

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 211**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/06** (2006.01)

**C07H 19/16** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**C07D 493/08** (2006.01)

**A61K 31/7064** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.1998 E 10011863 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2361921**

54 Título: **Análogos de biciclo-oligonucleótidos**

30 Prioridad:

**07.03.1997 JP 5340997**

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

**09.09.2015**

73 Titular/es:

**EXIQON A/S (50.0%)**

**Skelstedet 16**

**2950 Vedbæk, DK y**

**ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN**

**A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**IMANISHI, TAKESHI y**

**OBIKA, SATOSHI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 545 211 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Análogos de biciclo-oligonucleótidos

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a un nuevo análogo de nucleótido y más particularmente, a un análogo de nucleótido adecuado como molécula no codificante.

**Antecedentes de la invención**

10 En 1978 se describió por primera vez que una molécula complementaria no codificante inhibía la infección por el virus de la gripe. Desde entonces, se han publicado trabajos acerca de moléculas no codificantes que inhibían la expresión de oncogenes e infección por SIDA. En los últimos años, los oligonucleótidos no codificantes se han convertido en uno de los fármacos más prometedores, porque controlan específicamente la expresión de genes indeseables.

El método no codificante se basa en la idea de controlar un flujo unidireccional denominado el dogma central, es decir, DNA → RNA → proteína, mediante el uso de un oligonucleótido no codificante.

15 Cuando se aplicaba un oligonucleótido existente en la naturaleza a este método como molécula no codificante, sin embargo, se descomponía con varias nucleasas *in vivo*, o su permeación a través de la membrana celular no era elevada. Para resolver estos problemas, se han sintetizado numerosos derivados de ácidos nucleicos y análogos, y se ha procedido a su estudio. Ejemplos de los productos sintetizados incluyen un fosforotioato que tiene un átomo de azufre sustituyendo a un átomo de oxígeno sobre el átomo de fósforo, y un metil-fosfonato que tiene un grupo metilo sustituyendo. Recientemente, se han sintetizado productos en los que el átomo de fósforo se ha sustituido también por un átomo de carbono, o la estructura del resto azúcar se ha cambiado o la base del ácido nucleico se ha modificado. Sin embargo, ningún derivado o análogo resultante ha resultado totalmente satisfactorio en términos de estabilidad *in vivo*, facilidad de síntesis y especificidad de secuencia (la propiedad de controlar selectivamente la expresión de un gen particular único).

25 Obika et al. ("Properties of Novel Oligonucleotide Analogues Containing an Acyclic Nucleoside and a Carbamate Linkage", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(12) (1996) págs.1357-1360), describe heterodímeros que contienen un nucleosido acíclico y una unión carbamato en posición 3' incorporada en oligonucleótidos. Se estudiaron las temperaturas de fusión de dúplex DNA-DNA y DNA-RNA, así como la resistencia a la nucleasa de los oligonucleótidos modificados.

30 En estas circunstancias, ha existido una demanda para la creación de una molécula no codificante que sea descompuesta mínimamente con una nucleasa *in vivo*, se una al RNA mensajero con elevada afinidad, tenga elevada especificidad, y pueda controlar así eficientemente la expresión de un gen particular.

**Descripción de la invención**

35 Los inventores de la presente invención diseñaron un análogo de ácido nucleico con conformación inmovilizada de la porción de azúcar en un ácido nucleico, que sería útil en el método no codificante. Sintetizaron un análogo de nucleósido que sería una estructura unitaria para el mismo, y confirmaron que un análogo de oligonucleótido preparado utilizando el mismo era muy útil como molécula no codificante.

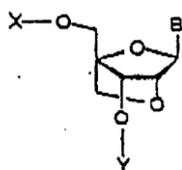
**Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1 es un gráfico que muestra la evolución en el tiempo de la absorción ultravioleta (260 nm) de un oligonucleótido natural descompuesto con una exonucleasa; y

40 Fig. 2 es un gráfico que muestra la evolución en el tiempo de la absorción ultravioleta (260 nm) de un oligonucleótido de la presente invención (x2) descompuesto con una exonucleasa.

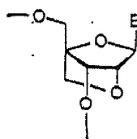
A continuación se describirán detalles de la presente invención.

La estructura de un análogo de nucleósido comprendido en un oligonucleótido o análogo de polinucleótido según la presente invención es un análogo de nucleósido de la siguiente fórmula general (I)



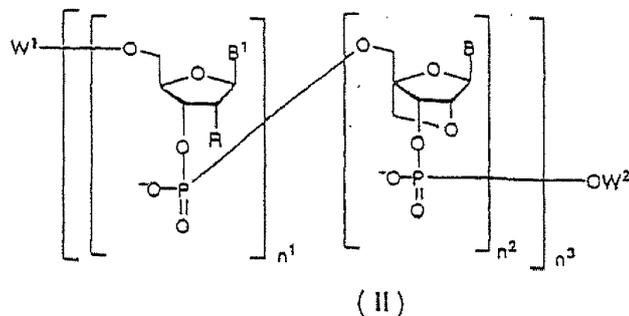
(I)

- 5 en la que B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, o uno de sus análogos, y X e Y son idénticos o diferentes, y representan cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo aralquilo, seleccionado entre bencilo y 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo arilo, un grupo acilo o un grupo sililo,
- o uno de sus derivados amidita.
- 10 El grupo alquilo representa un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada con 1 a 20 átomos de carbono. Sus ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, t-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo.
- El grupo alquenilo representa un grupo alquenilo de cadena recta o ramificada con 2 a 20 átomos de carbono. Sus ejemplos incluyen vinilo, alilo, butenilo, pentenilo, geranilo y farnesilo.
- El grupo alquinilo representa un grupo alquinilo de cadena recta o ramificada con 2 a 20 átomos de carbono. Sus ejemplos incluyen etinilo, propinilo y butinilo.
- 15 El grupo cicloalquilo representa un grupo cicloalquilo con 3 a 8 átomos de carbono e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y ciclooctilo. Otro ejemplo es un grupo heterocíclico en el que uno o más grupos metileno arbitrarios en el anillo del grupo cicloalquilo se han sustituido por un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un átomo de nitrógeno sustituido con alquilo. Es, por ejemplo, un grupo tetrahidropiraniilo.
- 20 El grupo arilo se refiere a un sustituyente monovalente formado eliminando un átomo de hidrógeno de un grupo hidrocarbonado aromático, e incluye, por ejemplo, fenilo, toliilo, xililo, bifenilo, naftilo, antrilo y fenantrilo. El átomo de carbono en el anillo del grupo arilo se puede sustituir por uno o más entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo amino, un grupo nitro y un grupo trifluorometilo. El sustituyente, en este caso, es, por ejemplo, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo alcoxi o un grupo arilo.
- 25 El grupo amino no tiene que estar sustituido, pero cuando está sustituido incluye, por ejemplo, alquilamino, arilamino y acilamino. Ejemplos del grupo alcoxi son metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, i-butoxi, s-butoxi, t-butoxi, pentiloxi, hexiloxi, y fenoxi. Ejemplos del átomo de halógeno son flúor, cloro, bromo y yodo.
- 30 El grupo aralquilo se selecciona entre bencilo y 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr). Se prefiere particularmente un grupo DMTr.
- Como grupo acilo, se pueden ejemplificar acetilo, formilo, propionilo, benzoilo y benciloxicarbonilo. Un ejemplo del grupo sililo es un grupo trialquilsililo, preferiblemente trimetil-sililo, trietil-sililo, triisopropil-sililo, t-butil-dimetil-sililo o t-butil-difenil-sililo y, más preferiblemente, trimetil-sililo.
- 35 El análogo de nucleótido de la presente invención es un análogo de oligonucleótido o de polinucleótido que tiene una o más estructuras de fórmula general (Ia)



(Ia)

donde B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, o un análogo de las mismas,  
o un análogo de oligonucleótido o polinucleótido de fórmula general (II)



5

donde B<sup>1</sup> y B son idénticos o diferentes, y cada uno representa una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, o un análogo de las mismas, R es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno o un grupo alcoxi, W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son idénticos o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo aralquilo seleccionado entre bencilo y 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo arilo, un grupo acilo, un grupo sililo, un residuo de ácido fosfórico, un nucleósido natural un nucleósido sintético unido mediante un enlace fosfodiéster, o un oligonucleótido o polinucleótido que contiene el nucleósido, n<sup>1</sup> o n<sup>2</sup> son idénticos o diferentes, y cada uno denota un número entero de 0 a 50, siempre que n<sup>1</sup> o n<sup>2</sup> no sean cero al mismo tiempo, y que no todos los n<sup>2</sup> sean cero al mismo tiempo, n<sup>3</sup> denota un número entero de 1 a 50, siempre que cuando n<sup>1</sup> y/o n<sup>2</sup> sean/sea 2 o más, no es necesario que B<sup>1</sup> y B sean idénticos, y no es necesario que los R sean idénticos.

10

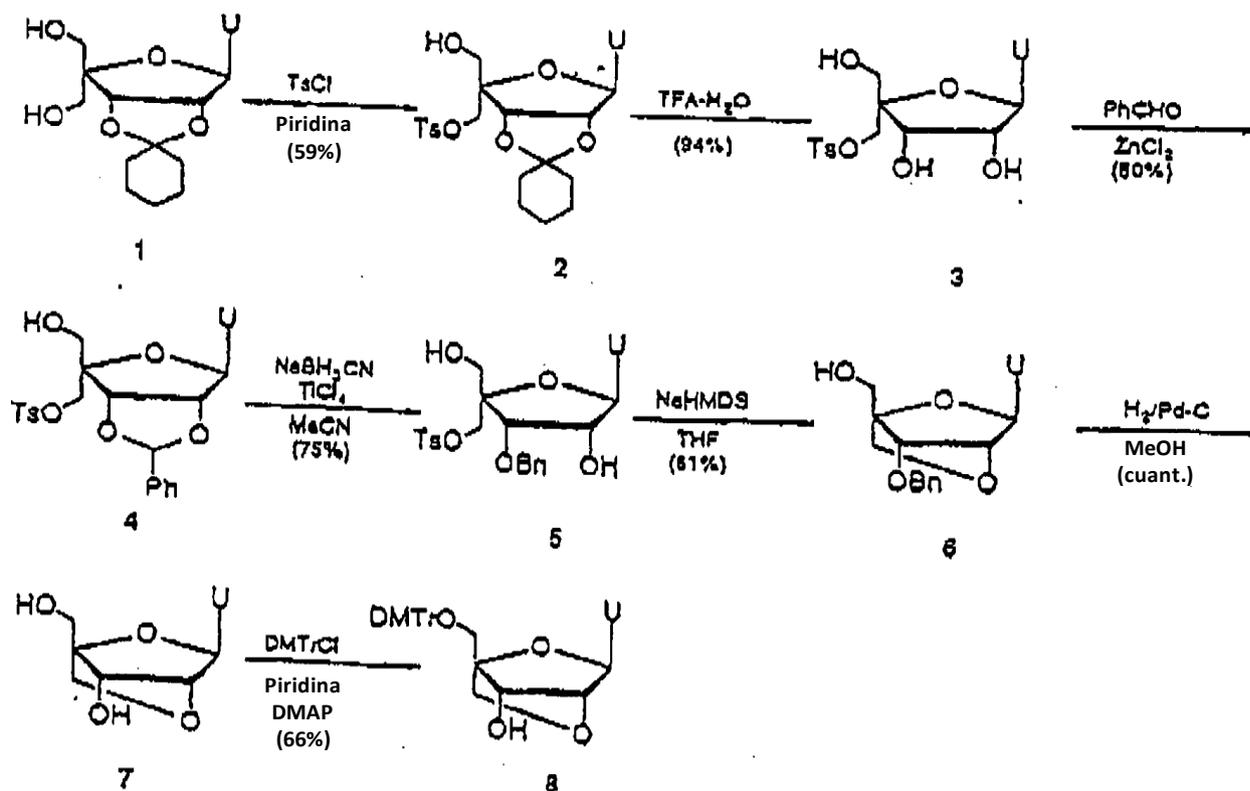
15

La base de ácido nucleico de pirimidina o purina en la presente invención se refiere a timina, uracilo, citosina, adenina, guanina o uno de sus derivados.

El análogo de nucleótido de la presente invención se puede sintetizar de la manera descrita a continuación.

(1) Síntesis del análogo de nucleósido

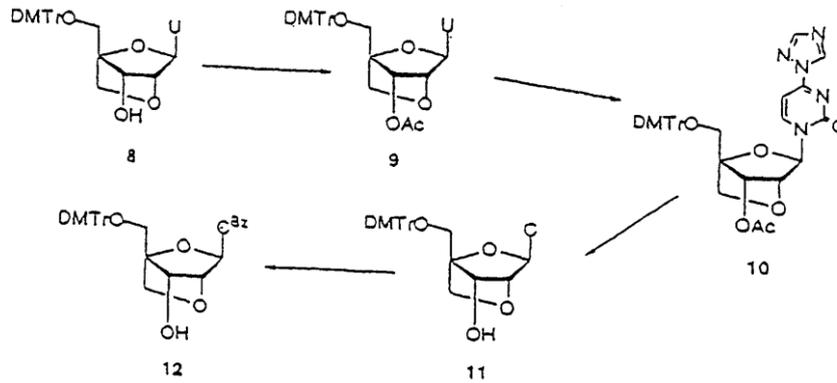
20



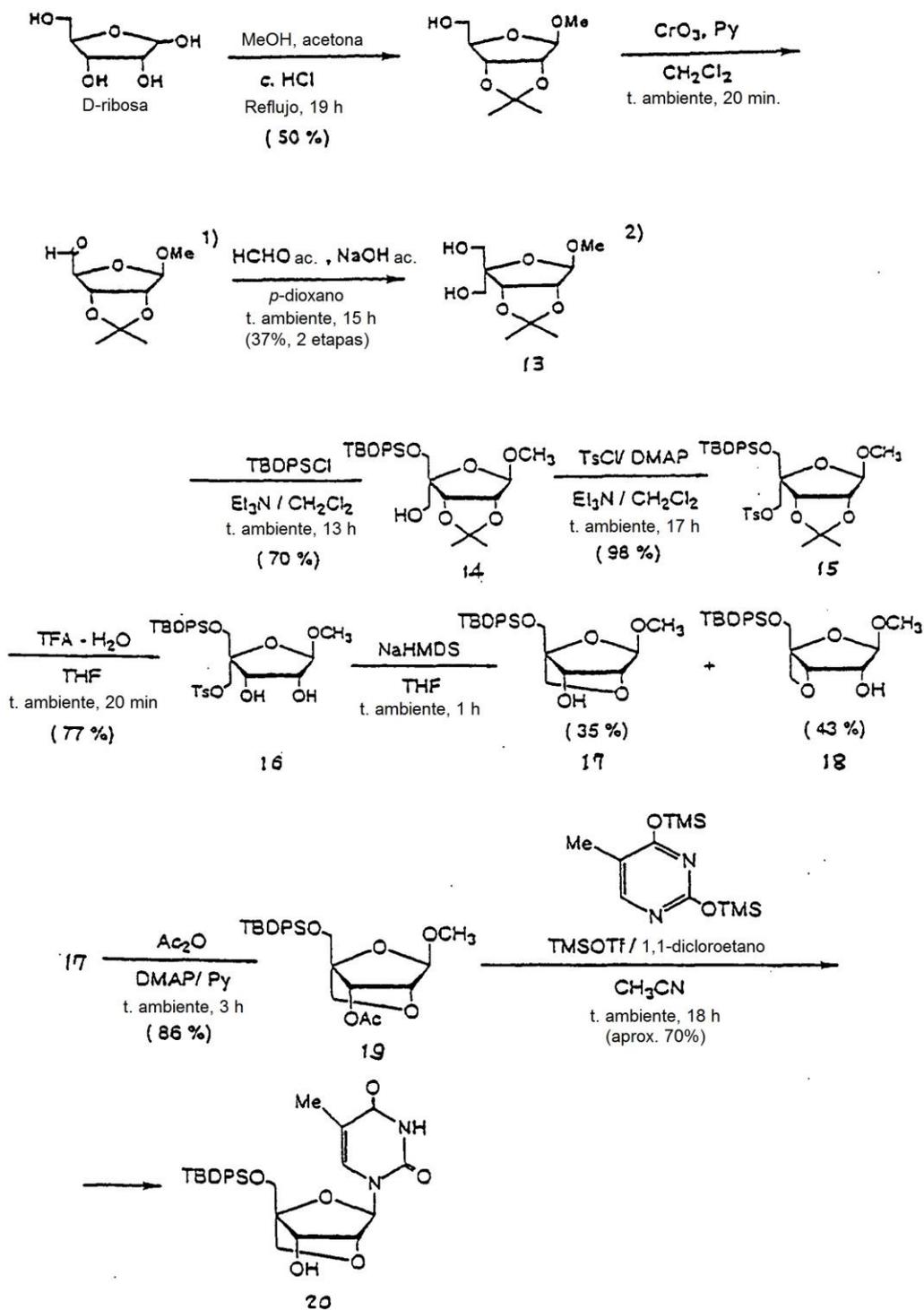
- 5 El compuesto 1, sintetizado a partir de uridina según la literatura [1] J.A. Secrist et al., J. Am. Chem. Soc., 101, 1554 (1979); 2) G.H. Jones et al., J. Org. Chem., 44, 1309 (1979)], se trató con cloruro de tosilo (TsCl) para toxilar sólo uno de los dos alcoholes primarios, conduciendo al compuesto 2. El compuesto 2 se hidrolizó en condiciones ácidas en un compuesto triol 3. El compuesto 3 se condensó con benzaldehído en presencia de un catalizador ácido para formar un compuesto biciclido 4. El compuesto 4 se redujo con cianoborohidruro sódico ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) en presencia de tetracloruro de titanio ( $\text{TiCl}_4$ ), para obtener el compuesto 5. Este compuesto se hizo reaccionar con hexametil-disilazida sódica ( $\text{NaHMDS}$ ) en tetrahidrofurano (THF) para obtener un compuesto biciclo 6 (Compuesto I: B = uracilo (U), X = H, Y = bencilo). Cuando el compuesto 6 se redujo catalíticamente en presencia de un catalizador de paladio carbono, se obtuvo un compuesto diol 7 (Compuesto I: B = U, X = Y = H). El tratamiento posterior del compuesto 7 con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTrCl) produjo un compuesto tritilo 8 (Compuesto I: B = U, X = DMTr, Y = H). Los compuestos 6, 7 y 8 se pueden usar como materias primas para diversos compuestos I.

Se pueden sintetizar compuestos (I) que tienen diversas bases de ácido nucleico, naturales o artificiales, distintas de uridina, mediante cualquiera de los tres métodos siguientes:

- 15 El primer método es conversión a partir del compuesto 8. Es decir, el compuesto 8 se acetila hasta el compuesto 9, y luego se hace reaccionar con 1,2,4-triazol para formar el compuesto 10. La hidrólisis de este compuesto produjo el compuesto 11 (Compuesto I: B = citosina (C), X = DMTr, Y = H). El compuesto 12 (Compuesto I: B = benzoílcitosina ( $\text{C}^{\text{Bz}}$ ), X = DMTr, Y = H), que constituirá una materia prima para la síntesis de oligonucleótido, se puede obtener fácilmente mediante benzoilación del compuesto 11.

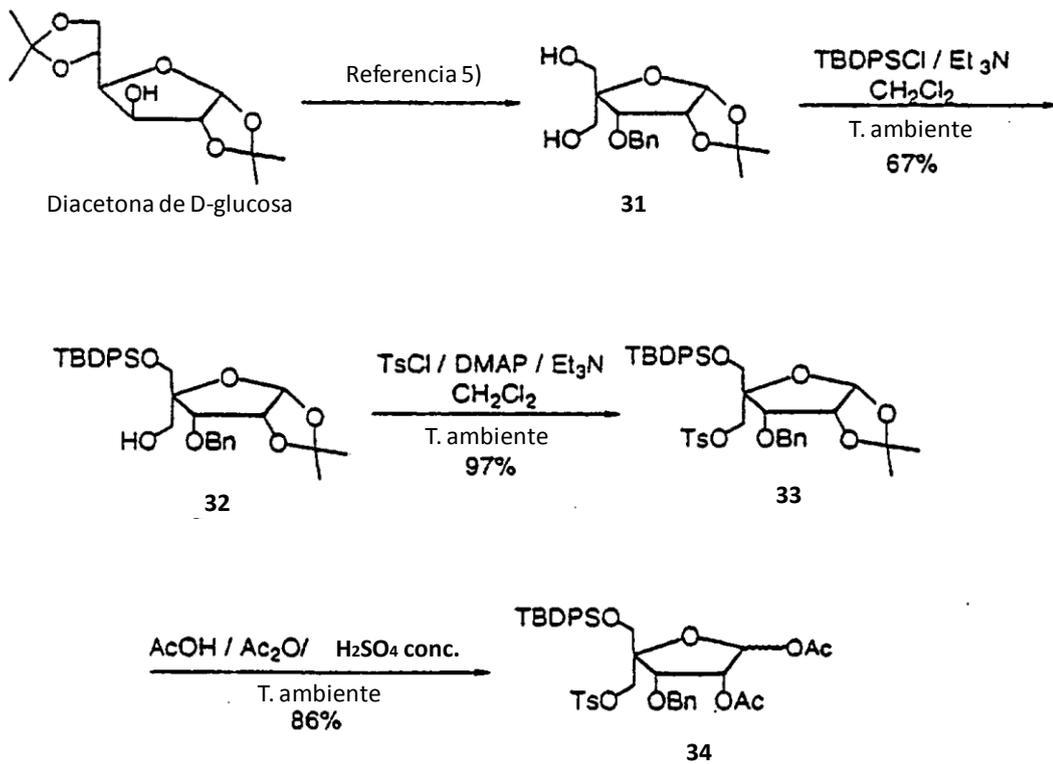


5 El segundo método es un método realizado a través del compuesto 13, que se puede obtener fácilmente a partir de D-ribosa, según la literatura [3] A.G.M. Barrett et al., J. Org. Chem., 55, 3853 (1990); 4) G.H. Jones et al., *ibid.*, 44,1309 (1979)]. Es decir, el compuesto 13 condujo al compuesto 16 mediante tres etapas, y se cicló en condiciones básicas para obtener un compuesto metil-glicosilo deseado 17. El grupo OMe en la posición 1 de este compuesto se puede sustituir por diferentes bases de ácidos nucleicos mediante diversos métodos que ya han sido desarrollados. Por ejemplo, se puede emplear un método como el mostrado mediante un esquema que se extiende desde el compuesto 17 hasta el 20.

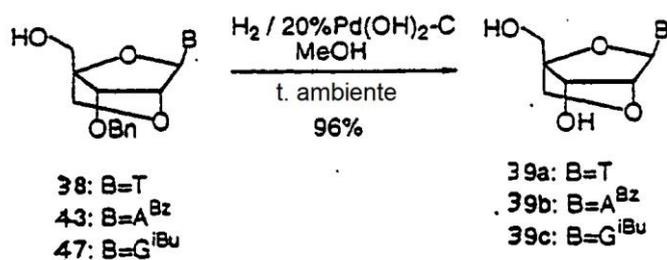
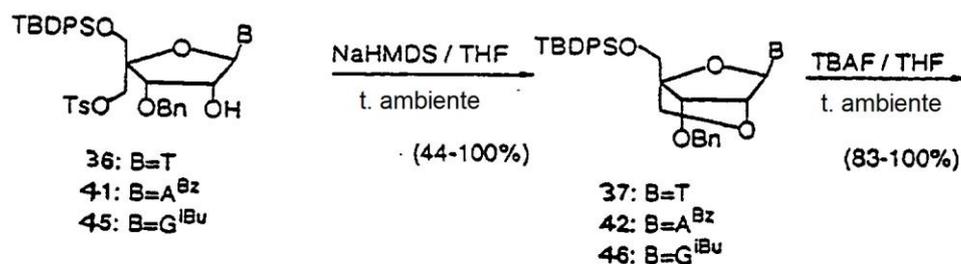
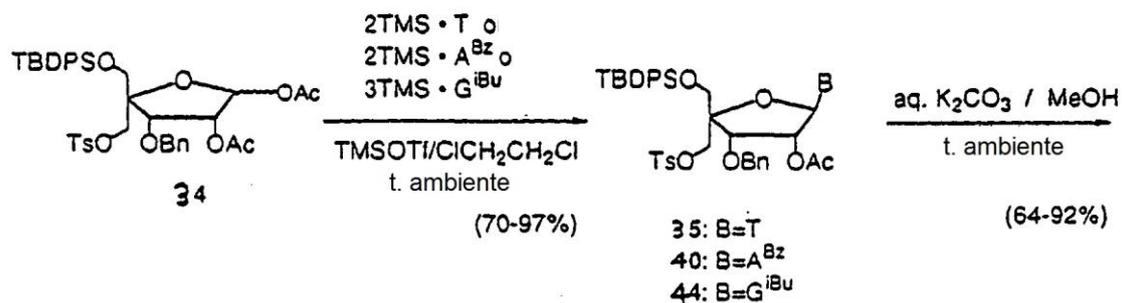


El tercer método comienza con diacetona de D-glucosa, que se obtiene a partir de D-glucosa mediante una etapa y está disponible comercialmente. El compuesto 31 se preparó de acuerdo con la referencia 5) R.D. Youssefyeh, J.P.H. Verheyden and J.G. Moffatt., J. Org. Chem., 44, 1301-1309 (1979). Luego, el compuesto 31 se trató como se muestra mediante el siguiente esquema, para proteger los dos grupos hidroxilo primarios con un grupo t-butil-difenil-sililo y un grupo *p*-tolueno-sulfonilo, progresivamente. El compuesto protegido se acetiló hasta el compuesto 34.

5

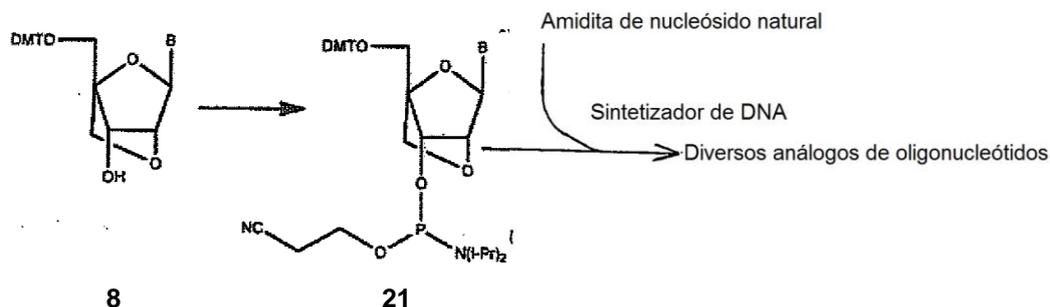


5 El compuesto 34 se condensó, por separado, con timina, benzoil-adenina e isobutiril-guanina activada tras trimetilsililación (a la que se hace referencia como 2TMS-S, 2TMS-A<sup>Bz</sup>, y 3TMS-G<sup>iBu</sup>, respectivamente), para obtener los compuestos 35, 40 y 44 con rendimientos elevados, según se indica mediante el esquema presentado más abajo. Luego, estos condensados se sometieron a desacetilación (compuestos 36, 41, 45), formación de anillo de cinco miembros (compuestos 37, 42, 46), desililación (compuestos 38, 43, 47), y desbencilación adicional para formar los compuestos deseados 39.



## (2) Síntesis del análogo de oligonucleótido

5 El compuesto 8 se hace reaccionar con 2-cianoetil-N,N',N',N'-tetraisopropil-fosoramidita para obtener un compuesto amidita 21. Este compuesto se combina con una amidita de nucleósido presente en la naturaleza, y se somete a un sintetizador de DNA para sintetizar varios análogos de oligonucleótido. Los productos brutos sintetizados se purifican usando una columna cromatográfica de fase inversa (Oligo-Pak). La pureza del producto purificado se analiza mediante HPLC, con lo que se puede confirmar la formación de un análogo de oligonucleótido purificado.



Al menos una unidad monómera como el compuesto 8 puede estar contenida en el análogo de oligonucleótido. Alternativamente, las unidades monómeras pueden estar presentes en una o más localizaciones en el análogo de oligonucleótido, de tal forma que están separadas entre sí a través de uno o más nucleótidos presentes en la naturaleza. La presente invención hace posible sintetizar una molécula no codificante que incorpora un número necesario de análogos de nucleótido (análogos de nucleósido) de la invención (una longitud necesaria del análogo de nucleótido o nucleósido) en una localización necesaria. La longitud del análogo de oligonucleótido completo es de 2 a 50, preferiblemente de 10 a 30, unidades de nucleósido.

Tal análogo de oligonucleótido (molécula no codificante) es mínimamente degradable por varias nucleasas, y puede existir *in vivo* durante largo tiempo tras la administración. Esta molécula no codificante funciona, por ejemplo, para formar una doble hélice estable junto con un RNA mensajero, inhibiendo así la biosíntesis de una proteína potencialmente patógena; o formar una triple hélice en combinación con DNA de cadena doble en un genoma para inhibir la transcripción hacia RNA mensajero. El análogo de oligonucleótido puede también suprimir la proliferación de un virus que ha infectado.

A la vista de estos descubrimientos, se espera que un análogo de oligonucleótido (molécula no codificante) que usa el análogo de oligonucleósido de la presente invención, sea útil como fármaco, incluyendo antineoplásicos y antivíricos, para el tratamiento de enfermedades mediante la inhibición de las acciones de genes particulares.

La molécula no codificante que usa el análogo de nucleótido (nucleósido) de la presente invención, se puede formular en forma de preparaciones parenterales o preparaciones de liposomas, incorporando aditivos habituales como tampones y/o estabilizantes. Como preparaciones para aplicación tópica, se puede mezclar con vehículos farmacéuticos de uso común para preparar ungüentos, cremas, líquidos o parches.

La síntesis del análogo de nucleósido y análogo de nucleótido de la presente invención se describirá más detalladamente mediante los siguientes Ejemplos y Ejemplos de Producción. En estos Ejemplos, se usa principalmente como base el uracilo, pero se pueden usar también otras bases de ácidos nucleicos de purina de forma similar.

#### [Ejemplo 1] Síntesis de análogo de nucleósido

(1) Síntesis de 2',3'-O-ciclohexiliden-4'-(*p*-toluenosulfoniloximetil)uridina (Compuesto 2)

Se añadió cloruro de *p*-toluenosulfonilo (771 mg, 4,05 mmoles) a una solución de piridina anhidra (13,5 ml) del Compuesto 1 (956 mg, 2,70 mmoles) conocido en la literatura, a temperatura ambiente en una corriente de nitrógeno, y la mezcla se agitó durante 5 horas a 60°C.

Se añadió a la mezcla de reacción una solución de bicarbonato sódico saturada, tras lo cual el sistema de reacción se extrajo con benceno 3 veces. La fase orgánica se lavó una vez con una solución de cloruro sódico saturada y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el residuo se sometió a azeotropía con benceno 3 veces. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 15:1), y luego se volvió a precipitar desde benceno-hexano, para obtener un polvo blanco (Compuesto 2) (808 mg, 1,59 mmoles, 59%).

Compuesto 2: polvo blanco, punto de fusión 104-106°C (benceno-hexano), IR  $\nu$  (KBr): 3326, 2929, 2850, 1628, 1577, 1544, 1437, 1311, 1244 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-acetona):  $\delta$  1,45-1,67 (10H, m), 2,45 (3H, s), 3,71 (2H, ABq, J = 12 Hz), 4,20 (2H, ABq, J = 11 Hz), 4,92 (1H, d, J' = 6 Hz), 5,05, 5,06 (1H, dd, J = 4,6 Hz), 5,60 (1H, d, J = 7 Hz), 5,75 (1H, d, J = 4 Hz), 7,48 (2H, d, J = 8 Hz), 7,77 (1H, d, J = 8 Hz), 7,81 (2H, d, J = 8 Hz), 10,10 (1H, s.). <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-acetone):  $\delta$  21,5, 24,1, 24,5, 25,5, 34,8, 36,9, 63,5, 69,7, 82,5, 84,7, 87,8, 92,9, 102,9, 115,4, 128,8, 130,8, 133,9, 142,7, 145,9, 151,3, 163,5, Masa (EI): m/z 481 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O),

Análisis calculado para C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S•1/3 H<sub>2</sub>O: C, 53,69; H, 5,61; N, 5,44; S, 6,22, Encontrado: C, 53,99; H, 5,48; N,

5,42; S, 6,10.

(2) Síntesis de 4'-(*p*-toluenosulfoniloximetil)uridina (Compuesto 3)

5 El compuesto anterior 2 (107 mg, 0,21 mmoles) se agitó en TFA-H<sub>2</sub>O (98:2, 1 ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se eliminó por destilación a presión reducida, y se añadió EtOH al residuo, seguido de la realización de azeotropía 3 veces. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1) para obtener el Compuesto 3 (85,0 mg, 0,20 mmoles, 94%).

10 Compuesto 3: Polvo blanco, punto de fusión 119-120°C. IR  $\nu$  (KBr): 3227, 3060, 2932, 2837, 1709, 1508, 1464, 1252, 978, 835, 763, 556 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-acetone):  $\delta$  2,31 (3H, s), 2,84 (3H, s), 3,71 (2H, s), 4,13, 4,20 (2H, ABq, J = 11 Hz), 4,28, 4,31 (1H, dd, J' = 9,6 Hz), 4,36 (1H, d, J' = 6 Hz), 5,54 (1H, d, J' = 8 Hz), 5,75 (1H, d, J = 7 Hz), 7,32 (2H, d, J = 8 Hz), 7,67 (2H, d, J = 8 Hz), 7,70 (1H, d, J' = 8 Hz), 10,14 (1H, s). <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-acetona):  $\delta$  21,5, 63,7, 70,8, 72,7, 74,6, 86,8, 88,8, 103,1, 128,8, 130,7, 133,9, 141,7, 145,8, 151,8, 163,9. Masa (EI): m/z 256 (M<sup>+</sup>-OTs).

(3) Síntesis de 2',3'-O-benciliden-4'-(*p*-toluenosulfoniloximetil)uridina (Compuesto 4)

15 En una corriente de nitrógeno, se añadieron benzaldehído (2,4 ml en exceso) y cloruro de zinc (670 mg, 5,0 mmoles) al Compuesto 3 anterior (400 mg, 0,93 mmoles), y la mezcla se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Una vez detenida la reacción mediante adición de una solución saturada de bicarbonato sódico, la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo, y se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico, agua, y una solución saturada de cloruro sódico. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 40:1) para obtener el Compuesto 4 (380 mg, 0,74 mmoles, 80%).

20 Compuesto 4: Polvo blanco. Punto de fusión 99-102°C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexano). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>-26,7° (c = 1,0, CHCl<sub>3</sub>). IR  $\nu$  (KBr): 3059, 1691, 1460, 1362, 1269, 1218, 1177 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  2,41 (3H, s), 3,25 (1H, br), 3,79 (2H, m), 4,19 (2H, s), 5,09 (1H, d, J = 7 Hz), 5,28 (1H, dd, J = 3,7 Hz), 5,60 (1H, d, J = 4 Hz), 5,73 (1H, d, J = 8 Hz), 5,94 (1H, s), 7,24 (1H, d, J = 8 Hz), 7,38 (2H, d, J = 9 Hz), 7,42 (5H, br), 7,69 (2H, d, J = 9 Hz), 9,11 (1H, br). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  21,6, 63,5, 68,3, 77,2, 82,8, 84,2, 87,7, 94,9, 102,6, 107,5, 126,5, 127,9, 128,5, 129,7, 132,2, 135,0, 143,0, 145,0, 150,4, 163,5.

25 Análisis calculado para C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S•1/3 H<sub>2</sub>O: C, 55,17; H, 4,76; N, 5,36; S, 6,14. Encontrado: C, 55,19; H, 4,66; N, 5,29; S, 5,98.

(4) Síntesis de 3'-O-bencil-4'-(*p*-toluenosulfoniloximetil)uridina (Compuesto 5)

30 Se añadió borocianohidruro sódico (92 mg, 1,5 mmoles) a una solución de acetonitrilo (3 ml) del Compuesto 4 (150 mg, 0,29 mmoles), a temperatura ambiente, en una corriente de nitrógeno. Luego, se añadió tetracloruro de titanio (0,16 ml, 1,5 mmoles) gota a gota enfriando con hielo, y la mezcla se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con cloroformo, y se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico, agua y una solución saturada de cloruro sódico. Luego, la fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. Una vez eliminados los disolventes por destilación, el residuo se separó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 25:1) para obtener el Compuesto 5 (112 mg, 0,22 mmoles, 75%).

40 Compuesto 5: Cristales incoloros. Punto de fusión 195-197°C (AcOEt-hexano). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>-14,6° (c = 1,0, CHCl<sub>3</sub>), IR  $\nu$  (KBr): 3033, 2885, 2820, 1726, 1470, 1361, 1274, 1175, 1119 cm<sup>-1</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ : 2,40 (3H, s), 3,59-3,77 (3H, m), 4,10, 4,24 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,32 (1H, d, J = 6 Hz), 4,56 (2H, m), 4,69 (1H, d, J = 11 Hz), 5,52 (1H, d, J = 6 Hz), 5,67 (1H, d, J = 8 Hz), 7,24-7,29 (7H, m), 7,48 (1H, d, J = 8 Hz), 7,70 (2H, d, J = 9 Hz), 9,91 (1H, s). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  21,6, 63,2, 69,2, 73,6, 74,6, 78,1, 86,6, 92,9, 102,5, 127,9, 128,2, 128,3, 128,6, 129,9, 132,3, 136,9, 142,4, 145,2, 150,7, 163,8.

Análisis calculado para C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S: C, 55,59; H, 5,05; N, 5,40; S, 6,18. Encontrado: C, 55,41; H, 5,02; N, 5,32; S, 6,15.

(5) Síntesis de 3'-O-bencil-2'-O, 4'-C-metilenuridina (Compuesto 6)

45 Se añadió una suspensión de benceno anhidro (0,7 ml) de NaHMDS (3,2 mmoles) a una solución de THF anhidro (1,5 ml) del Compuesto 5 (80 mg, 0,16 mmoles), a temperatura ambiente en una corriente de nitrógeno, y la mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla de reacción una solución saturada de bicarbonato sódico, seguida de extracción de la mezcla con CHCl<sub>3</sub>. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre sulfato sódico anhidro. Una vez eliminados los disolventes por destilación, el residuo se separó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1), y luego se volvió a cristalizar desde MeOH para obtener el Compuesto 6 (41 mg, 0,10 mmoles, 61%)

50 Compuesto 6: Cristales incoloros. Punto de fusión 217-219°C (MeOH). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>+108,4° (c = 0,3, MeOH). IR  $\nu$  (KBr):

3059, 2951, 1688, 1459, 1271, 1053  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$ : 3,75, 3,85 (2H, AB,  $J = 8$  Hz), 3,77 (2H, d,  $J = 5$  Hz), 3,92 (1H, s), 4,44 (1H, s), 4,60 (2H, s), 5,39 (1H, t,  $J = 5$  Hz), 5,48 (1H, s), 7,31 (5H, m), 7,72 (1H, d,  $J = 8$  Hz), 11,37 (1H, s),  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$ : 56,0, 71,1, 71,6, 75,8, 76,5, 86,5, 88,3, 100,9, 127,4, 127,6, 128,2, 137,9, 139,0, 150,0, 163,3, Masa (EI):  $m/z$  346 ( $M^+$ , 1,1).

5 Análisis calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ : C, 58,96; H, 5,24; N, 8,09, Encontrado: C, 58,67; H, 5,23; N, 8,05.

(6) Síntesis de 2'-O,4'-C-metilenuridina (Compuesto 7)

10 Se añadió Pd-C al 10% (25 mg), a una solución de metanol (2,5 ml) del Compuesto 6 (25 mg, 0,072 mmoles), y la mezcla se agitó durante 15 horas a presión atmosférica en una corriente de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó por destilación. Luego, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH = 10:1, luego 5:1) para obtener el Compuesto 7 (18,3 mg, cuantitativo).

Compuesto 7: Cristales incoloros. Punto de fusión 239-243°C (MeOH).  $[\alpha]_D^{23} +92,2^\circ$  ( $c = 0,3$ , MeOH), IR v (KBr): 3331, 3091, 3059, 2961, 1689, 1463, 1272, 1049  $\text{cm}^{-1}$ ,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 3,76, 3,96 (2H, AB,  $J = 8$  Hz), 3,90 (2H, s), 4,04 (1H, s), 4,28 (1H, s), 5,55 (1H, s), 5,69 (1H, d,  $J = 8$  Hz), 7,88 (1H, d,  $J = 8$  Hz).

Análisis calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ : C, 46,88; H, 4,72; N, 10,93, Encontrado: C, 46,74; H, 4,70; N, 10,84.

15 (7) 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O,4'-C-metilenuridina (Compuesto 8)

20 Se añadió piridina anhidra al Compuesto 7 (140 mg, 0,53 mmoles), seguido de la realización de azeotropía de la mezcla 3 veces. Luego, el producto se convirtió en una solución de piridina anhidra (1,5 mol), y se añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (210 mg, 0,63 mmoles) y DMAP (6,5 mg, 0,053 mmoles) a temperatura ambiente en una corriente de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se añadió una solución saturada de bicarbonato sódico, seguido de extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre sulfato sódico anhidro. Una vez eliminados los disolventes por destilación a presión reducida, el residuo se separó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH = 40:1), para obtener el Compuesto 8 (230 mg, 0,34 mmoles, 66%).

25 Compuesto 8: Polvo blanco. Punto de fusión 117-120°C ( $\text{CHCl}_3$ ).  $[\alpha]_D^{23} +17,2^\circ$  ( $c = 1,0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). IR v (KBr): 3393, 3101, 2885, 1689, 1464, 1272, 1047  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,59 (1H, br), 3,56 (2H, q,  $J = 7, 11$  Hz), 3,87 (1H, d,  $J = 7$  Hz), 4,26 (1H, s), 4,47 (1H, s), 5,60 (1H, d,  $J = 9$  Hz), 5,63 (1H, s), 5,84 (4H, d,  $J = 9$  Hz), 7,22-7,45 (9H, m), 7,93 (1H, d,  $J = 9$  Hz).

### [Ejemplo 2] Síntesis de análogo de nucleósido

30 (1) Síntesis de metil-5-O-(*t*-butildifenilsilil)-4-hidroximetil-2,3-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranósido (Compuesto 14)

35 En una corriente de nitrógeno, se añadieron  $\text{Et}_3\text{N}$  (2,62 ml, 18,8 mmoles) y cloruro de *t*-butildifenilsililo (4,88 ml, 18,8 mmoles) a una solución de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidra (40 ml) del compuesto 13 (2,00 g, 8,54 mmoles) conocida en la literatura, enfriando con hielo, y la mezcla se agitó durante 13 horas a temperatura ambiente. Se añadió una solución saturada de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción, tras lo cual el sistema de reacción se extrajo con AcOEt 3 veces. La fase orgánica se lavó una vez con una solución saturada de cloruro sódico, y luego se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{hexano}:\text{AcOEt} = 5:1$ ), para obtener un material oleoso incoloro (Compuesto 14) (2,82 g, 5,98 mmoles, 70%).

40  $[\alpha]_D^{17} -16,2^\circ$  ( $c = 0,52$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). IR v (KBr) : 3510, 3061, 2938, 2852, 1465, 1103  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,09 (9H, s), 1,28 (3H, s), 1,49 (3H, s), 3,22 (3H, s), 3,67, 3,76 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 3,88, 3,93 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 4,49 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 4,57 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 4,93 (1H, s), 7,38 - 7,43 (6H, m), 7,67 (4H, d,  $J = 7$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 19,2, 24,4, 25,9, 26,9, 55,0, 62,9, 64,8, 82,2, 85,9, 88,7, 108,6, 112,6, 127,8, 129,9, 133,0, 135,7.

Anal. calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{Si}\cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$ : C, 65,45; H, 7,71. Encontrado: C, 65,43; H, 7,59.

45 (2) Síntesis de metil-5-O-(*t*-butildifenilsilil)-2,3-O-isopropiliden-4-(*p*-toluenosulfoniloximetil)- $\beta$ -ribofuranósido (Compuesto 15)

50 En una corriente de nitrógeno, se añadieron  $\text{Et}_3\text{N}$  (3,92 g, 28,0 mmoles), cloruro de *p*-toluenosulfonilo (1,34 g, 7,22 mmoles), y 4-dimetilaminopiridina (90 mg, 0,72 mmoles), a una solución anhidra de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 ml) del Compuesto 14 (2,13 g, 4,51 mmoles), y la mezcla se agitó durante 17 horas a temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla de reacción una solución saturada de bicarbonato sódico, tras lo cual el sistema de reacción se extrajo 3 veces con

- 5 AcOEt. La fase orgánica se lavó una vez con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:AcOEt = 10:1), para obtener un material oleoso incoloro (Compuesto 15) (2,76 g, 4,42 mmoles, 98%).  $[\alpha]_D^{17}$ -3,82° (c= 0,56, CHCl<sub>3</sub>). IR v (KBr): 2934, 2852, 1369, 1104 cm<sup>-1</sup>.
- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,02 (9H, s), 1,20 (3H, s), 1,32 (3H, s), 2,41 (3H, s), 3,09 (3H, s), 3,51, 3,77 (2H, AB, J = 10 Hz), 4,34 (1H, d, J = 6 Hz), 4,25, 4,39 (2H, AB, J = 9 Hz), 4,47 (1H, d, J = 6 Hz), 4,77 (1H, s), 7,28, 7,81 (4H, AB, J = 9 Hz), 7,39 - 7,44 (6H, m), 7,62 - 7,65 (4H, m), 7,81 (2H, d, J = 9 Hz).
- 10 <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>c</sub>: 19,2, 21,6, 24,5, 25,8, 26,8, 54,9, 62,7, 68,8, 81,9, 85,6, 87,5, 108,7, 112,8, 127,7, 127,8, 128,2, 129,6, 129,9, 132,9, 135,6, 144,4.
- Anal. calculado para C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>8</sub>SSi: C, 63,23; H, 6,75; S, 5,11. Encontrado: C, 62,99; H, 6,53; S, 5,13.
- (3) Síntesis de metil=5-O-(t-butildifenilsilil)-4-(p-toluenosulfoniloximetil)-β-D-ribofuranósido (Compuesto 16)
- 15 Se añadió ácido trifluoroacético (14 ml) a una solución de THF-H<sub>2</sub>O [11 ml, 8:3 (v/v)] del Compuesto 15 (645 mg, 1,03 mmoles) a temperatura ambiente, y luego la mezcla se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:AcOEt = 5:1), para obtener un material oleoso incoloro (Compuesto 16) (464 mg, 0,79 mmoles, 77%).  $[\alpha]_D^{17}$ -35,8° (c=1,90,CHCl<sub>3</sub>) IR v (KBr) :3499, 3051, 2931, 2840, 1594, 1468,1362, 1109 cm<sup>-1</sup>.
- 20 <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ:1,02(9H,s), 2,42(3H,s), 3,16(3H,s), 3,54, 3,70(2H,AB,J=10Hz), 3,97(1H,d,J=5Hz), 4,18(1H,d,J=5Hz), 4,26, 4,39(2H,AB,J=10Hz), 4,73(1H,s), 7,30(2H,d,J=8Hz), 7,36-7,44 (6H,m), 7,59-7,66(4H,m),7,78(2H,d,J=8Hz). <sup>13</sup>CNMR(CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>c</sub>: 19,2, 21,6, 26,7, 55,2, 66,5, 69,6, 74,0, 75,2, 76,5, 84,8, 107,5, 127,7, 128,0, 129,8, 132,6, 132,7, 132,8, 135,5, 135,6, 144,9.
- Anal. calculado para C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>SSiO<sub>8</sub>•1/4 H<sub>2</sub>O:C,60,94; H,6,56. Encontrado:C, 60,94; H,6,43.
- 25 (4) Síntesis de metil=5-(t-butildifenilsilil)-2-O,4-C-metilen-β-D-ribofuranósido (Compuesto 17) y metil=5-(t-butildifenilsilil)-3-O,4-C-metilen-β-D-ribofuranósido (Compuesto 18)
- 30 En una corriente de nitrógeno, se añadió una suspensión de benceno (1,6 ml) de NaHMDS (3,30 mmoles) a una solución anhidra de THF (4 ml) del Compuesto 16 (194 mg, 0,33 mmoles) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras añadir una solución saturada de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción, los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el residuo se extrajo 3 veces con AcOEt. La fase orgánica se lavó una vez con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:AcOEt = 5:1), para obtener un material oleoso incoloro Compuesto 17 (48 mg, 0,116 mmoles, 35%) y un material oleoso incoloro Compuesto 18 (59 mg, 0,142 mmoles, 43%).
- 35 Compuesto 17: IR v (KBr) : 3438, 3064, 1103, 1036 cm<sup>-1</sup>.
- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:1,08(9H,s), 2,04(1H,br s), 3,39(3H,s), 3,65, 3,98(2H,AB,J=8Hz), 3,95, 4,02(2H,AB,J=12Hz), 4,02(1H,s), 4,30 (1H,s), 4,79(1H,s), 7,38-7,46(6H,m), 7,65-7,69(4H,m).
- <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>c</sub> :19,2, 26,7, 55,0, 60,7, 71,2, 73,1, 79,9, 8 5,5, 104,3, 127,8, 129,9, 130,0, 132,9, 135,6, 135,7.
- Anal. calculado para C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Si•1/4 H<sub>2</sub>O:C,65,68; H,7,34. Encontrado:C,65,9 8; H,7,23.
- 40 Compuesto 18: IR v (KBr):3456, 3058, 2938, 2852, 1467, 1108 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)δ:1.10(9H,s), 3.26(3H,s), 3.71(2H, s), 4.02(1H, d,J=6Hz), 4,35, 4,95(2H,d,J=7Hz), 5,01(1H,s), 5,11(1H,d,J=6H z), 7,38-7,44(6H,m), 7,66(4H,d,J=7Hz).
- <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ<sub>c</sub>:19,3, 26,8, 55,4, 63,7, 75,1, 77,9, 84,5, 86,3, 111,9, 127,8, 128,0, 129,9, 132,9, 133,0, 135,6, 135,8, 135,9.
- 45 Anal. calculado para C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Si•1/4 H<sub>2</sub>O:C,65,91; H,7,34. Encontrado:C, 66,07; H,7,14.
- (5) Síntesis de metil=3-O-acetil-5-O-(t-butildifenilsilil)-2-O,4-C-metilen-β-D-ribofuranósido (Compuesto 19)

En una corriente de nitrógeno, se añadieron anhídrido acético (0,38 ml, 4,08 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (21 mg, 0,170 mmoles) a una solución anhidra de piridina (10 ml) del compuesto 17 (704 mg, 1,70 mmoles) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez añadida una solución

saturada de bicarbonato sólido a la mezcla de reacción, el sistema se extrajo 3 veces con AcOEt. La fase orgánica se lavó una vez con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:AcOEt = 7:1), para obtener un material oleoso incoloro Compuesto 19 (665 mg, 1,46 mmoles, 86%).

$[\alpha]_D^{17}$ -34,3° (c=0.93,CHCl<sub>3</sub>) IR v (KBr): 3438, 3064, 2934, 1749, 1468, 1103, 1036 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)δ:0,99(9H,s), 1,97(3H,s), 3,34(3H,s), 3,69, 3,86(2H,AB,J=8Hz), 3,86(2H, s), 4,17(1H,s), 4,77(1H,s), 5,06(1H,s), 7,28-7,39(6H,m), 7,58-7,63(4H,m).

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ<sub>c</sub>:19,3, 20,9, 26,7, 55,0, 60,3, 72,0, 73,6, 78,3, 85,3, 104,4, 127,7, 129,8, 133,0, 135,6, 169,8.

Anal. calculado para C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>Si•1/4 H<sub>2</sub>O:C, 65,12; H, 7,10. Encontrado:C, 65,27; H, 7,00.

(6) Síntesis de 5'-O-(*t*-butildifenilsilil)-2'-O-4'-C-metilen-5-metiluridina (Compuesto 20)

En una corriente de nitrógeno, se añadió O,O'-bistrimetilsililimina (154 mg, 0,598 mmoles) a una solución anhidra de CH<sub>3</sub>CN (2 ml) del Compuesto 19 (109,2 g, 0,239 mmoles) a temperatura ambiente. Luego, se añadió una solución de sulfonato de trimetilsililtrifluorometano (0,82 mol, 8,74 mmoles) en 1,1-dicloroetano (0,31 ml) enfriando con hielo, y la mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se añadió una solución saturada de bicarbonato sódico, seguido de extracción del sistema 3 veces con AcOEt. La fase orgánica se lavó una vez con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:AcOEt = 3:1), para obtener un material oleoso incoloro Compuesto 20 (87,7 mg, 0,173 mmoles, 70%).

IR v (KBr):3048, 2935, 2852, 1749, 1466, 1369, 1234, 1108, 1040 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)δ:1,06(9H,s), 1,94(3H,s), 2,98(1H,br s), 3,63, 4,00(2H,AB,J=10Hz), 3,72(1H,d,J=7Hz), 3,82-3,84(2H,m), 4,30 (1H,s), 5,25(1H,s), 7,40-7,46(6H,m), 7,60(4H,d,J=6Hz), 7,66 (1H,s), 9,68(1H,br s).

### [Ejemplo 3] Síntesis de análogo de nucleósido (método diferente)

(1) Síntesis de 3-O-bencil-5-O-*t*-butildifenilsilil-4-(hidroximetil)-1,2-O-isopropiliden- $\alpha$ -D-eritropentofuranosa (Compuesto 32)

En una corriente de nitrógeno, se añadieron trietilamina (3,71 ml, 26,6 mmoles) y cloruro de *t*-butildifenilsililo (6,94 ml, 26,7 mmoles), enfriando con hielo, a una solución de cloruro de metileno (50 ml) del compuesto 31 (2,50 g, 8,08 mmoles), preparada según la referencia 5, anteriormente mencionada. La mezcla se agitó durante 10,5 horas a temperatura ambiente. Tras añadir una solución saturada de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción, el sistema se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó una vez con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-hexano = 1:4 → 1:3), para obtener un sólido blanco, Compuesto 32 (2,97 g, 5,41 mmoles, 67%).

Punto de fusión 98-99°C (hexano).  $[\alpha]_D^{20}$ +54,8°(c = 1,12, acetona). IR v max (KBr) : 3553, 2936, 1463, 1379, 1107 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ: 1,13 (9H, s), 1,50 (3H, s), 1,78 (3H, s), 2,56 (1H, t, J = 7 Hz), 3,82, 3,92 (2H, AB, J = 11 Hz), 3,94 (2H, t, J = 6 Hz), 4,57 (1H, d, J = 5 Hz), 4,64, 4,95 (2H, AB, J = 12 Hz), 4,83 (1H, dd, J = 4, 5 Hz), 5,95 (1H, d, J = 4Hz), 7,44-7,55 (11H, m), 7,72-7,78 (4H, m). <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ<sub>c</sub>: 19,2, 26,2, 26,5, 26,8, 63,2, 65,4, 72,5, 77,9, 79,1, 87,4, 104,4, 113,7, 127,6, 127,7, 128,0, 128,5, 129,5, 129,7, 132,9, 133,1, 134,7, 135,5, 137,2.

Anal. calculado para C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>Si : C, 70,04; H, 7,38. Encontrado: C, 70,19; H, 7,35.

(2) Síntesis de 3-O-bencil-5-O-(*t*-butildifenilsilil)-4-(*p*-toluenosulfoniloximetil)-1,2- $\alpha$ -D-eritropentofuranosa (Compuesto 33)

En una corriente de nitrógeno, se añadieron trietilamina (395  $\mu$ l, 2,83 mmoles), cloruro de *p*-toluenosulfonilo (139,2 mg, 0,730 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (8,92 mg, 0,0730 mmoles), enfriando con hielo, a una solución de cloruro de metileno del Compuesto 32 (250 mg, 0,456 mmoles). La mezcla se agitó durante 15,5 horas a temperatura ambiente. Una vez añadida al sistema una solución saturada de bicarbonato sódico, el sistema se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt- hexano: = 1:6), para obtener un material

oleoso amarillo claro Compuesto 33 (310,6 mg, 0,442 mmoles, 97%).

$[\alpha]_D^{20} + 16,0^\circ$  (c = 0,44, acetona). IR v max (KBr) : 2935, 1595, 1462, 1363, 1174, 1106  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 1,08 (9H, s), 1,40 (3H, s), 1,46 (3H, s), 2,48 (3H, s), 3,68, 3,83 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,45 (2H, dd, J = 4, 5 Hz), 4,64, 4,81 (2H, AB, J = 12 Hz), 4,68 (1H, dd, J = 4, 5 Hz), 5,81 (1H, d, J = 4 Hz), 7,32 (2H, d, J = 8 Hz), 7,42-7,72 (15H, m), 7,82, (2H, d, J = 8 Hz), 7,66 (4H, m), 7,72 (2H, d, J = 8 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 19,1, 21,5, 26,1, 26,4, 26,7, 64,4, 70,0, 72,5, 78,1, 78,9, 85,4, 104,2, 113,6, 127,3, 127,7, 127,9, 128,0, 128,4, 129,6, 129,7, 129,8, 132,7, 132,8, 135,5, 137,2, 144,4. MS(EI) m/z : 646 ( $\text{M}^+$ -t-Bu). Elevado-MS(EI):

Calculado para  $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{SSi}$  ( $\text{M}^+$ -t-Bu) : 645,1978, Encontrado : 645,1969.

(3) Síntesis de 1,2-di-O-acetil-3-O-bencil-5-O-*t*-butildifenilsilil-4-(*p*-toluenosulfoniloximetil)- $\alpha$ - y  $-\beta$ -D-ribofuranosa (Compuesto 34)

En una corriente de nitrógeno, se añadieron anhídrido acético (6,0 ml, 63,6 mmoles) y ácido sulfúrico concentrado (56  $\mu\text{l}$ , 1,10  $\mu\text{mol}$ ) a una solución de ácido acético (56 ml) del compuesto 34 (3,70 g, 5,27 mmoles). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vació sobre agua helada (300 ml), y se agitó durante 30 minutos. Tras añadir una solución saturada de cloruro sódico, la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Luego, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt- hexano: = 2:1), para obtener un material oleoso amarillo, Compuesto 34 (3,36 g, 4,53 mmoles, 86%), en forma de una mezcla  $\alpha$ - $\beta$  (1:4).

IR v max (KBr) : 2934, 2863, 1751, 1365, 1217, 1106  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$  [configuración  $\beta$ ]  $\delta$ : 1,02 (9H, s), 1,77 (3H,s), 1,98 (3H, s), 2,39 (3H, s), 3,61, 3,76 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,21-4,58 (5H, m), 5,26 (1H, d, J = 5 Hz), 5,94 (1H, s), 7,15-7,59 (13H, m), 7,58-7,66 (4H, m), 7,72 (2H, d, J = 8 Hz), [ $\alpha$ -configuration]  $\delta$ : 1,02 (9H, s), 1,98 (3H, s), 2,36 (3H,s), 3,48, 3,58 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,21-4,58 (5H, m), 5,12 (1H, dd, J = 5, 6 Hz), 6,33 (1H, d, J = 5 Hz), 7,15-7,59 (13H,m), 7,58-7,66 (4H, m), 7,72 (2H, d, J = 8 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 14,2, 19,3, 20,5, 20,8, 21,6, 26,7, 26,8, 60,3, 64,8, 69,1, 73,6, 74,1, 78,6, 85,3, 97,4, 127,4, 127,6, 127,7, 127,8, 127,9, 128,0, 128,2, 128,3, 128,4, 129,5, 129,6, 1289,8, 129,9, 132,4, 132,8, 132,9, 135,4, 135,5, 135,6, 136,9, 144,5, 168,7, 169,4. Elevado-MS(FAB) :

Calculado para  $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SSiNa}$  ( $\text{M}^+$ +Na) : 769,2479, Encontrado : 769,2484.

(4) Síntesis de 2'-O-acetil-3'-O-bencil-5'-O-*t*-butildifenilsilil-4'-*p*-toluenosulfoniloximetil-5-metiluridina (Compuesto 35)

En una corriente de nitrógeno, se añadieron 2TMS·T (1,04 g, 4,03 mmoles) y sulfonato de trimetilsilil trifluorometano (730  $\mu\text{l}$ , 4,03 mmoles), enfriando con hielo, a una solución de 1,2-dicloroetano (26 ml) del Compuesto 34 (1,88 g, 2,52 mmoles), y la mezcla se agitó durante 17 horas a temperatura ambiente. Se añadió una solución saturada de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción y el sistema se filtró a través de Celita, seguido de extracción del licor madre con cloroformo. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt- hexano: = 2:3), para obtener un polvo blanco, Compuesto 35 (2,00 g, 2,44 mmoles, 97%).

Punto de ebullición 70-71.5°C.  $[\alpha]_D^{24} + 4,58^\circ$  (c = 1,25, acetona).

IR v max (KBr) : 3059, 2934, 1694, 1465, 1368, 704  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 1,18 (9H, s), 1,63 (3H, d, J = 1 Hz), 2,10(3H, s), 2,42 (3H, s), 3,73, 3,86 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,12, 4,20 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,44, 4,57 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,45 (1H,d, J = 6 Hz), 5,38 (1H, t, J = 6 Hz), 6,02 (1H, d, J = 6 Hz), 7,21-7,60 (13H, m), 7,62-7,69 (7H, m), 8,91 (1H, br s).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 11,9, 19,3, 20,6, 21,6, 27,0, 65,3, 68,6, 74,1, 74,8, 77,2, 77,3, 86,0, 86,4, 111,6, 127,9, 128,0, 128,2, 128,5, 129,7, 130,1, 130,2, 131,8, 132,3, 132,5, 135,3, 135,5, 135,6, 136,8, 144,9, 150,2, 163,4, 170,2. MS (FAB)m/z : 813 ( $\text{M}^+$ +H).

Análisis calculado para  $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SSi}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : C, 60,83; H, 6,17; N, 3,30. Encontrado: C, 60,55; H, 5,78; N, 3,22.

(5) Síntesis de 3'-O-bencil-5'-O-*t*-butildifenilsilil-4'-*p*-toluenosulfoniloximetil-5-metiluridina (Compuesto 36)

5 Se añadieron carbonato potásico (12,75 mg, 0,0923 mmoles) y agua (0,5 ml), enfriando con hielo, a una solución de alcohol metílico (4 ml) del compuesto 35 (250 mg, 0,308 mmoles), y la mezcla se agitó durante 22 horas a temperatura ambiente. Enfriando con hielo, se añadió ácido acético a la mezcla de reacción para neutralizarla, tras lo cual se eliminó el disolvente por destilación bajo presión reducida. Una vez añadida agua al residuo, la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico, y luego se secó sobre sulfato sódico. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, y luego el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt- hexano = 3:2), para obtener un polvo blanco, Compuesto 36 (216,7 mg, 0,283 mmoles, 92%).

10 Punto de fusión 74 - 77°C.  $[\alpha]_D^{23} + 5,15^\circ$  (c = 1.23, CHCl<sub>3</sub>). IR v max (KBr) : 3048, 2934, 1695, 1363, 1181, 1108, 977, 819, 704 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,05 (9H, s), 1,65 (3H, d, J = 1 Hz), 2,39 (3H, s), 3,04 (1H, br d, J = 9 Hz), 3,72 (2H, s), 4,17 (2H, s), 4,18 (1H, d, J = 5 Hz), 4,24-4,32 (1H, m), 4,54, 4,62 (2H, AB, J = 11 Hz), 5,62 (1H, d, J = 6 Hz), 7,19-7,69 (20H, m), 8,46 (1H, br s).

15 <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>c</sub>: 12,1, 19,4, 26,9, 58,8, 72,0, 72,2, 75,8, 76,7, 87,4, 88,8, 110,4, 127,7, 12,79, 128,1, 128,2, 128,5, 128,7, 129,8, 130,0, 130,1, 132,2, 134,3, 135,3, 135,5, 136,8, 149,8, 163,9, MS(FAB) m/z : 771 (M<sup>+</sup>+H).

Análisis calculado para C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>SSi: C, 63,41; H, 6,16; N, 3,51; S, 3,95.

Encontrado : C, 63,87; H, 6,01; N, 3,63; S, 4,16.

(6) Síntesis de 3'-O-bencil-5'-O-t-butildifenilsilil-2'-O,4'-c-metilen-5-metiluridina (Compuesto 37)

20 En una corriente de nitrógeno, se añadió bis(trimetilsilil)amida sódica (1,0 M en THF, 8,47 ml, 8,47 mmoles), enfriando con hielo, a una solución de tetrahidrofurano (30 ml) del Compuesto 36 (1,86 g, 2,42 mmoles), y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió una solución saturada de bicarbonato sódico (14 ml) a la mezcla de reacción, y luego se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida. Una vez añadida agua al residuo, la mezcla se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico, y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt- hexano: = 2:3), para obtener un polvo blanco, Compuesto 37 (1,42 g, 2,37 mmoles, 98%).

25 Punto de fusión 70,5-72°C.  $[\alpha]_D^{22} + 52,47^\circ$  (c = 1.025, acetona). IR v max (KB r): 2936, 1694, 1465, 1275, 1106, 1055, 809, 704 cm<sup>-1</sup>.

30 <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ: 1,21 (9H, s), 1,76 (3H, s), 3,88, 4,07(2H, AB, J = 8 Hz), 4,07, 4,15 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,16 (1H, s), 4,66, 4,80 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,76 (1H, s), 7,34-7,79 (16H, m), 10,0 (1H, br s), MS (FAB) m/z : 599 (M<sup>+</sup>+H).

Análisis calculado para C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si•2H<sub>2</sub>O: C, 64,33; H, 6,03; N, 4,41.

Encontrado: C, 64,58; H, 6,15; N, 4,28.

(7) Síntesis de 3'-O-bencil-2'-O,4'-C-metilen-5-metiluridina (Compuesto 38)

35 En una corriente de nitrógeno, se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en THF, 379 μl, 0,379 μmol) a una solución de tetrahidrofurano (1 ml) del Compuesto 37 (188,7 mg, 0,316 mmoles), y la mezcla se agitó durante 2,5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se destiló a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt- hexano: = 1:1 → 1:0), para obtener un polvo blanco, Compuesto 38 (94,6 mg, 0,262 mmoles, 83%).

IR v max (KBr) : 3424, 3183, 3063, 2950, 1691, 1463, 1273, 1057, 734 cm<sup>-1</sup>.

40 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)δ: 1,90(3H, d, J = 1 Hz), 3,83, 4,05(2H, AB, J = 8 Hz), 3,93, 4,02(2H, AB, J = 12 Hz), 3,94(1H, s), 4,53 (1H, s), 4,56, 4,58(2H, AB, J = 12 Hz), 5,65 (1H, s), 7,32(5H, s), 7,44(1H, d, J = 1 Hz). Elevado-MS (EI):

Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>) : 360,1321. Encontrado: 360,1312.

(8) Síntesis de 2'-O,4'-C-metilen-5-metiluridina (Compuesto 39a)

45 Se añadió Pd(OH)<sub>2</sub>-C al 20% (86,5 mg) a una solución de alcohol metílico (4 ml) del Compuesto 38 (86,5 mg, 0,240 mmoles), y la mezcla se agitó durante 14,5 horas a presión atmosférica en una corriente de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró, y luego el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener cristales incoloros, Compuesto 39 (62,5 mg, 0,230 mmoles, 96%).

Punto de fusión 194-195°C.  $[\alpha]_D^{20} + 53,7^\circ$  (c = 1,02, EtOH). IR v max (KBr) : 3323, 3163, 3027, 2889, 2826, 1689,

1471, 1276, 1057  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1,89 (3H, q,  $J = 1$  Hz), 3,74, 3,95 (2H, AB,  $J = 8$  Hz), 3,90 (1H, s), 4,07 (1H, s), 4,26 (1H, s), 5,53 (1H, s), 7,74 (1H, d,  $J = 1$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_c$ : 12,6, 57,6, 70,3, 72,4, 80,8, 88,3, 90,4, 110,7, 136,8, 151,8, 166,5.

## 5 [Ejemplo 4]

(1) Síntesis de 2'-O-acetil-3'-O-bencil-5'-O-*t*-butildifenilsilil-4'-*p*-toluenosulfoniloximetil- $\text{N}^6$ -benzoiladenosina (Compuesto 40)

10 En una corriente de nitrógeno, se añadieron una solución de 1,2-dicloroetano (5,0 ml) del Compuesto 34 (250 mg, 0,336 mmoles) y sulfonato de trimetilsililfluorometano (6,7  $\mu\text{l}$ , 0,0336 mmoles), a temperatura ambiente, a 2TMS- $\text{A}^{\text{Bz}}$  (128,7 mg, 0,336 mmoles) preparada según la referencia 6) (H. Vorbreggen, K. Krolkiewicz y B. Bennua, Chem. Ber., 114, 1234-1255 (1981)). La mezcla se calentó a reflujo durante 26 horas. Tras añadir una solución saturada de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción, el sistema se extrajo 3 veces con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico, y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante 15 cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CHCl}_3$ - MeOH, 1:3), para obtener un polvo blanco, Compuesto 40 (234,5 mg, 0,253 mmoles, 75%).

Punto de fusión 77-78°C (AcOEt/hexano).  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} - 13,2^\circ$  ( $c = 1,00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). IR v max (KBr): 3058, 2934, 1749, 1703, 1606, 1105  $\text{cm}^{-1}$ .

20  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,99 (9H, s), 2,04 (3H, s), 2,38 (3H, s), 3,7 4, 3,85 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 4,31, 4,43 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 4, 52, 4,58 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 4,81 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 5,94 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 6,04 (1H, d,  $J = 5$  Hz), 7,18 - 7,61 (20H, m), 7,69 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 7,99 (1H, s), 8,01 (2H, d,  $J = 7$  Hz), 8,56 (1H, s), 8,99 (1H, br s).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_c$ : 19,1, 20,5, 21,5, 26,7, 64,1, 68,4, 74,0, 74,6, 77,9, 86,57, 86,64, 123,4, 127,7, 127,8, 127,9, 128,1, 128,5, 128,8, 129,6, 129,9, 132,0, 132,3, 132,6, 132,7, 133,5, 135,4, 135,5, 136,8, 142,0, 144,7, 149,6, 151,2, 152,6, 164,5, 169,8, MS(FAB)  $m/z$ : 926 ( $\text{M}^+\text{H}$ ).

25 (2) Síntesis de 3'-O-bencil-5'-O-*t*-butildifenilsilil-4'-*p*-toluenosulfoniloximetil- $\text{N}^6$ -benzoiladenosina (Compuesto 41)

30 Se añadió carbonato potásico (15,0 mg, 0,109 mmoles) a temperatura ambiente, a una solución de alcohol metílico (3,0 ml) del Compuesto 40 (167,9 mg, 0,182 mmoles), y la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió ácido clorhídrico concentrado a la mezcla de reacción para neutralizarla, tras lo cual, el sistema se extrajo 3 veces con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico, y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CHCl}_3$ - MeOH, 30:1), para obtener un polvo blanco, Compuesto 41 (140,5 mg, 0,160 mmoles, 88%).

Punto de fusión 82-83°C (AcOEt-hexano).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 6,02^\circ$  ( $c = 0,96$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). IR v max(KBr): 3306, 3066, 2935, 2859, 1701, 1611  $\text{cm}^{-1}$ .

35  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,98 (9H, s), 2,37 (3H, s), 3,76 (2H, s), 4, 39, 4,45 (1H, AB,  $J = 11$  Hz), 4,54 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 4,67, 4, 76 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 4,85 (1H, dd,  $J = 5, 6$  Hz), 5,79 (1H, d,  $J = 5$  Hz), 7,20 - 7,58 (21H, m), 7,73 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 7,80 (1H, s), 7,96 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 8,49 (1H, s), 9,18 (1H, br s).

40  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_c$ : 19,1, 21,6, 26,8, 64,4, 68,9, 74,1, 74,6, 79,2, 86,8, 89,8, 123,1, 127,7, 127,8, 128,0, 128,2, 128,4, 128,6, 128,8, 129,7, 130,0, 132,1, 132,5, 132,6, 132,8, 133,4, 135,4, 135,5, 136,8, 142,1, 144,8, 149,4, 152,3, 164,5.

(3) Síntesis de 3'-O-bencil-5'-O-*t*-butildifenilsilil-2'-O,4'-C-metilen- $\text{N}^6$ -benciladenosina (Compuesto 42)

45 En una corriente de nitrógeno, se añadió bis(trimetilsilil)amida sódica (1,0 M en THF, 0,58 ml, 0,572 mmoles) a una solución de tetrahidrofurano (8,0 ml) del Compuesto 41 (210,5 mg, 0,238 mmoles) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadió una solución saturada de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción, y luego el sistema se extrajo 3 veces con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico, y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CHCl}_3$ - MeOH, 30:1), para obtener un polvo blanco, Compuesto 42 (169,5 mg, 0,238 mmoles, cuant.).

Punto de fusión 80- 81°C. IR v max (KBr): 3259, 3064, 2932, 2858, 1703, 1607  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 1,07 (9H, s), 3,95, 4,10 (2H, AB,  $J = 8$  Hz), 4, 02 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 4,56, 4,64 (2H, AB,  $J = 12$  Hz), 4,26 (1H, s), 4,86 (1H, s), 6,14 (1H, s), 7,26 - 7,70 (18H, m), 8,04 (2 H, d,  $J = 7$  Hz), 8,22 (1H, s), 8,78 (1H, s), 9,18 (1H, brs).

5  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta_c$ : 19,2, 26,5, 26,8, 29,7, 59,2, 72,4, 72,6, 7 6,5, 76,8, 86,7, 88,6, 123,4, 127,7, 127,8, 127,9, 128,1, 128,4, 128,8, 129,5, 130,0, 132,4, 132,5, 132,8, 133,5, 134,8, 135,2, 135,5, 135,6, 136,8, 140,4, 152,7.

(4) Síntesis de 3'-O-bencil-2'-O,4'-C-metilen- $\text{N}^6$ -benzoiladenosina (Compuesto 43)

10 Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en THF, 1,0 ml, 1,0 mmoles), a temperatura ambiente, a una solución de tetrahydrofurano (7,0 ml) del Compuesto 42 (173,6 mg, 0,244 mmoles), y la mezcla se agitó durante 25 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se destiló a presión reducida y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CHCl}_3$ - MeOH, 15:1), para obtener un polvo blanco, Compuesto 43 (115,4 mg, 0,244 mmoles, cuant.).

Punto de fusión 154 - 155°C ( $\text{Et}_2\text{O}$ ). IR v max(KBr): 3339, 2944, 1701, 1611  $\text{cm}^{-1}$ .

15  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 3,91, 4,13 (2H, AB,  $J = 8$  Hz), 3,93, 4,01 (2H, AB,  $J = 12$  Hz), 4,38 (1H, s), 4,64 (1H, s), 4,85 (1H, s), 6,08 (1H, s), 7,29 (1H, s), 7,51 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 7,58 (1H, d,  $J = 7$  Hz), 8,05 (2H, d,  $J = 7$  Hz), 8,14 (1H, s), 8,75(1H, s), 9,50 (1H, br s).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta_c$ : 57,1, 72,4, 77,0, 77,1, 86,9, 88,6, 122,9, 127,6, 128,0, 128,1, 128,4, 128,7, 132,8, 133,5, 136,9, 140,5, 149,8, 150,5, 152,8, 165,0.

#### [Ejemplo 5]

20 (1) Síntesis de 2'-O-acetil-3'-O-bencil-5'-O-*t*-butildifenilsilil-4'-*p*-toluenosulfoniloximetil- $\text{N}^2$ -isobutirilguanosina (Compuesto 44)

25 En una corriente de nitrógeno, se añadieron una solución de 1,2-dicloroetano (5,0 ml) del Compuesto 4 (250 mg, 0,336 mmoles) y sulfonato de trimetilsililtrifluorometano (6,7  $\mu\text{l}$ , 0,0336 mmoles), a temperatura ambiente, a 3TMS-G<sup>iBu</sup> (146,8 mg, 0,336 mmoles), preparada según la referencia 6 mencionada anteriormente. La mezcla se calentó a reflujo durante 15 horas. Tras añadir una solución saturada de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción, el sistema se extrajo 3 veces con cloruro de metileno, y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CHCl}_3$ - MeOH, 30:1), para obtener un polvo blanco, Compuesto 44 (213,6 mg, 0,235 mmoles, 70%).

30 Punto de fusión 96-97°C (AcOEt-hexano).  $[\alpha]_D^{24} -11.09^\circ$  ( $c = 0,97$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). IR v max (KBr): 3152, 3065, 2934, 1746, 1681, 1606  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0,96 (9H, s), 1,10 (3H, d,  $J = 9$  Hz), 1,13 (3H, d,  $J = 9$  Hz), 1,98 (3H, s), 2,36 (3H, s), 2,48 (1H, m), 3,65, 3,72 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 4,23, 4,43 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 4,47 (2H, s), 4,63 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 5,74 (1H, t,  $J = 6$  Hz), 5,96 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 7,14 - 7,68 (20H, m), 9,15 (1H, s), 12, 20 (1H, s).

35  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta_c$ : 19,1, 19,3, 19,4, 20,8, 21,9, 27,0, 27,2, 36, 5, 64,5, 68,9, 74,4, 74,9, 76,7, 86,1, 86,7, 122,0, 127,6, 12 7,7, 127,9, 128,1, 128,3, 128,4, 128,8, 130,1, 130,4, 132,3, 132,7, 132,9, 135,7, 135,8, 137,3, 137,8, 145,2, 147,8, 148,5, 156,2, 170,2, 178,8.

(2) Síntesis de 3'-O-bencil-5'-O-*t*-butildifenilsilil-4'-*p*-toluenosulfoniloximetil- $\text{N}^2$ -isobutirilguanosina (Compuesto 45)

40 Se añadió carbonato potásico (15,8 mg, 0,113 mmoles) a una solución de alcohol metílico (3,0 ml) del Compuesto 44 (137,0 mg, 0,151 mmoles), y la mezcla se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se añadió ácido clorhídrico concentrado a la mezcla de reacción para neutralizarla, tras lo cual el sistema se extrajo 3 veces con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con una solución de cloruro sódico saturado, y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CHCl}_3$ - MeOH, 30:1), para obtener un polvo blanco, Compuesto 45 (83,4 mg, 0,097 mmoles, 64%).

45 Punto de fusión 102-103°C (AcOEt-hexano)  $[\alpha]_D^{25} - 2,00^\circ$  ( $c = 0,40$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). IR v max(KBr): 3166, 2932, 1684, 1607  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0,90 (9H, s), 1,09 (3H, d,  $J = 7$  Hz), 1,13 (3H, d,  $J = 7$  Hz), 2,30 (1H, m), 2,37 (3H, s), 3,71, 3,76

(2H, AB, J = 11 Hz), 4,32, 4,48 (2H, AB, J = 11 Hz), 4,35 (1H, d, J = 6 Hz), 4,63, 4,90 (2H, AB, J = 12 Hz), 4,96 (1H, t, J = 6 Hz), 5,67 (1H, d, J = 7 Hz), 7,17 - 7,71 (20H, m), 8,82 (1H, s), 12,05 (1H, br s).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta_c$ : 18,7, 19,0, 21,6, 26,5, 36,2, 63,5, 69,1, 73,7, 74,3, 78,8, 86,2, 89,5, 127,7, 127,8, 128,0, 128,1, 128,5, 129,7, 130,0, 132,0, 132,6, 132,7, 135,3, 135,4, 137,4, 138,2, 144,8, 146,9, 155,5, 178,5.

5 (3) Síntesis de 3'-O-bencil-5'-O-*t*-butildifenilsilil-2'-O,4'-C-metilen-N<sup>2</sup>-isobutirilguanosina (Compuesto 46)

10 En una corriente de nitrógeno, se añadió bis(trimetilsilil)amida sódica (1,0 M en THF, 0,31 ml, 0,315 mmoles) a una solución de tetrahydrofurano (3,0 ml) del Compuesto 45 (92,1 mg, 0,102 mmoles) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadió una solución saturada de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción y luego se extrajo el sistema 3 veces con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro sódico, y luego se secó sobre sulfato sódico. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl<sub>3</sub>- MeOH, 25:1), para obtener un polvo blanco, Compuesto 46 (31,4 mg, 0,160 mmoles, 44%).

15 Punto de fusión 99-100°C. IR v max(KBr): 3162, 3068, 2932, 1683, 1610 cm<sup>-1</sup>. H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 1,06 (9H, s), 1,25 (3H, d, J = 7 Hz), 1,27 (3H, d, J = 7 Hz), 2,64 (1H, m), 3,83, 4,01 (2H, AB, J = 8 Hz), 3,97 (2H, d, J = 7 Hz), 4,18 (1H, s), 4,51 (1H, s), 4,54 (2H, d, J = 2 Hz), 5,77 (1H, s), 7,17-7,42 (5H, m), 7,64 - 7,72 (10H, m), 7,84 (1H, s), 9,03 (1H, s), 12,08 (1H, br s).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta_c$ : 18,9, 19,0, 19,1, 26,5, 26,7, 36,4, 59,1, 72,4, 72,5, 76,8, 77,5, 86,3, 88,3, 121,7, 127,6, 127,7, 127,8, 127,9, 128,1, 128,4, 129,6, 130,0, 132,36, 132,42, 134,8, 135,45, 135,54, 135,8, 136,8, 146,8, 147,7, 155,4, 178,6.

20 (4) Síntesis de 3'-O-bencil-2'-O,4'-C-metilen-N<sup>2</sup>-isobutirilguanosina (Compuesto 47)

25 Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en THF, 0,90 ml, 0,90 mmoles), a temperatura ambiente, a una solución de tetrahydrofurano (3,0 ml) del Compuesto 46 (41,3 mg, 0,060 mmoles), y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se destiló a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOH- EtOH, 20:1), para obtener un polvo blanco, Compuesto 47 (27,1 mg, 0,060 mmoles, cuant.).

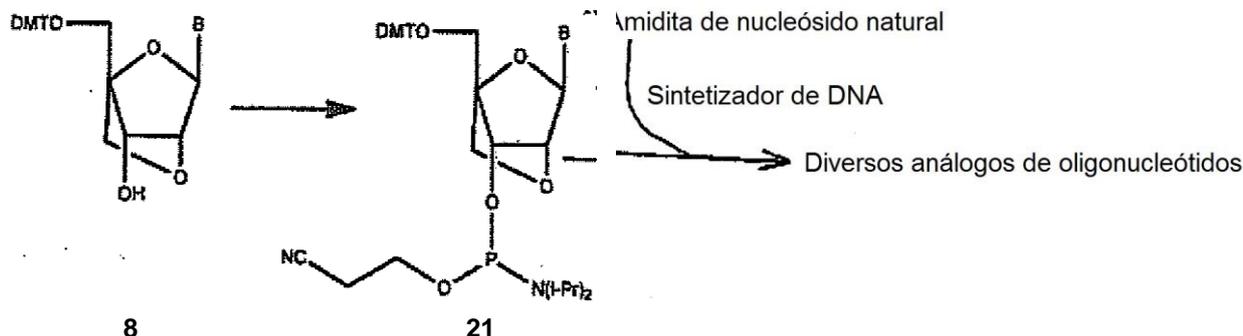
Punto de fusión 228 - 229°C(Et<sub>2</sub>O).  $[\alpha]_D^{25} + 32,90^\circ$  (c = 0,875, CHCl<sub>3</sub>).

IR v max (KBr) : 3162, 2934, 1683, 1608 cm<sup>-1</sup>.

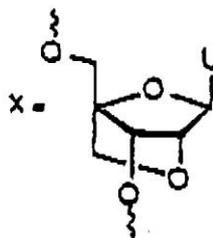
30  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 1,24 (3H, d, J = 7 Hz), 1,26 (3H, d, J = 7 Hz), 2,76 (1H, m), 3,83, 4,03 (2H, AB, J = 8 Hz), 3,92, 4,02 (2H, AB, J = 13 Hz), 4,33 (1H, s), 4,55 (1H, s), 4,62 (2H, s), 5,80 (1H, s), 7,25 (5H, s), 7,91 (1H, s), 9,85 (1H, s), 12,05 (1H, s).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta_c$ : 19,19, 19,25, 36,4, 57,4, 72,5, 77,0, 77,5, 86,5, 88,8, 121,0, 127,8, 128,1, 128,2, 128,3, 128,4, 128,6, 137,1, 137,5, 147,5, 148,2, 155,7, 179,9.

**[Ejemplo 6]** Síntesis de análogo de oligonucleótido



5'-GCGXTTTTTGCT-3' (XT8)  
 5'-GCGTTXTTTGCT-3' (T2XT3)  
 5'-GCGTTTXXTTGCT-3' (T3XT2)  
 5'-GCGTTTTTXGCT-3' (T8X)  
 5'-GCGXXTTTTGCT-3' (X2T4)  
 5'-GCGTTXXTTGCT-3' (T2X2T2)  
 5'-GCGTTTTXXGCT-3' (T4X2)  
 5'-GCGXXXXXXGCT-3' (X6)  
 5'-GTTTTTTTTTXXC-3' (X2)



(1) 3'-O-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino]-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O,4'-metanouridina (Compuesto 21)

5 El Compuesto 8 (200 mg, 0,31 mmoles) y tetrazolida de diisopropilamonio (39,6 mg, 0,23 mmoles) se sometieron a azeotropía con CH<sub>3</sub>CN anhidro tres veces, y luego el sistema se convirtió en una solución de CH<sub>3</sub>CN- THF anhidro (3:1, 4 ml). En una corriente de nitrógeno, se añadió N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita de 2-cianoetilo (0,12 ml, 0,37 mmoles), y la mezcla se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, y el producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt:hexano: Et<sub>3</sub>N= 75:25:1). Luego, el producto purificado se volvió a precipitar desde AcOEt-hexano para obtener un compuesto de amidita 21 (181 mg, 0,25 mmoles, 81%).

Punto de fusión 71-74°C (AcOEt-hexano).

<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 149,6, 149,5, 149,4, 149,3, 149,2.

(2) Síntesis general de análogos de oligonucleótidos

15 La síntesis de un oligómero se realizó mediante un sintetizador de DNA de Pharmacia, Gene Assembler Plus, en una escala de 0,2 μmoles. Las concentraciones de disolventes, reactivos, y fosforamidita fueron las mismas que para la síntesis de DNA natural. Un grupo DMTr de 5'-O-DMTr-timidina (0,2 μmoles) que tenía un grupo 3'-hidroxilo unido a un soporte CPG, se desprotegió con ácido tricloroacético. Sobre su grupo 5'-hidroxilo, la reacción de condensación se repitió usando una amidita que comprendía cuatro bases de ácido nucleico para la síntesis de DNA natural y el Compuesto 21 para sintetizar análogos de oligonucleótidos de las secuencias respectivas. El ciclo sintético fue como sigue:

Ciclo sintético (escala de 0,2 μmoles)

1) Destritilación CCl<sub>3</sub>COOH al 1% en CH<sub>2</sub>ClCH<sub>2</sub>Cl, 6 segundos

2) Acoplamiento fosforamidita 0,1 M (25 equiv.),

1H-tetrazol 0,5 M (500 equiv.) en MeCN, 2 minutos.

25 3) Protección terminal 4-(dimetilamino)piridina al 3%, Ac<sub>2</sub>O al 10%, en MeCN, 18 segundos

4) Oxidación I<sub>2</sub> 0,01 M en 2,4,6-colidina/H<sub>2</sub>O/MeCN (1:5:11), 6 segundos

El oligómero sintetizado se escindió del soporte mediante tratamiento con amoníaco concentrado en la forma habitual. Al mismo tiempo, el grupo cianoetilo protector se separó del átomo de fósforo, y los grupos protectores para

la adenina, guanina y citosina, también se eliminaron.

El análogo de oligonucleótido 5'-O-dimetoxitritilado resultante se liberó del grupo DMTr mediante el uso de 5 ml de ácido trifluoroacético sobre una columna cromatográfica de fase inversa (Millipore, Oligo-Pak<sup>TM</sup>SP), y se purificó posteriormente para obtener el análogo de oligonucleótido deseado.

5 Según el método anterior para síntesis general, se sintetizaron los siguientes análogos de oligonucleótidos:

(2) 5'-GCGXTTTTTGCT-3' (XT5)

Rendimiento 0,06  $\mu$ moles (rendimiento 30%)

(3) 5'-GCGTXXTTTGCT-3' (T2XT3)

Rendimiento 0.05  $\mu$ moles (rendimiento 25%)

10 (4) 5'-GCGTTXXTTGCT-3' (T3XT2)

Rendimiento 0.03  $\mu$ moles (rendimiento 15%)

(5) 5'-GCGTTTTXXGCT-3' (T5X)

Rendimiento 0.06  $\mu$ moles (rendimiento 30%)

(6) 5'-GCGXXTTTTGCT-3' (X2T4)

15 Rendimiento 0.06  $\mu$ moles (rendimiento 30%)

(7) 5'-GCGTXXTTGCT-3' (T2X2T2)

Rendimiento 0.05  $\mu$ moles (rendimiento 25%)

(8) 5'-GCGTTTTXXGCT-3' (T4X2)

Rendimiento 0.06  $\mu$ moles (rendimiento 30%)

20 (9) 5'-GCGXXXXXXGCT-3' (X6)

Rendimiento 0.06  $\mu$ moles (rendimiento 30%)

(10) 5'-GTTTTTTTTTXXC-3' (X2)

Rendimiento 0.07  $\mu$ moles (rendimiento 35%).

[Ejemplo Experimental 1] Medición de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>)

25 Se midieron las temperaturas de fusión (T<sub>m</sub>) de productos de anillamiento entre hebras no codificantes, que eran los diversos análogos de oligonucleótidos sintetizados en el Ejemplo 2, y hebras codificantes de DNA o RNA natural, para investigar la capacidad de hibridación de los análogos de oligonucleótidos de la presente invención para DNA y RNA complementario.

30 Cada solución de muestra (500  $\mu$ l) con concentraciones finales de NaCl 100 mM, tampón de fosfato sódico 10 mM (pH 7,2), hebra no codificante 4  $\mu$ M, y hebra codificante 4  $\mu$ M, respectivamente, se bañó en agua hirviendo y se enfrió lentamente hasta temperatura ambiente a lo largo de 10 horas. La solución de muestra se enfrió gradualmente hasta 5°C, se mantuvo a 5°C durante un período adicional de 20 minutos, y luego comenzó a medirse, con una corriente de nitrógeno que se hacía pasar a través de una cámara celular de un espectrofotómetro (UV-2100 PC, Shimadzu) para la prevención de la condensación de humedad. La temperatura de la muestra se incrementó a una velocidad de 0,2°C/minuto hasta 90°C, y se midió la absorción de ultravioleta a 260 nm a intervalos de 0,1°C. Para evitar cambios en la concentración de la muestra, la célula estaba provista de un cierre, y se aplicó una gota de aceite mineral sobre la superficie de la solución de muestra durante la medición.

35

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1 Temperaturas de fusión (Tm) de análogos de oligonucleótidos no codificantes para DNA y RNA complementarios.

Molécula no codificante	Tm para DNA <sup>a)</sup> complementario ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ )	Tm para RNA <sup>b)</sup> complementario ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ )
5' -GCGTTTTTTGCT-3' (natural)	47°C	45°C
5' -GCGXTTTTTGCT-3' (XT5)	50°C (+3°C)	49°C (+4°C)
5' -GCGTXXTTTGCT-3' (T2XT3)	49°C (+2°C)	49°C (+4°C)
5' -GCGTTTXXTGCT-3' (T3XT2)	49°C (+2°C)	50°C (+5°C)
5' -GCGTTTTXXGCT-3' (T5X)	52°C (+4°C)	51°C (+6°C)
5' -GCGXXTTTTGCT-3' (X2T4)	51°C (+2°C)	53°C (+4°C)
5'-GCGTXXXTTGCT-3' (T2X2T2)	49°C (+1°C)	53°C (+4°C)
5' -GCGTTTTXXGCT-3' (T4X2)	54°C (+3,5°C)	55°C (+5°C)
5' -GCGXXXXXXGCT-3' (X6)	58°C (+1,8°C)	71°C (+4,3°C)

5 a): 3'-CGCAAAAACGA-5'. b): 3'-r(CGCAAAAACGA).

Según se muestra en la tabla, en el caso del oligómero que tiene una o dos unidades (X) del análogo de nucleósido (fórmula general (Ia)) introducido en una hebra de DNA natural, la capacidad de hibridar con el oligómero de DNA complementario, evaluada mediante la Tm, aumentó en 2 a 7 grados (aproximadamente 2 grados por residuo modificado) en comparación con la hebra natural. Con el oligómero teniendo todas sus T sustituidas por X (X6), el incremento en la capacidad era nada menos que 11 grados. Cuando se evaluaba la capacidad de hibridar con RNA complementario, el oligómero que incorporaba una o dos X tenía un incremento de Tm de 4-10 grados (4 a 6 grados por residuo modificado) sobre la hebra natural. En el caso de X6, la capacidad de hibridar con RNA complementario se incrementaba más, mostrando un incremento de Tm de más de 25 grados (4 grados por residuo modificado). No hay ningún ejemplo de análogos que experimenten estos incrementos en Tm en comparación con las hebras naturales, y la afinidad del oligómero reivindicado era mayor para RNA que para DNA. Estos hechos significan que el análogo de oligonucleótido compuesto por el análogo de bicíclonucleósido tiene un rendimiento extremadamente elevado como molécula no codificante, y es útil como material para fármacos.

[Ejemplo Experimental 2] Medición de la resistencia a nucleasa

20 Se mezcló una solución tampón (0,003 U/ml, 400  $\mu$ l) de una fosfodiesterasa de veneno de serpiente, con una solución tampón (10  $\mu$ M, 400  $\mu$ l) del oligonucleótido mantenido a 37°C durante 15 minutos. La solución mixta se colocó en una célula de cuarzo (800  $\mu$ l) mantenida a 37°C, y se midieron los incrementos en absorción de ultravioletas (260 nm), debidos a la descomposición del oligonucleótido a lo largo del tiempo, mediante SHIMADZU UV-2100PC. El tampón usado comprendía Tris-HCl 0,1 M (pH 8,6), NaCl 0,1 M, y MgCl<sub>2</sub> 14 mM, y se desgasificó suficientemente antes de la medición.

25 Medición de la semivida ( $t_{1/2}$ ):

Se realizó un cálculo del promedio de valores de la absorción de UV medida al principio de la medición ( $t=0$ ) y la medida en el momento en el que no se percibía ningún incremento en este parámetro. El tiempo correspondiente a este promedio se denominó vida media ( $t_{1/2}$ ).

Secuencia de oligonucleótido	$t_{1/2}$ (segundos)
5'-GTTTTTTTTTTC-3' (tipo natural)	260
5'-GTTTTTTTTT-XX-C-3' (X2)	850

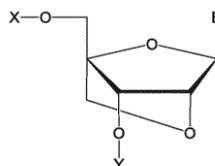
Los gráficos que muestran la evolución temporal de la absorción ultravioleta se presentan como Fig. 1 (hebra natural) y Fig. 2 (X2). La absorción de ultravioleta alcanzó una meseta en aproximadamente 30 minutos para la hebra natural, y aproximadamente 90 minutos para X2, tras la iniciación de la reacción enzimática.

#### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- 5 El uso de este análogo proporciona una molécula de análogo de oligonucleótido no codificante, que es mínimamente hidrolizable con una enzima *in vivo*, tiene una elevada capacidad de unión a la hebra codificante, y se sintetiza fácilmente.

La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes cláusulas numeradas.

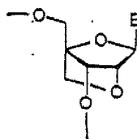
1. Un análogo de nucleósido que tiene la siguiente fórmula general (I)



(I)

- 10 en la que B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, o uno de sus análogos, y X e Y son idénticos o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo aralquilo, un grupo arilo, un grupo acilo, o un grupo sililo, o uno de sus derivados amidita.

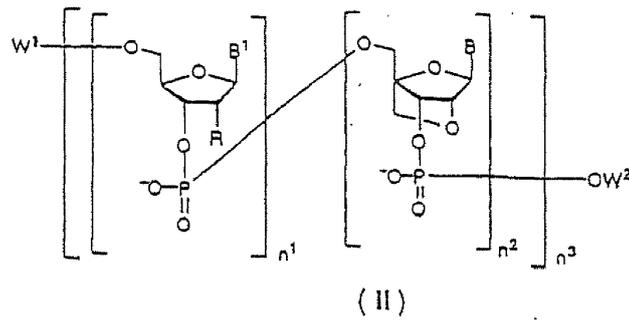
- 15 2. Un análogo de nucleósido según la cláusula 1, en el que X e Y representan cada uno un átomo de hidrógeno.  
 3. Un derivado de amidita de mononucleósido, según la cláusula 1 en el que X es 4,4-dimetoxitritilo (DMTr), e Y es un grupo 2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino (grupo amidita).  
 4. Un análogo de oligonucleótido o de polinucleótido que tiene una o más estructuras de fórmula general (Ia)



(Ia)

- 20 donde B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, o un análogo de las mismas.

5. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido de fórmula general (II)



5 donde B<sup>1</sup> y B son idénticos o diferentes, y cada uno representa una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, o un análogo de las mismas, R es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno o un grupo alcoxi, W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son idénticos o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo alquínico, un grupo cicloalquilo, un grupo aralquilo, un grupo arilo, un grupo acilo, un grupo sililo, un residuo de ácido fosfórico, un nucleósido natural un nucleósido sintético unido mediante un enlace fosfodiéster, o un oligonucleótido o polinucleótido que contiene el nucleósido, n<sup>1</sup> o n<sup>2</sup> son idénticos o diferentes, y cada uno denota un número entero de 0 a 50, siempre que n<sup>1</sup> o n<sup>2</sup> no sean cero al mismo tiempo, y que no todos los n<sup>2</sup> sean cero al mismo tiempo, n<sup>3</sup> denota un número entero de 1 a 50, siempre que cuando n<sup>1</sup> y/o n<sup>2</sup> sean/sea 2 o más, no es necesario que B<sup>1</sup> y B sean idénticos, y no es necesario que los R sean idénticos.

10

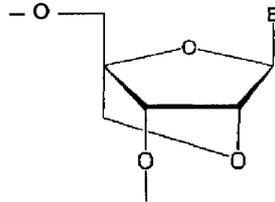
## LISTA DE SECUENCIAS

- Nombre del solicitante: Takeshi Imanishi  
 Título de la invención: Nuevo análogo de bicliconucleósido y oligonucleótido.
- 5 N° de Referencia:  
 N° de Solicitud:  
 Fecha de solicitud: marzo, 1998  
 N° de Prioridad: JPA 53409/97  
 Fecha de prioridad: 7 de marzo de 1997
- 10 Número de secuencias: 11
- SEQ ID. N°: 1  
 Longitud de secuencia: 12  
 Tipo de secuencia: Nucleótido  
 15 Número de hebras: monocatenario  
 Topología: lineal  
 Secuencia: 5'-GCGTTTTTTGCT-3'
- SEQ ID N°: 2  
 Longitud de secuencia: 12  
 Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
 Número de hebras: Monocatenario  
 Topología: Lineal  
 20 Secuencia: 5'-GCGXTTTTTGCT-3'
- SEQ ID N°: 3  
 Longitud de secuencia: 12  
 Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
 Número de hebras: Monocatenario  
 Topología: Lineal  
 25 Secuencia: 5'-GCGTTXTTTGCT-3'
- SEQ ID N°: 4  
 Longitud de secuencia: 12  
 Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
 Número de hebras: Monocatenario  
 Topología: Lineal  
 30 Secuencia: 5'-GCGTTTXXTTGCT-3'
- SEQ ID N°: 5  
 Longitud de secuencia: 12  
 Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
 Número de hebras: Monocatenario  
 Topología: Lineal  
 35 Secuencia: 5'-GCGTTTTTXGCT-3'
- SEQ ID N°: 6  
 Longitud de secuencia: 12  
 Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
 Número de hebras: Monocatenario  
 Topología: Lineal  
 40 Secuencia: 5'-GCGXTTTTGCT-3'
- SEQ ID N°: 7  
 Longitud de secuencia: 12  
 Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
 Número de hebras: Monocatenario  
 Topología: Lineal  
 45 Secuencia: 5'-GCGTTXXTTGCT-3'
- 50  
 55  
 60

- 5 SEQ ID Nº: 8  
Longitud de secuencia: 12  
Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
Número de hebras: Monocatenario  
Topología: Lineal  
Secuencia: 5'-GCGTTTTXXGCT-3'
- 10 SEQ ID Nº: 9  
Longitud de secuencia: 12  
Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
Número de hebras: Monocatenario  
Topología: Lineal  
Secuencia: 5'-GCGXXXXXXGCT-3'
- 15 SEQ ID Nº: 10  
Longitud de secuencia: 13  
Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
Número de hebras: Monocatenario  
Topología: Lineal  
20 Secuencia: 5'-GTTTTTTTTTTC-3'
- 25 SEQ ID Nº: 11  
Longitud de secuencia: 13  
Tipo de secuencia: Nucleótido, análogo de nucleótido  
Número de hebras: Monocatenario  
Topología: Lineal  
Secuencia: 5'-GTTTTTTTTXXTC-3'

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico donde dicho análogo de oligonucleótido o polinucleótido comprende una o más estructuras de fórmula general (Ia)

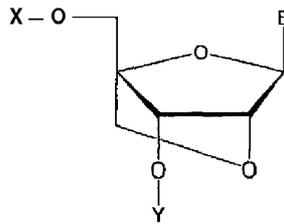


5

(Ia)

donde B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina.

2. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según la reivindicación 1, donde dicho oligonucleótido se prepara a partir de al menos un análogo de nucleósido de la siguiente fórmula general (I)



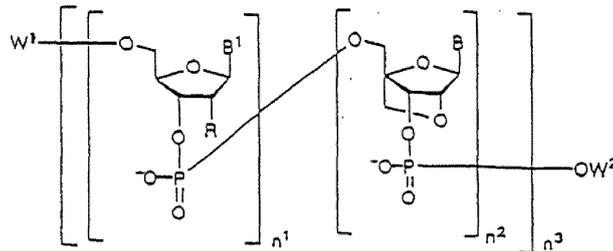
10

(I)

donde B es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, o un análogo de las mismas, y X e Y son idénticos o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo aralquilo seleccionado entre bencilo y 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr), un grupo arilo, un grupo acilo, o un grupo sililo o un derivado amidita de los mismos.

15

3. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según la reivindicación 1, que tiene la fórmula general (II)



(II)

20

donde B<sup>1</sup> y B son idénticos o diferentes, y cada uno representa una base de ácido nucleico de pirimidina o purina, o un análogo de los mismos, R es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno, o un grupo alcoxi, W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son idénticos o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo aralquilo seleccionado entre bencilo y 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr), un grupo arilo, un grupo acilo, un grupo sililo, un residuo ácido fosfórico, un nucleósido natural o un

25

- 5 nucleósido sintético unido mediante un enlace fosfodiéster, o un oligonucleótido o polinucleótido que contiene el nucleósido,  $n^1$  o  $n^2$  son idénticos o diferentes, y cada uno denota un número entero de 0 a 50, siempre que los  $n^1$  o  $n^2$  no sean cero al mismo tiempo, y siempre no todos los  $n^2$  sean cero al mismo tiempo,  $n^3$  denota un número entero de 1 a 50, siempre que cuando  $n^1$  y/o  $n^2$  sean/sea 2 o más, no es necesario que  $B^1$  y B sean idénticos, y no es necesario que los R sean idénticos.
- 10 4. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina se selecciona entre timina, uracilo, citosina, adenina, guanina o un derivado de los mismos.
- 15 5. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina del análogo de nucleósido es timina o un derivado de la misma.
- 20 6. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina del análogo de nucleósido es uracilo o un derivado de la misma.
- 25 7. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina del análogo de nucleósido es citosina o un derivado de la misma.
- 30 8. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina del análogo de nucleósido es adenina o un derivado de la misma.
- 35 9. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina del análogo de nucleósido es guanina o un derivado de la misma.
- 40 10. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según la reivindicación 1, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina es timina.
11. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según la reivindicación 1, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina es uracilo.
12. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según la reivindicación 1, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina es guanina.
13. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según la reivindicación 1, donde la base de ácido nucleico de pirimidina o purina es adenina.
14. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde dicho análogo de nucleósido está presente en dos o más localizaciones en el análogo

de oligonucleótido, de tal forma que están separadas entre sí a través de uno o más nucleótidos presentes en la naturaleza.

5 15. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la longitud del análogo de oligonucleótido es de 2 a 50, más preferiblemente de 10 a 30, unidades de nucleósido.

16. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido para uso farmacéutico según la reivindicación 15, donde la longitud del análogo de oligonucleótido es de 2 a 10 unidades de nucleósido.

10

17. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para usarlo para inhibir la biosíntesis de una proteína potencialmente patógena.

15

18. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para usarlo para inhibir la transcripción hacia RNA mensajero.

19. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para usarlo como antivírico.

20

20. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para usarlo para suprimir la proliferación de un virus que ha infectado.

21. Un análogo de oligonucleótido o polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para usarlo como antineoplásico.

25

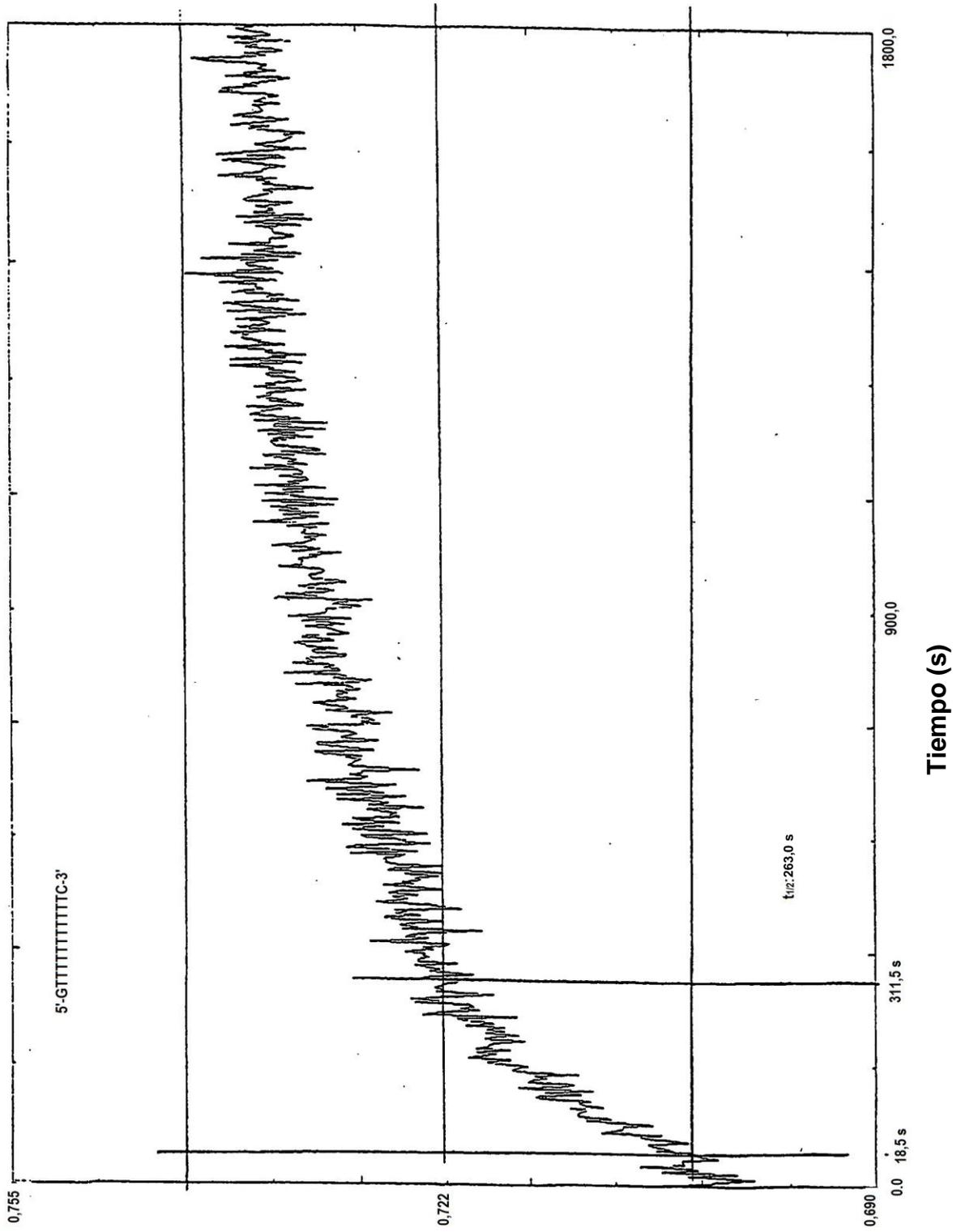


Fig. 1

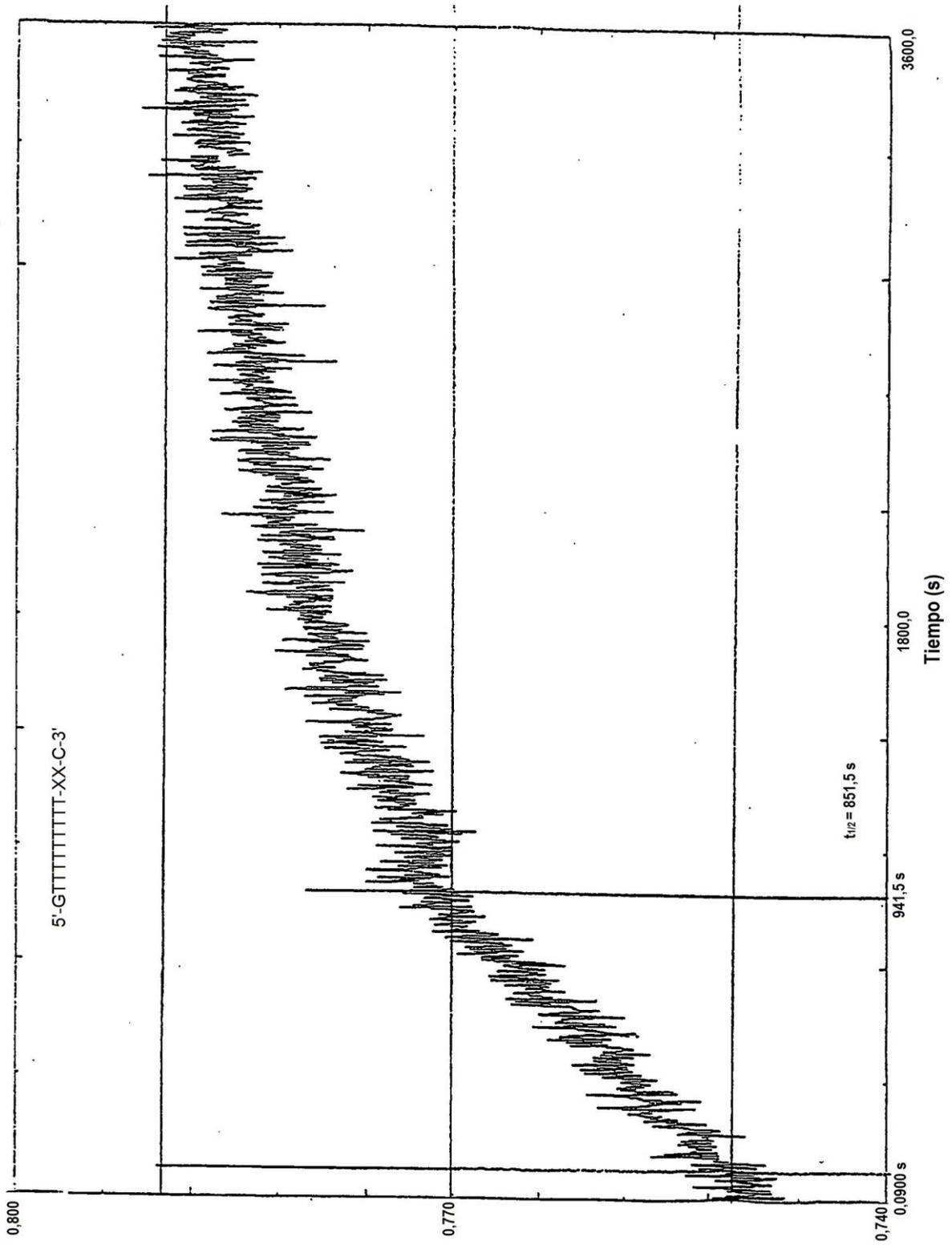


Fig. 2