habitual puede identificar compuestos antisentido preferentes adicionales.

Los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferentes útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Como se define en la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de la presente memoria descriptiva, y como a veces se referencia en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos.

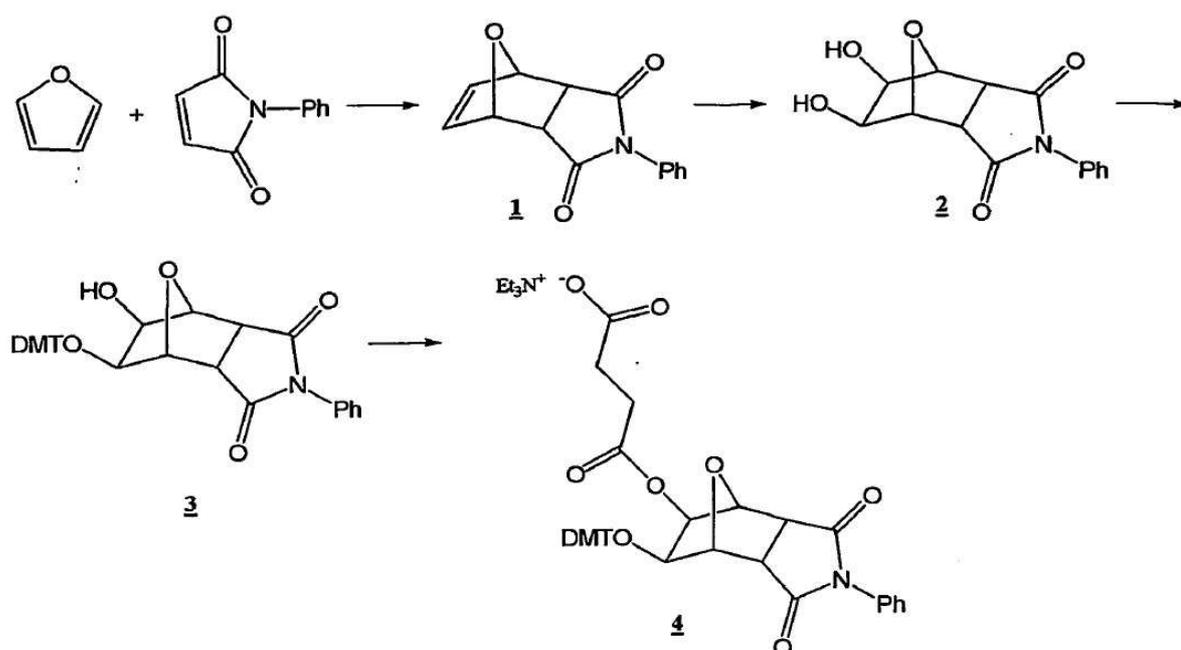
Antisentido dependiente de ARNasa H

Un método para inhibir la expresión génica específica implica utilizar oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos como agentes "antisentido". La tecnología antisentido implica dirigir oligonucleótidos, o análogos de los mismos, a una secuencia de ARN mensajero (ARNm) diana específica. La interacción de moléculas "antisentido" exógenas y ARNm endógeno modula la transcripción por diversas vías. Tales vías incluyen la detención de la transcripción, el reclutamiento de ARNasa H, y ARNi (por ejemplo ARNsi). La tecnología antisentido permite la modulación de la actividad de proteínas específicas de una manera relativamente predecible.

EJEMPLOS

La presente invención puede entenderse adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos no limitativos, que pueden llevarse a cabo mediante los métodos descritos en general anteriormente en el presente documento.

ESQUEMA 1



Experimento 1: reacción de Diels-Alder entre furano y N-fenilmaleimida para dar el aducto **1**: se recogió N-fenil maleimida (500 g; 2,887 moles) en acetonitrilo (1.600 ml) y se añadió furano (500 ml) y se calentó a reflujo utilizando un manta calefactora y un condensador de refrigeración por agua helada en un matraz de tres bocas de fondo

redondo de 5 l provisto de agitación magnética. Después de calentar a reflujo durante 5 horas, se analizó la mezcla de reacción por HPLC para verificar la ausencia de material de partida (a saber, N-fenil maleimida). A continuación, se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente cuando precipitó un sólido incoloro. El material se filtró, se lavó con acetonitrilo (500 ml). La solución de filtrado se concentró para proporcionar más producto que también se filtró y se lavó con acetonitrilo (300 ml). El sólido **1** se secó a alto vacío a temperatura ambiente durante la noche. Rendimiento: 541 g (78%). ¹H RMN (DMSO-d₆): 3,055 (s, 2H), 5,223 (s, 2H), 6,580 (s, 2H), 7-18-7,58 (m, 5H).

Experimento 2: solución de catalizador de tetróxido de osmio: Se disolvió el contenido de un vial sellado de 1 g de tetróxido de osmio en 200 ml de alcohol t-butílico purificado. Se trató la solución de color verde pálido con 3-5 gotas de peróxido de hidrógeno al 30% y se dejó permanecer a temperatura ambiente durante 1 día. Si la solución se volvía oscura, se repetía la adición gota a gota de peróxido de hidrógeno al 30% hasta que persistía el color verde pálido. Esta solución es estable durante al menos un año a temperatura ambiente. Cada ml contiene 2×10^{-5} moles de tetróxido de osmio.

Experimento 3: cis-dihidroilación de aducto de Diels-Alder para dar diol **2**: Se recogió la olefina **1** obtenida a partir de la reacción de Diels-Alder anteriormente indicada (225 g, 0,934 moles) en un matraz de tres bocas de 5 l equipado con un agitador mecánico, un condensador de reflujo con enfriamiento por agua helada y una manta calefactora. Se añadió acetona (2.500 ml) y se agitó. Se añadió una solución de peróxido de hidrógeno al 30% (500 ml), seguido de una solución de tetróxido de osmio preparada anteriormente (180 ml). Advertencia: ¡para escalas mayores la reacción podría ser exotérmica! Se recomienda la adición lenta (1-2 horas) de la solución de tetróxido de osmio. Se mantuvo la mezcla de reacción a reflujo suave con agitación durante 7-8 horas. Durante el período, el color de la reacción cambió de marrón a marrón pálido a incoloro y comenzó a precipitar un sólido. Se mantuvo la agitación vigorosa durante todo el período. Se analizó la mezcla de reacción por HPLC para verificar la ausencia de material de partida. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El sólido **2** se lavó con éter (2.000 ml) y se secó en horno de vacío a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la solución de filtrado de acetona y se añadió éter (1.000 ml) cuando precipitó un sólido que se filtró, se lavó con éter (300 ml) y se secó a 45°C o dos días. Rendimiento de **2** = 179 g (primera cosecha) 5 g + 32 g (segunda cosecha) = 211 g (82%). ¹H RMN (DMSO-d₆): 3,14 (s, 2H), 3,88 (d, 2H), 4,39 (s, 2H), 5,1 (d, 2H), 7-18-7.58 (m, 5H).

Experimento 4: Mono-protección de diol con cloruro de DMT para formar **3**: Se recogió el compuesto dihidroxi **3** (FW 275; 275 g; 1 mol) en un matraz de fondo redondo de 5 l y se co-evaporó con piridina anhidra (1.200 ml). Esta etapa se repitió una vez más para hacer que el diol fuese anhidro. Se añadió piridina (3.000 ml) y se agitó mediante agitador magnético a temperatura ambiente. Se añadió lentamente cloruro de dimetoxitriilo (FW 338,82; 508,2 g, 1,5 equivalentes) como sólido durante un período de 2 horas. Se agitó la solución durante la noche. La CCF indicó la práctica desaparición del material de partida. Todas las sustancias volátiles se eliminaron al vacío utilizando un rotavapor. Se añadió tolueno (2.000 ml) y se sometió a rotavapor. Esta etapa se repitió una vez más. El material bruto restante se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice utilizando hexano, acetato de etilo-hexano al 20%, a continuación acetato de etilo-hexano al 40% y finalmente acetato de etilo al 100%. Se utilizó trietilamina al 1% durante toda la purificación. Rendimiento de **3**: 398 g (71%).

Experimento 5: Succinilación del compuesto protegido con DMT **3**: se disolvió compuesto hidroxil protegido con DMT **3** (FW 578; 49,13 g; 85 mmoles) en una mezcla de acetato de etilo:cloruro de metileno (600:66 = 666 ml). Se añadió trietilamina (FW 101,19; 51,61 g; 71 ml; 0,51 moles; 6 equivalentes con respecto al compuesto de DMT de partida) y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente. A esta solución transparente se añadió, de una sola vez, anhídrido succínico (FW 100,07; 34,02 g; 0,34 moles, 4 equivalentes con respecto al compuesto de DMT de partida) como sólido. Se continuó la agitación durante la noche. La CCF indicó la desaparición del material de partida. Si se observa material de partida, se añade más anhídrido succínico hasta la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (300 ml) y se lavó con agua (2 x 200 ml), salmuera (120 ml) y se secó con sulfato de magnesio. Si el producto tiene color, el material se pasa a través de un lecho corto de gel de sílice eluyendo con cloruro de metileno y a continuación metanol al 5%:cloruro de metileno al 95% para proporcionar el producto como un producto incoloro. Rendimiento de **4**: 60,5 g (91%).

Experimento 6: Síntesis de alcohol de pixilo sustituido: A una mezcla agitada de 4',4'-dimetildifeniléter (200 g, 1,01 moles), ácido p-metilbenzoico (154 g; 1,13 moles) y cloruro de zinc anhidro (400 g; 2,94 moles) se añadió lentamente tricloruro de fosforoxi (300 ml; 3,27 moles) mediante un embudo de adición. A continuación se calentó lentamente la mezcla de reacción a 95°C cuando se inició la reacción y se monitorizó mediante CCF. Después de finalizada reacción, se añadió lentamente acetato de etilo (500 ml), seguido de agua (200 ml). Se añadió, a una velocidad mayor, una cantidad adicional de agua (2500 ml). Se agitó durante la noche a temperatura ambiente cuando aparece el sólido. Se filtró y se recristalizó en metanol para proporcionar el producto alcohol de pixilo sustituido.

Experimento 7: Síntesis de cloruro de pixilo sustituido: A una solución agitada de alcohol de pixilo sustituido (310 g; 0,982 moles) en diclorometano (1.000 ml) se añadió lentamente cloruro de tionilo (102 ml; 1,1 moles) con enfriamiento. La reacción se monitorizó mediante CCF. Cuando finalizó, se concentró la reacción, se añadió tolueno seguido de hexano para proporcionar el producto deseado en forma de sólido incoloro.

5 Experimento 8: Mono-protección de diol **2** con cloruro de pixilo sustituido para formar el análogo de pixilo sustituido de **3** (**3'**): Se recogió el compuesto dihidroxi (FW 275; 0,1 moles) en un matraz de fondo redondo y se co-evaporó con piridina anhidra. Esta etapa se repitió una vez más para hacer que el diol fuese anhidro. Se añadió piridina (200 ml) y se agitó mediante agitador magnético a temperatura ambiente. Se añadió lentamente cloruro de pixilo sustituido con trimetilo (1,5 equivalentes) como sólido durante un periodo de 30 minutos. Se agitó la solución durante la noche. La CCF indicó la práctica desaparición del material de partida. Todas las sustancias volátiles se eliminaron al vacío utilizando un rotavapor. Se añadió tolueno y se sometió a rotavapor. Esta etapa se repitió una vez más. El material bruto restante se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice utilizando hexano, acetato de etilo-hexano al 20%, a continuación acetato de etilo-hexano al 40% y finalmente acetato de etilo al 100%. Se utilizó trietilamina al 1% durante toda la purificación. Se obtuvo el producto **3'** como un sólido incoloro.

15 Experimento 9: Succinilación del compuesto protegido con pixilo sustituido **3'** para formar el análogo de pixilo sustituido de **4** (**4'**): se disolvió el compuesto hidroxilado protegido con pixilo sustituido **3'** (85 mmoles) en una mezcla de acetato de etilo:cloruro de metileno (600:66 = 666 ml). Se añadió trietilamina (FW 101,19; 51,61 g; 71 ml; 0,51 moles; 6 equivalentes con respecto al compuesto de partida) y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente. A esta solución transparente se añadió, de una sola vez, anhídrido succínico (FW 100,07; 34,02 g; 0,34 moles, 4 equivalentes con respecto al compuesto de partida) como sólido. Se continuó la agitación durante la noche. La CCF indicó la desaparición del material de partida. Si se observa material de partida, se añade más de anhídrido succínico hasta la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (300 ml) y se lavó con agua (2 x 200 ml), salmuera (120 ml) y se secó con sulfato de magnesio. Si el producto tiene color, el material se pasa a través de un lecho corto de gel de sílice eluyendo con cloruro de metileno y a continuación metanol al 5%:cloruro de metileno al 95% para proporcionar el producto como un producto incoloro. Rendimiento de **4'**: 93%.

20 Experimento 10: Carga de succinato protegido con DMT **4** a vidrio de poro controlado: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 40 micromoles/gramo.

25 Experimento 11: Carga de succinato protegido con pixilo sustituido **4'** a vidrio de poro controlado: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 38 micromoles/gramo.

30 Experimento 12: Carga de succinato protegido con DMT **4** a soporte Primer amino-derivatizado HL30: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 90 micromoles/gramo.

35 Experimento 13: Carga de succinato protegido con pixilo sustituido **4'** a soporte Primer amino-derivatizado HL30: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 93 micromoles/gramo.

40 Experimento 14: Carga de succinato protegido con DMT **4** a OligoPrep: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 244 micromoles/gramo.

45 Experimento 15: Carga de succinato protegido con pixilo sustituido de **4'** a OligoPrep: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 253 micromoles/gramo.

50 Experimento 16: Carga de succinato protegido con DMT **4** a soporte sólido Nittomar 250: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 240 micromoles/gramo.

55 Experimento 17: Carga de succinato protegido con pixilo sustituido **4'** a soporte sólido Nittomar 250: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de

Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 250 micromoles/gramo.

5 Experimento 18: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

15 Experimento 19: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4':

La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

25 Experimento 20: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

35 Experimento 21: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

45 Experimento 22: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

50 Experimento 23: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

60 Experimento 24: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

65

- 5 Experimento 25: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 10 Experimento 26: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 15 Experimento 27: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 175 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 20 Experimento 28: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 25 Experimento 29: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 181 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 30 Experimento 30: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 35 Experimento 31: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 179 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 40 Experimento 32: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10%
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

(volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

5 Experimento 33: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 169 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10%
10 (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

15 Experimento 34: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de
20 fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

25 Experimento 35: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 175 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de
30 fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

35 Experimento 36: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

40 Experimento 37: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 181 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

45 Experimento 38: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10%
50 (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

55 Experimento 39: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero utilizando **4'**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 179 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10%
60 (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se
65 purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

5 Experimento 40: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

15 Experimento 41: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 169 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

25 Experimento 42: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

30 Experimento 43: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 175 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

40 Experimento 44: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

50 Experimento 45: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 181 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

60 Experimento 46: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

65

- 5 Experimento 47: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 179 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 10 Experimento 48: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 15 Experimento 49: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 169 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 20 Experimento 50: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 25 Experimento 51: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 30 Experimento 52: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 35 Experimento 53: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 40 Experimento 54: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)-3' 18-mero diéster de fosfato utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 55: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)-3' 18-mero diéster de fosfato utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 56: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' 20-mero diéster de fosfato utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 57: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' 20-mero diéster de fosfato utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 58: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

Experimento 59: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 175 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

Experimento 60: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

Experimento 61: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 181 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando

una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

5

Experimento 62: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-][2'-O-metoxietil-(AATT)-3' 18-mero diéster de fosfato utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

10

Experimento 63: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-][2'-O-metoxietil-(AATT)-3' 18-mero diéster de fosfato utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 179 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

15

20

Experimento 64: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-][2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' 20-mero diéster de fosfato utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

25

30

Experimento 65: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-][2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' 20-mero diéster de fosfato utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 169 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

35

40

Experimento 66: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-][2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

45

50

Experimento 67: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-][2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 175 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

55

Experimento 68: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-][2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C

60

65

durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

5 Experimento 69: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-][2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 181 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la
10 síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

15 Experimento 70: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-][2'-O-metoxietil-(AATT)-3' 18-mero diéster de fosfato utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se
20 lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

25 Experimento 71: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-][2'-O-metoxietil-(AATT)-3' 18-mero diéster de fosfato utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 179 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se
30 lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

35 Experimento 72: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-][2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' 20-mero diéster de fosfato utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se
40 lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

45 Experimento 73: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-][2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' 20-mero diéster de fosfato utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 169 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se
50 lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

55 Experimento 74: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-][2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una
60 solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

65 Experimento 75: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-][2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado utilizando 4': La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 175 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destitilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

5 Experimento 76: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

15 Experimento 77: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 181 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

25 Experimento 78: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)]-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)]-3' 18-mero diéster de fosfato utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

30 Experimento 79: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)]-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)]-3' 18-mero diéster de fosfato utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 179 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

35 Experimento 80: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' 20-mero diéster de fosfato utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

40 Experimento 81: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' 20-mero diéster de fosfato utilizando **4**: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 169 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 250 anteriormente preparado. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

50 Experimento 82: Reacción del compuesto protegido con DMT **3** con anhídrido sebácico: se disolvió el compuesto hidroxilado protegido con DMT 3 (FW 578; 49,13 g; 85 mmoles) en una mezcla de acetato de etilo:cloruro de metileno (600: 66 = 666 ml). Se añadió trietilamina (FW 101,19; 51,61 g; 71 ml; 0,51 moles; 6 equivalentes con respecto al compuesto de DMT de partida) y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente. A esta solución transparente, se añadió de una sola vez anhídrido sebácico (0,34 moles, 4 equivalentes con respecto al compuesto de DMT de partida) como sólido. Se continuó la agitación durante la noche. La CCF indicó la desaparición del material de partida. Si se observa material de partida, se añade más de anhídrido succínico hasta la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (300 ml) y se lavó con agua (2 x 200 ml), salmuera (120 ml) y se secó con sulfato de magnesio. Si el producto tiene color, el material se pasa a través de un lecho corto de gel de

sílice eluyendo con cloruro de metileno y a continuación metanol al 5%:cloruro de metileno al 95% para proporcionar el producto como un producto incoloro. Rendimiento de 4a: 60,5 g (91%).

5 Experimento 83: Carga de sebacato protegido con DMT **4a** a vidrio de poro controlado: La carga de la molécula de sebacato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 40 micromoles/gramo.

10 Experimento 84: Carga de sebacato protegido con DMT **4a** a soporte Primer amino-derivativado HL30: La carga de la molécula de sebacato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 90 micromoles/gramo.

15 Experimento 85: Carga de succinato protegido con DMT **4a** a OligoPrep: La carga de la molécula de succinato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 244 micromoles/gramo.

20 Experimento 86: Carga de sebacato protegido con DMT **4a** a soporte sólido Nittomar 200: La carga de la molécula de sebacato se realizó de forma similar al nucleósido-succinato utilizando HBTU como activador y base de Hünig en acetonitrilo como disolvente. Los sitios sin reaccionar se protegieron terminalmente con anhídrido acético en piridina en presencia de DMAP como catalizador. A continuación se comprobó la carga utilizando el método de UV convencional. Carga = 200 micromoles/gramo.

25 Experimento 87: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosfortioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado derivativado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosfortioato deseado.

30 Experimento 88: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosfortioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado derivativado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosfortioato deseado.

35 Experimento 89: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado derivativado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

40 Experimento 90: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado derivativado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

45 Experimento 91: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosfortioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado derivativado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de

bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

5 Experimento 92: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

15 Experimento 93: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

25 Experimento 94: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

35 Experimento 95: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

40 Experimento 96: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

50 Experimento 97: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

60 Experimento 98: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

65

- 5 Experimento 99: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 200 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 10 Experimento 100: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 200 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 15 Experimento 101: Síntesis de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3' ADN 20-mero: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 200 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 20 Experimento 102: Síntesis de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' ADN 20-mero: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 200 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 25 Experimento 103: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)]-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)]-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 30 Experimento 104: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.
- 35 Experimento 105: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)]-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)]-3' 18-mero diéster de fosfato: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se llevó a cabo en un sintetizador de ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.
- 40 Experimento 106: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' 20-mero diéster de fosfato: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se llevó a cabo en un sintetizador de
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ADN/ARN ABI 390Z a una escala de 15 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido CPG anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 3% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina según lo recomendado por el protocolo del manual ABI. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 107: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)]-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)]-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

Experimento 108: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

Experimento 109: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)]-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)]-3' 18-mero diéster de fosfato: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 110: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' 20-mero diéster de fosfato: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Primer HL30 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 111: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)]-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)]-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

Experimento 112: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)]-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)]-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destrilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

Experimento 113: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)]-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)]-3' 18-mero diéster de fosfato: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el

soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 114: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' 20-mero diéster de fosfato: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido OligoPrep anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 115: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)-3' fosforotioato 18-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 172 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 200 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

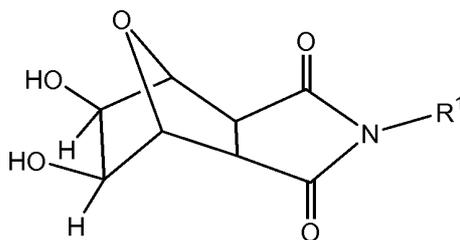
Experimento 116: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' fosforotioato 20-mero totalmente modificado: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 178 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 200 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La sulfurización se realizó utilizando una solución 0,2 M de bisulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido de fosforotioato deseado.

Experimento 117: Síntesis de 5'-[2'-O-metoxietil-(TGTG)-d(CTA-TTC-TGT-G)-[2'-O-metoxietil-(AATT)-3' 18-mero diéster de fosfato: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 184 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 200 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Experimento 118: Síntesis de 5'-(2'-O-metoxietil-(GCCTC)-d(AGT-CTG-CTT-C)-[2'-O-metoxietil-(GCACC)-3' 20-mero diéster de fosfato: La síntesis de la secuencia anteriormente indicada se realizó en un sintetizador de ADN/ARN Akta OligoPilot de Amersham Biosciences a una escala de 180 micromoles utilizando fosforamiditas de cianoetilo y el soporte sólido Nittomar 200 anteriormente preparado derivatizado con **4a**. La destritilación se realizó utilizando ácido dicloroacético en tolueno al 10% (volumen/volumen). La oxidación se realizó utilizando una solución de yodo en THF/agua/piridina como se recomienda en el protocolo del manual del equipo. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió utilizando hidróxido de amonio a 55°C durante 12 horas. El oligo bruto se purificó de la manera habitual para proporcionar el oligonucleótido deseado.

Realizaciones adicionalmente enumeradas:

30. Un compuesto de la fórmula:



en el que R¹ es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en el que R¹ está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes.

- 5 31. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ está sustituido adicionalmente con de 1 a 5 sustituyentes.
32. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es arilo, que está opcionalmente sustituido adicionalmente.
- 10 33. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es fenilo o naftilo, que está opcionalmente sustituido adicionalmente.
34. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es fenilo o naftilo, que esta insustituido o sustituido con de 1 a alrededor de 5 miembros del grupo consistente de F, Cl, Br, I, NO₂, alquilo C₁-C₁₂ o CF₃.
- 15 35. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es fenilo o naftilo, que está insustituido.
36. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es heterociclilo, y R¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente.
- 20 37. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es piridilo, pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolina, quinazolina, quinoxalinilo, furanilo, tiofenilo, tiazolilo, pirrolilo o imidazolilo y R¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente.
38. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es piridilo, furanilo o tiofenilo y R¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente.
- 25 39. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es piridilo, furanilo o tiofenilo y R¹ no está sustituido adicionalmente.
- 30 40. El compuesto de la realización 30, en el que R¹ es N-alquil-morfolinilo, N-alquil-piperidinilo o N,N'-dialquilpiperazinilo, y R¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
- 35 <120> DERIVADOS DE 5,6 DIHIDROXI ISOINDOL COMO CONECTORES PARA LA SÍNTESIS DE OLIGÓMEROS EN FASE SÓLIDA
- <130> P057633EP
- 40 <150> EP04811142.1
<151> 2004-11-15
- 45 <150> 60/520,179
<151> 2003-11-13
- <150> 60/530,477
<151> 2003-12-16
- 50 <150> 60/564,649
<151> 2004-04-21
- <160> 4
- 55 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
<223> Oligonucleotido Sintético
- 65 <400> 1
tccgcctgt gacatgcatt 20

5
<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleotido Sintético

10
<400> 2
gcccaagctg gcatcgtca 20

<210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15
<220>
<223> Oligonucleotido Sintético

20
<400> 3
tgtgctattc tgtgaatt 18

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25
<220>
<223> Oligonucleotido Sintético

30
<400> 4
gcctcagtct gcttcgacc 20

35

40

45

50

55

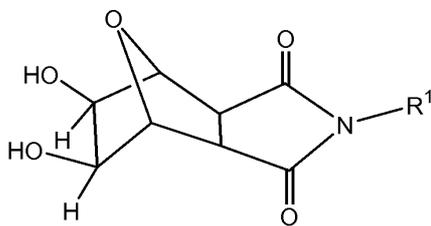
60

65

Reivindicaciones

1. Un compuesto de la fórmula:

5

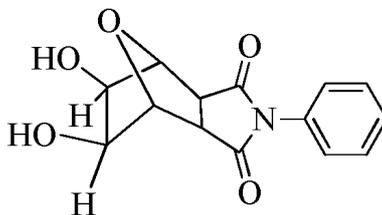


10

15 en la que R¹ es arilo, cicloalquilo, cicloalquilo insaturado, alquilo, alquilo insaturado, heterociclilo, heterociclilo insaturado, heteroarilo o acilo, en la que R¹ está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes.

2. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

20



25

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ está sustituido adicionalmente con de 1 a 5 sustituyentes.

30

4. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que R¹ es arilo, que está opcionalmente sustituido adicionalmente.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3-4, en el que R¹ es fenilo o naftilo, que está opcionalmente sustituido adicionalmente.

35

6. El compuestos de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3-4, en el que R¹ es fenilo o naftilo, que está insustituido o sustituido con de 1 a alrededor de 5 miembros del grupo consistente de F, Cl, Br, I, NO₂, alquilo C₁-C₁₂ o CF₃.

7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3-5, en el que R¹ es fenilo o naftilo, que está insustituido.

40

8. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que R¹ es heterociclilo, y R¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente.

9. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que R¹ es piridilo, pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolina, quinazolina, quinoxalinilo, furanilo, tiofenilo, tiazolilo, pirrolilo o imidazolilo y R¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente.

45

10. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que R¹ es piridilo, furanilo o tiofenilo y R¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente.

50

11. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3 en el que R¹ es piridilo, furanilo o tiofenilo y R¹ no está sustituido adicionalmente.

12. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3 en el que R¹ es N-alquil-morfolinilo, N-alquil-piperidinilo o N,N'-dialquilpiperazinilo, y R¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente.

55

60

65