

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 189**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/00** (2006.01)

**C07H 19/10** (2006.01)

**C07H 19/167** (2006.01)

**C07H 19/20** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 19/067** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08851003 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2217612**

54 Título: **Preparación de oligómero nucleotídico**

30 Prioridad:

**13.11.2007 KR 20070115302**

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

**04.12.2015**

73 Titular/es:

**ST PHARM CO. LTD. (100.0%)  
1241-2 Jeongwang-dong Siheung-si  
Kyonggi do, KR**

72 Inventor/es:

**JUNG, KYEONG-EUN;  
KAYUSHIN, ALEXEI;  
KIM, MOON HEE;  
KIM, KYOUNG-IL;  
KIM, SUNGWON y  
JI, YUMI**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

ES 2 553 189 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

Preparación de oligómero nucleotídico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para preparar oligómeros nucleotídicos. Más específicamente, la presente invención se refiere a la síntesis en fase sólida de oligorribonucleótidos.

10 **Antecedentes de la técnica**

Se conocen una variedad de técnicas para la preparación de oligómeros nucleotídicos.

Por ejemplo, los métodos de preparación de oligómeros nucleotídicos se pueden hallar en las siguientes referencias:

- 15 Khorana *et al.*, *J. Molec. Biol.* 72:209 (1972); Reese, *Tetrahedron Lett.* 34:3143 (1978); Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22:1859 (1981); Patente Estadounidense N° 5.149.798; Agrawal y Goodchild, *Tetrahedron Lett.* 28:3539 (1987); Connolly *et al.* *Biochemistry* 23, 3443 (1984); Jager *et al.*, *Biochemistry* 27:7237 (1988); Agrawal *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7079 (1988), por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, vol. 20, *Protocols for Oligonucleotides and Analogs*, págs 63-80 (S. Agrawal, Ed, Humana Press 1993); *Methods in Molecular Biology*, vol. 206: *Protocols for Oligonucleotide Conjugates* (Agrawal Ed., Humana Press, Totowa, N.J. 1994); *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* págs.155-183 (Eckstein, Ed., IRL Press, Oxford 1991); *Antisense Res. and Applns.* pág 375 (Crooke y Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla. 1993); y *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Erickson e Izant, eds., Raven Press, Nueva York, 1992).

- 25 El ARN antisentido se hibrida a moléculas de ácido nucleico para dar lugar a la inhibición de la expresión génica. Muchos investigadores han informado de la inhibición de la expresión de genes específicos o viabilidad terapéutica de enfermedades particulares mediante el uso del ARN antisentido (Barker *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:514 (1996); Agrawal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7079 (1988); Letter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3420-3434 (1990); y Offensperger *et al.* *EMBO J.* 12:1257 (1993)).

30

Mientras tanto, la interferencia mediada por ARN (iARN) es un fenómeno en el que un fragmento de ARN pequeño de 21-25 nucleótidos se une selectivamente a y degrada el ARNm que tiene una secuencia complementaria, lo que supone la supresión de la expresión proteínica (Shen C, *et al.*, *FEBS Lett.* 539 (1-3):111-4 (2003)). El fenómeno de iARN se descubrió por vez primera en 1995 como parte del mecanismo de regulación génica en *Caenorhabditis*

- 35 *elegans* y plantas. En 1998, el Dr. Andrew Fire del Instituto Carnegie de Washington y el Dr. Craig Mello de la Universidad de Massachusetts Medical School, y su equipo descubrieron de forma experimental que la expresión de un gen específico puede inhibirse significativamente cuando el ARN bicatenario (ARNbc) correspondiente a una secuencia de bases del gen específico se inyecta *in vivo* en *C. elegans* (Fire A. *et al.*, *Nature.* 391 (6669):806-11 (1998)). El ARNbc de cadena larga inyectado en *C. elegans* se escinde en un fragmento de ARN bicatenario corto denominado ARN pequeño de interferencia (ARNpi) de aproximadamente 21-25 pb de largo, mediante la acción enzimática de Dicer que pertenece a un miembro de la familia RNasa III de nucleasas que escinden específicamente ARN bicatenarios. El ARNbc corto resultante se incorpora entonces en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), en el que el híbrido de ARNpi se desenrolla en dos hebras. Posteriormente, el ARNpi separado en hebras sencillas se une a un ARNm de gen específico con una secuencia complementaria y hace que sea
- 40 intraducible, de este modo inhibe la expresión del gen correspondiente. Además, Elbashir y sus compañeros han informado que la expresión de un gen específico puede inhibirse selectivamente mediante la inyección de ARNbc corto (ARNpi) que consiste en 21 bases de células de mamífero cultivadas, este hallazgo conduce a aumentos significativos en la aplicabilidad práctica de iARN en células de mamífero (Elbashir, S.M. *et al.* *Nature* 411 (6836):494-8 (2001)).

50

En este momento, se utilizan ampliamente técnicas de inhibición de la expresión génica mediada por ARNpi en la comprensión funcional de diversos genes y una gran cantidad de investigación se ha centrado activamente en la explotación de estos ARNpi para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades intratables tales como cánceres, enfermedades infecciosas, etc. (Mouldy Sioud. *Therapeutic siRNAs, Trends in pharmacological Sciences* 2004; 22-28).

55

Como se ha señalado previamente, se han efectuado muchos intentos en desarrollar agentes terapéuticos o agentes de diagnóstico utilizando ARN antisentido y ARNpi. A tal efecto, existe una necesidad urgente de un proyecto de producción en masa eficiente de oligorribonucleótidos.

60

La síntesis de oligómeros nucleotídicos se lleva a cabo normalmente mediante el acoplamiento secuencial de unidades monómeras en resinas sólidas utilizando un sintetizador automático de ADN/ARN (u oligonucleótido). Los oligómeros de ADN pueden sintetizarse con un buen rendimiento. Por el contrario, la síntesis de oligómeros de ARN, por ejemplo, los oligómeros ribonucleotídicos implican varias desventajas debido al impedimento estérico de un grupo protector de un grupo 2'-OH, como largo periodo de síntesis y baja eficacia de acoplamiento que conlleva un

65

bajo rendimiento de producción por lo que es difícil obtener oligos de ARN de alta pureza.

### Divulgación de la invención

#### 5 Problema técnico

- Como resultado de una variedad de estudios y experimentos extensivos e intensivos para resolver los problemas que se han descrito previamente y para hallar un método que es capaz de lograr una producción de alta pureza y práctica de especies oligómeras tales como oligómeros nucleotídicos, en particular oligómeros ribonucleotídicos o
- 10 ARN pequeño de interferencia (ARNpi), los inventores de la presente invención descubrieron que es posible lograr la producción de oligómeros ribonucleotídicos con una pureza significativamente mejorada mediante el uso de un dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico como el primer sintón nucleotídico que se unirá a soportes sólidos. La presente invención se ha completado basándose en estos hallazgos.
- 15 Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un método de preparación de oligómeros ribonucleotídicos.

#### Solución técnica

- 20 Las impurezas producidas durante la síntesis de oligómeros nucleotídicos se componen principalmente de secuencias cortas que tienen un menor grado de acoplamiento que las secuencias de longitud completa (Nmers), y por lo general se expresan como (N-1)mers, (N-2)mers, (N-x)mers, o similares. La impureza de los oligómeros más cortos que los Nmers de longitud completa se produce generalmente debido a la adición incompleta de la caperuza en una etapa de adición de la caperuza del producto seguido de la reacción de acoplamiento, tras el acoplamiento
- 25 de unidades nucleotídicas a soportes sólidos.

Además, las especies de impurezas que son más difíciles de separar durante la purificación de oligómeros nucleotídicos deseados son (N-1)meros que se eluyen en una posición próxima a la de los oligómeros deseados en cromatogramas.

- 30 Un estudio mostró que el contenido de (N-1)-mer y fosfodiéster podría reducirse mediante el uso de sintones de fosforamidita dimérica en comparación con el uso de fosforamiditas monoméricas (Krotz A.H. *et al.*, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 1997, vol 7, Nº 1, págs 73-78).
- 35 Un estudio posterior mostró que el contenido de (N-1)-mer podría reducirse mediante el uso de sintones de fosforamidita trimérica en comparación con el uso de fosforamiditas monoméricas (Eleuteri A, *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1999, 18(3), págs 475-483).

- Sin embargo, según la presente invención que utiliza un dímero o trímero, no un monómero, en la primera reacción
- 40 de acoplamiento, se evitan los casos de (N-1)mers que son difíciles de eliminar durante el proceso de purificación y de esta manera se obtienen fácilmente oligómeros ribonucleotídicos puros con la formación de (N-2)mers o (N-3)mers fácilmente purificables. En particular, cuando se desea utilizar oligómeros nucleotídicos como terapéuticos, se purifican mediante técnicas de cromatografía. A este respecto, los Nmers y (N-1)mers se eluyen en un intervalo de tiempo muy próximo, por lo que resulta difícil lograr satisfactoriamente la separación cromatográfica de (N-
- 45 1)mers. No obstante, cuando se utiliza un dímero o trímero ribonucleotídico como el primer bloque nucleotídico que se acopla a soportes sólidos, según se desvela en la presente invención, la formación de las impurezas de (N-1)mer se reduce significativamente, generando así mejoras pronunciadas de los rendimientos de purificación y en consecuencia una reducción significativa de los costes de producción.

- 50 Como se demostrará en los Ejemplos en lo sucesivo, la presente invención permite la reducción de (N-1)mers que se produce en gran parte en la primera reacción de acoplamiento, así como la disminución general de las impurezas de (N-x)mer. Se cree que esto se debe a que cuando se realiza el acoplamiento de un dímero o trímero más largo en lugar de un monómero en la primera reacción de acoplamiento en soportes sólidos, la siguiente unión de un monómero al dímero o trímero acoplado es mucho más espacialmente ventajosa que la unión de un siguiente
- 55 monómero a un sitio sin caperuza, que en consecuencia disminuye la formación de oligómeros que tienen una longitud de secuencia más corta que el oligómero deseado.

Además, la presente invención proporciona las siguientes diferencias y excelentes efectos en comparación con la técnica convencional (documento WO 02/20543).

- 60 1) La técnica convencional emplea únicamente dímeros para la síntesis de oligómeros nucleotídicos y por lo tanto prepara los oligómeros nucleotídicos de una secuencia repetitiva en el dímero, mientras que la presente invención se refiere a la preparación de oligómeros rinucleotídicos, que implica el uso de una unidad de dímero o trímero sólo en la primera reacción de acoplamiento en soportes sólidos. Es decir, la técnica convencional requiere diversos tipos
- 65 de dímeros de hasta 10 tipos cuando se desea preparar oligómeros de ARNpi utilizando unidades de dímero. En

otras palabras, es necesario sintetizar 10 tipos de dímeros para este fin, por lo que se requiere periodos a largo plazo de síntesis y costes de alta producción. Por el contrario, la presente invención emplea sólo una especie de dímero o trímero en la primera etapa de acoplamiento y después unidades de monómero de bajo coste comunes en las etapas posteriores, que permite la producción de alta pureza y bajo coste de oligómeros rinucleotídicos.

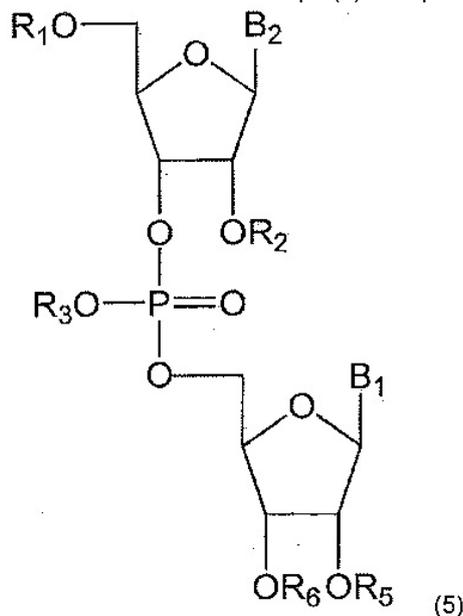
5

2) Además, la presente invención consigue un tiempo de síntesis más breve que la técnica convencional. Típicamente, una reacción de acoplamiento de la síntesis del oligómero nucleotídico de ARN tarda 10 veces más que la síntesis del oligómero nucleotídico de ADN. A este respecto, a pesar de que la técnica convencional se ocupa de un ejemplo de síntesis de oligómeros nucleotídicos de ADN, se sugirió que una reacción de acoplamiento de 10 dímeros en el ADN requiere un periodo de 20 a 60 min. Por otro lado, según la presente invención, el acoplamiento del primer dímero para la síntesis de oligómeros nucleotídicos de ARN requiere un periodo de 10 a 20 min y el acoplamiento del monómero posterior tarda 10 min, por lo que el tiempo total de síntesis es mucho más breve que la técnica convencional. Como consecuencia, la presente invención acorta los periodos de producción de los productos para reducir significativamente de este modo los costes de producción cuando los oligómeros nucleotídicos se 15 formulan en la terapéutica.

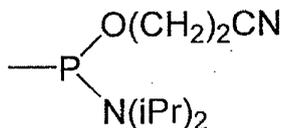
La presente invención proporciona un método de preparación de oligómeros ribonucleotídicos, que comprende:

- 20 (a) acoplar un dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico a un ribonucleósido unido a soportes sólidos o a soportes sólidos universales como material de partida;
- (b) acoplar de forma secuencial monómeros ribonucleotídicos a las estructuras resultantes de la etapa (a) para preparar oligómeros ribonucleotídicos; y
- (c) eliminar los oligómeros ribonucleotídicos de los soportes sólidos.

25 en el que el dímero ribonucleotídico en la etapa (a) se representa por la Fórmula 5:



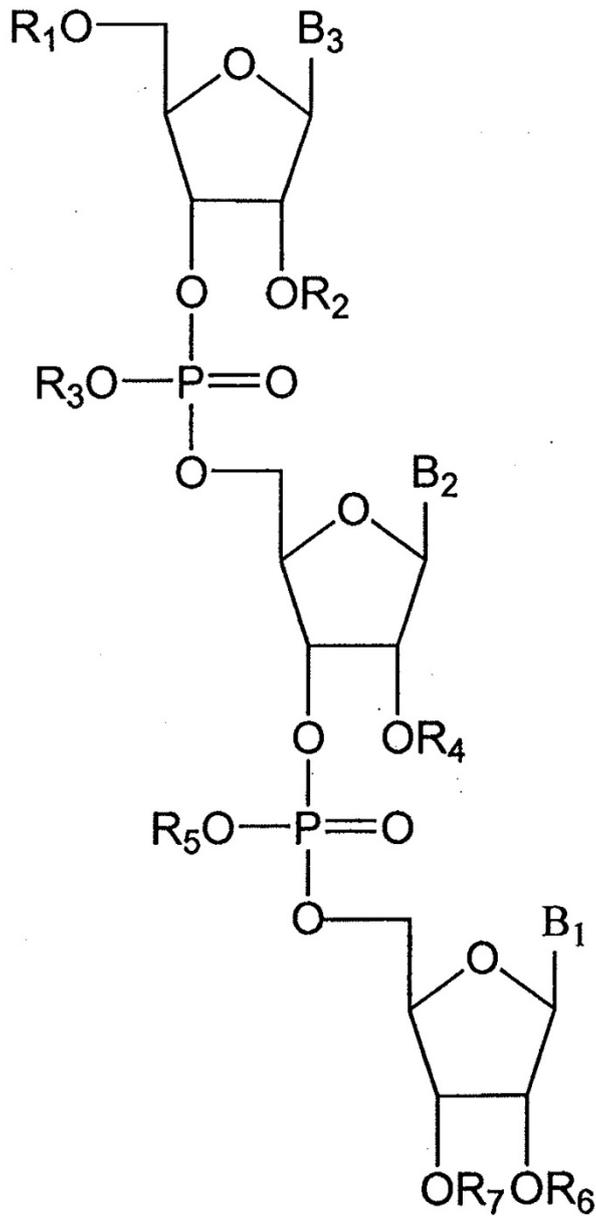
en la que cada R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente grupos protectores, cada B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son independientemente



nucleobases, y R<sub>6</sub> es hidrógeno o

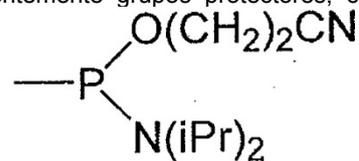
en el que iPr es isopropilo;

30 en el que trímero ribonucleotídico en la etapa (a) se representa por la Fórmula 6:



(6)

en la que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  son independientemente grupos protectores, cada  $B_1$ ,  $B_2$  y  $B_3$  son



independientemente nucleobases, y  $R_7$  es hidrógeno o isopropilo.

en el que  $iPr$  es

5

En una realización de la presente invención, el método de preparación de oligómeros ribonucleotídicos incluye las etapas de:

10

- (a) acoplar un dímero ribonucleotídico según la Fórmula 5 previa a un ribonucleósido unido a soportes sólidos o a soportes sólidos universales como material de partida;
- (b) acoplar de forma secuencial monómeros ribonucleotídicos a las estructuras resultantes de la etapa (a) para preparar oligómeros ribonucleotídicos; y
- (c) eliminar los oligómeros ribonucleotídicos de los soportes sólidos.

En otra realización de la presente invención, el método de preparación de oligómeros ribonucleotídicos incluye las etapas de:

- 5 (a) acoplar un trímero ribonucleotídico según la Fórmula 6 previa a un ribonucleósido unido a soportes sólidos o a soportes sólidos universales como material de partida;
  - (b) acoplar de forma secuencial monómeros ribonucleotídicos a las estructuras resultantes de la etapa (a) para preparar oligómeros ribonucleotídicos; y
  - (c) eliminar los oligómeros ribonucleotídicos de los soportes sólidos.
- 10 Como se utiliza en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, el término "nucleótido" tiene por objeto abarcar ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y sus derivados.

Como se utiliza en el presente documento, el término "ribonucleótido" se refiere a un nucleótido que no tiene 2'-H de un átomo de carbono en la posición 2 del azúcar, y tiene por objeto abarcar ribonucleótidos de origen natural así como sus análogos. En el contexto de la presente invención, por ejemplo, el término "ribonucleótido" también abarca

15 derivados de ribonucleótidos en los que el alquilo (por ejemplo, metilo o etilo) se une a -OH en el carbono C2 del azúcar o a un átomo de halógeno (por ejemplo, flúor) o se une a un grupo amino en lugar de -OH en el carbono C2 de azúcar.

20 El término "desoxirribonucleótido" se refiere a un nucleótido que contiene 2'-H de azúcar, y tiene por objeto abarcar desoxirribonucleótidos de origen natural así como sus análogos.

Los ejemplos de nucleótido incluyen nucleótidos modificados en el esqueleto tales como ADN o ARN fosforotioato, ADN o ARN fosforoditioato, y ADN o ARN fosforamidato; nucleótidos modificados con azúcar tales como 2'-O-metil

25 ARN, 2'-O-etil ARN, 2'-O-metoxietil ARN, 2'-fluoro ARN, 2'-halógeno ARN, 2'-amino ARN, 2'-O-alquil ARN, 2'-O-alcoxi ARN, 2'-O-alquil ADN, 2'-O-alil ADN, 2'-O-alquiniil ADN, hexosa ADN, piranosilo ARN, anhidrohexitol ADN, y ácido nucleico bloqueado (ANB); y nucleótidos modificados en la base que comprenden una base tal como pirimidinas sustituidas con C-5 (los sustituyentes incluyen fluoro-, bromo-, cloro-, yodo-, metilo-, etilo-, vinilo-, formilo, etinilo-, propinilo-, alquinilo, tiazolilo-, imidazolilo-, y piridilo-), 7-deazapurinas con sustituyentes C-7 (los sustituyentes

30 incluyen fluoro-, bromo-, cloro-, yodo-, metilo-, etilo-, vinilo-, formilo-, alquinilo-, alquenilo-, tiazolilo-, imidazolilo-, y piridilo-), inosina y diaminopurina.

El nucleótido de la presente invención es un ribonucleótido, preferentemente una fosforamidita ribonucleósida.

35 Como se describe en el presente documento, el oligómero nucleotídico puede incluir diversos tipos de oligómeros nucleotídicos, por ejemplo, oligómeros desoxirribonucleotídicos y sus derivados. Como se describe y/o reivindica en el presente documento, el oligómero nucleotídico puede ser un oligómero nucleotídico de origen natural así como un oligómero nucleotídico modificado. Por ejemplo, se pueden citar oligómeros nucleotídicos modificados en el esqueleto, tales como ADN o ARN fosforotioato, ADN o ARN fosforoditioato y ADN o ARN fosforamidato; oligómeros

40 nucleotídicos modificados con azúcar tales como 2'-O-metil ARN, 2'-O-etil ARN, 2'-O-metoxietil ARN, 2'-fluoro ARN, 2'-halógeno ARN, 2'-amino ARN, 2'-O-alquil ARN, 2'-O-alcoxi ARN, 2'-O-alquil ADN, 2'-O-alil ADN, 2'-O-alquiniil ADN, hexosa ADN, piranosilo ARN, anhidrohexitol ADN, y ácido nucleico bloqueado (ANB); y oligómeros nucleotídicos modificados en la base, tales como pirimidinas sustituidas con C-5 (los sustituyentes incluyen fluoro-, bromo-, cloro-, yodo-, metilo-, etilo-, vinilo-, formilo-, etinilo-, propinilo-, alquinilo-, tiazolilo-, imidazolilo-, y piridilo-), 7-deazapurina

45 con sustituyentes C-7 (los sustituyentes incluyen fluoro-, bromo-, cloro-, yodo-, metilo-, etilo-, vinilo-, formilo-, alquinilo-, alquenilo-, tiazolilo-, imidazolilo-, y piridilo-), inosina y diaminopurina.

El oligómero nucleotídico de la presente invención es un oligómero ribonucleotídico.

50 Preferentemente, el oligómero ribonucleotídico es aquel que contiene al menos un ribonucleótido seleccionado entre 2'-O-halógeno ribonucleótido, 2'-amino ribonucleótido, 2'-O-alquilo ribonucleótido y 2'-O-alcoxi ribonucleótido.

La presente invención emplea el dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico como el primer reactivo de acoplamiento que se unirá a soportes sólidos. En función de los tipos de ribonucleótidos situados en el extremo 3'-

55 terminal correspondiente al tercer carbono de azúcar, por ejemplo, los tipos de ribonucleótidos unidos a los soportes sólidos, el método de la presente invención se puede clasificar en 3 tipos de la siguiente manera:

1) El primero es un caso en el que el ribonucleósido se sitúa en el extremo 3'-terminal. Es decir, el dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico como el primer reactivo de acoplamiento se acopla a soportes sólidos en

60 los que se precargó un monómero ribonucleósido como un material de partida de un proceso de síntesis, seguido por el acoplamiento secuencial de monómeros ribonucleotídicos en la estructura resultante para preparar de ese modo un oligómero ribonucleotídico que tiene una secuencia deseada.

2) El segundo es un caso en el que el dímero ribonucleotídico se sitúa en el extremo 3'-terminal. Este caso emplea

65 soportes sólidos universales como material de partida. Los soportes sólidos universales como material de partida se

emplean en la primera etapa del proceso de síntesis, y el dímero ribonucleotídico se emplea como el primer reactivo de acoplamiento. En lo sucesivo, los monómeros ribonucleotídicos se acoplan secuencialmente a la estructura resultante para preparar de ese modo un oligómero ribonucleotídico que tiene una secuencia deseada.

- 5 3) El tercero es un caso en el que el trímero ribonucleotídico se sitúa en el extremo 3'-terminal. Este caso también emplea los soportes sólidos universales como material de partida. Los soportes sólidos universales como material de partida se emplean en la primera etapa del proceso de síntesis, y el trímero ribonucleotídico se emplea como el primer reactivo de acoplamiento. En lo sucesivo, los monómeros ribonucleotídicos se acoplan secuencialmente a la estructura resultante para preparar de ese modo un oligómero ribonucleotídico que tiene una secuencia deseada.

10 El método más preferente de los tres métodos previamente mencionados es un método en el que los soportes sólidos a los que se une previamente un ribonucleósido se emplea como un material de partida y el dímero o trímero ribonucleotídico como el primer reactivo de acoplamiento se acopla al ribonucleósido precargado.

- 15 Como se utiliza en el presente documento, el término "soportes sólidos universales" se refiere a soportes sólidos que están libres de un oligómero nucleósido o nucleotídico unido covalentemente a los mismos. A diferencia de los soportes precargados, el uso de soportes sólidos universales permite la síntesis de cualquier oligómero nucleotídico independientemente de los tipos de secuencias terminales de oligómeros nucleotídicos. Cuando se emplean soportes universales, se determina una secuencia terminal del oligómero nucleotídico sintético final mediante un  
20 sintón nucleotídico aplicado a la primera reacción de acoplamiento de la síntesis del oligómero nucleotídico.

La presente invención se practica según la síntesis en fase sólida.

- 25 Cuando el proceso de la presente invención se lleva a cabo según la síntesis en fase sólida, una realización preferente de la presente invención incluye las siguientes etapas:

- (a) acoplar un dímero nucleotídico [(NMP)<sub>2</sub>] o trímero nucleotídico [(NMP)<sub>3</sub>] a [(NS)<sub>1</sub>] de un nucleósido en el soporte sólido [SS(NS)<sub>1</sub>] para preparar SS-(NS)<sub>1</sub>-(NMP)<sub>2</sub> o SS-(NS)<sub>1</sub>-(NMP)<sub>3</sub>;  
30 (b) acoplar de forma secuencial monómeros nucleotídicos a la estructura resultante de la etapa (a) para preparar un SS-(NS)<sub>1</sub>-(NMP)<sub>2</sub>-(NMP)<sub>n-3</sub> o SS-(NS)<sub>1</sub>-(NMP)<sub>3</sub>-(NMP)<sub>n-4</sub>; y  
(c) eliminar los soportes sólidos (SS) de la estructura SS-(NS)<sub>1</sub>-(NMP)<sub>2</sub>-(NMP)<sub>n-3</sub> o SS-(NS)<sub>1</sub>-(NMP)<sub>3</sub>-(NMP)<sub>n-4</sub> para obtener un (NMP)<sub>n</sub>, en el que el nucleótido es un ribonucleótido, el nucleósido es un ribonucleósido y el dímero o trímero nucleotídico es un dímero o trímero ribonucleotídico según la Fórmula 5 ó 6, respectivamente.

- 35 Cuando el dímero nucleotídico [(NMP)<sub>2</sub>] o trímero nucleotídico [(NMP)<sub>3</sub>] se acopla en la primera etapa a los soportes sólidos a los que se une previamente un monómero nucleósido, y los monómeros nucleotídicos se acoplan a continuación de forma secuencial a los mismos, puede prepararse una molécula de oligómero nucleotídico con pureza significativamente mejorada.

- 40 El nucleósido en el apoyo sólido [SS-(NS)<sub>1</sub>] es una estructura en la que una molécula de ribonucleósido o desoxirribonucleósido se une a los soportes sólidos. Los soportes sólidos pueden ser uno cualquiera de los que se utilizan en la síntesis en fase sólida de moléculas de nucleótidos. Alternativamente, también se pueden emplear soportes sólidos universales a los que no se une previamente el ribonucleósido o desoxirribonucleósido. Preferentemente, tales soportes sólidos deben tener las siguientes propiedades: (i) sustancialmente sin solubilidad  
45 en los reactivos utilizados para la síntesis del oligómero nucleotídico, (ii) estabilidad química contra los reactivos utilizados para la síntesis del oligómero nucleotídico, (iii) viabilidad de modificaciones químicas, (iv) capacidad de carga de oligómeros nucleotídicos deseados, (v) resistencia a compresión razonable para resistir el aumento de la presión durante el proceso de síntesis, y (vi) tamaño de partícula y distribución deseados.

- 50 Un material que puede utilizarse como soportes sólidos en la presente invención puede ser preferentemente un polímero inorgánico e incluye, por ejemplo, sílice, vidrio poroso, silicato de aluminio, poliestireno, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, borosilicato, óxido de metal (tal como alúmina y óxido de níquel) y arcilla. Más preferentemente, los soportes sólidos para su uso en la presente invención son vidrio de poro controlado (VPC) y poliestireno.

- 55 La presente invención emplea un [SS-(NS)<sub>1</sub>] en el que se une previamente un nucleósido a una superficie de los soportes sólidos, específicamente un [SS-(rNS)<sub>1</sub>] en el que un ribonucleósido se une a una superficie de los soportes sólidos. El nucleósido se une convencionalmente a los soportes sólidos a través de un grupo 3'-OH de azúcar.

- 60 El acoplamiento del dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico al ribonucleósido puede llevarse a cabo por diversos métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, los detalles del método de acoplamiento pueden hallarse en la siguiente literatura: Patente Estadounidense N° 4.458.066 y Patente Estadounidense N° 4.415.732; Caruthers *et al.*, *Genetic Engineering*, 4:1-17 (1982); y *Users Manual Model 392 y 394 Polynucleotide Synthesizers*, páginas 6-1 hasta 6-22, Applied Biosystems, Parte N° 901237 (1991).

- 65 Preferentemente, el proceso de acoplamiento se lleva a cabo según un método de la fosforamidita. Por ejemplo, se

puede realizar de la siguiente manera. Se añade un derivado de fosforamidita del dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico al ribonucleósido mientras se añade al mismo tiempo un activador, por ejemplo un ácido débil (tal como tetrazol, 5-etiltiotetrazol, benziltiotetrazol, etc.). Más preferentemente, el activador utilizable es 5-etiltiotetrazol. La adición del ácido débil conduce a la formación de un intermedio de reacción a través de la protonación del nitrógeno de la fosforamidita. A esto le sigue la adición de la caperuza del producto resultante. La adición de la caperuza se lleva a cabo preferentemente con un anhídrido acético y 1-metilimidazol. A continuación, el producto con caperuza se oxida utilizando un oxidante tal como yodo para que un enlace internucleotídico se convierta en un fosfodiéster más estable de fosfito lábil. Se puede invertir el orden de las etapas de adición de la caperuza y oxidación. Tras la etapa de oxidación, se elimina un grupo protector hidroxilo utilizando un ácido prótico, por ejemplo, ácido tricloroacético o ácido dicloroacético.

El dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico de la presente invención puede tener diversos tipos de enlaces, preferentemente enlaces fosfodiéster, fosforamidato, alquilfosforamidato, alquilfosfonato, fosforotioato, alquilfosfotriéster, o alquilfosfonotioato, más preferentemente enlaces fosfodiéster o fosforamidato.

Preferentemente, el dímero ribonucleotídico y el trímero ribonucleotídico de la presente invención son el dímero ribonucleotídico de la fosforamidita y el trímero ribonucleotídico de la fosforamidita, respectivamente.

Por lo tanto, el oligómero ribonucleotídico de la presente invención tiene un enlace fosfodiéster, fosforamidato, alquilfosforamidato, alquilfosfonato, fosforotioato, alquilfosfotriéster o alquilfosfonotioato, más preferentemente un enlace fosfodiéster o fosforamidato.

Según la presente invención,  $SS-(NS)_1-(NMP)_2-(NMP)_{n-3}$  o  $SS-(NS)_1-(NMP)_3-(NMP)_{n-4}$  con una secuencia deseada se prepara finalmente mediante el acoplamiento secuencial de monómeros ribonucleotídicos al dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico unido al nucleósido en el soporte sólido  $[SS-(NS)_1]$ .

Cuando los monómeros ribonucleotídicos se acoplan secuencialmente, se utiliza 5-etiltiotetrazol como activador.

Por último, el producto deseado  $(NMP)_n$  se obtiene por eliminación de los soportes sólidos (SS) de  $SS-(NS)_1-(NMP)_2-(NMP)_{n-3}$  o  $SS-(NS)_1-(NMP)_3-(NMP)_{n-4}$ . Cuando se utilizan soportes sólidos universales sin unión del ribonucleósido,  $(NMP)_n$  se obtiene por eliminación de los soportes sólidos (SS) de  $SS-(NMP)_2-(NMP)_{n-2}$  o  $SS-(NMP)_3-(NMP)_{n-3}$ .

La eliminación de los soportes sólidos puede llevarse a cabo por cualquier método convencional conocido en la materia. Por ejemplo, los soportes sólidos pueden eliminarse utilizando hidróxido de amonio.

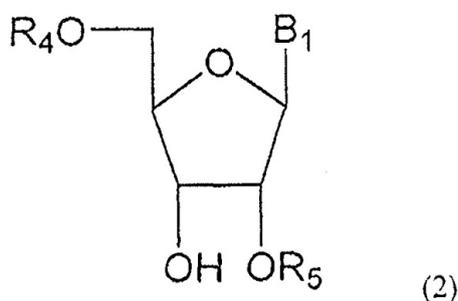
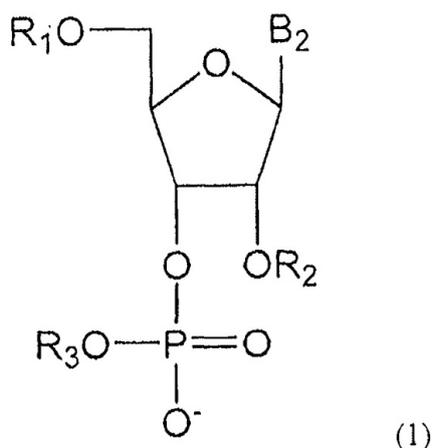
Según la realización preferente de la presente invención, el método de la presente invención puede incluir además una etapa de eliminación de los grupos protectores unidos al oligómero ribonucleotídico  $[(NMP)_n]$ , antes o después de la etapa (c). La eliminación de los grupos protectores puede llevarse a cabo por cualquier método convencional conocido en la materia. Por ejemplo, se puede eliminar un grupo protector fosfato con el tratamiento de una solución de tiofenol o hidróxido de amonio, mientras que los grupos benzoilo e isobutirilo unidos a la base pueden eliminarse calentado el oligómero ribonucleotídico en una solución de hidróxido de amonio.

No existe límite particular alguno en la longitud del oligómero ribonucleotídico  $[(NMP)_n]$  preparado por el método de la presente invención. Típicamente, el oligómero ribonucleotídico tiene de 10 a 50 nucleótidos de longitud.

Según el método de la presente invención, es posible sintetizar de manera eficiente un oligorribonucleotídico de alta pureza en un periodo de tiempo más breve. El método de la presente invención proporciona un oligómero ribonucleotídico que tiene una pureza del 15-20 % mayor que la técnica convencional.

En la etapa (a) del método reivindicado, se prefiere emplear el dímero ribonucleotídico de Fórmula 5, en la que  $R_1$  es dimetoxitritilo; cada  $R_2$  y  $R_5$  son t-butil-dimetilsililo; y  $R_3$  es fenilo sustituido con halógeno.

Además, el método de la presente invención comprende la etapa adicional de preparación de un dímero ribonucleotídico que comprende el acoplamiento de un compuesto de Fórmula 1 y un compuesto de Fórmula 2:



En las Fórmulas 1 y 2, cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente grupos protectores, y cada  $B_1$  y  $B_2$  son independientemente nucleobases.

- 5 Los ejemplos de los grupos protectores  $R_1$  y  $R_4$  en las Fórmulas 1 y 2 pueden incluir independientemente, pero no se limitan a, dimetoxitritilo, monometoxitritilo, tritilo, y 9-fenil-xanten-9-ilo (pixilo). Los ejemplos preferentes de grupos adecuados para  $R_2$  y  $R_5$  pueden incluir independientemente, pero no se limitan a, t-butil-dimetilsililo, tri-isopropil sililoximetilo (TOM), 1-(2-cloro etoxi)etilo (CEE), 2-cianoetoximetilo (CEM), bis(2-acetoxi)metilo (ACE), 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo (Fmp), 1-(4-cloro fenil)-4-etoxipiperidin-4-ilo (CPEP), 1-[2-cloro-4-metil]fenil]-4-
- 10 metoxi-piperidin-4-ilo (CTMP), 4-nitrofeniletilsulfonilo (NPES), 4-cloro feniletilsulfonilo (CPES), 1-(2-cianoetoxi)etilo (CNEE), trimetil sililetoximetilo (SEM), metoxietoximetilo (MEM), levulinilo, 4-nitrofeiletilo (NPE), y 4-nitrofeniletiloxicarbonilo (NPEOC).

$R_3$  es preferentemente fenilo sustituido con halógeno o carbobenzoxil, sin desear quedar limitado a los mismos.

- 15 Cada uno de  $B_1$  y  $B_2$  es independientemente adenina, citosina, guanina, uracilo o un derivado de los mismos.

Más preferentemente, en las Fórmulas 1 y 2,  $R_1$  y  $R_4$  son dimetoxitritilo,  $R_2$  y  $R_5$  son t- butil-dimetilsililo, y  $R_3$  es fenilo sustituido con halógeno (más preferentemente 2-clorofenilo).

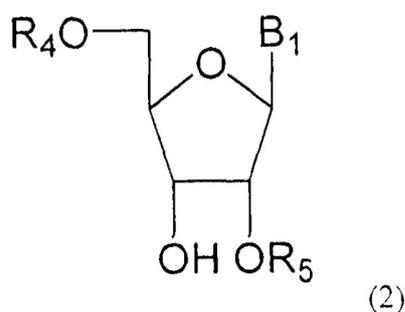
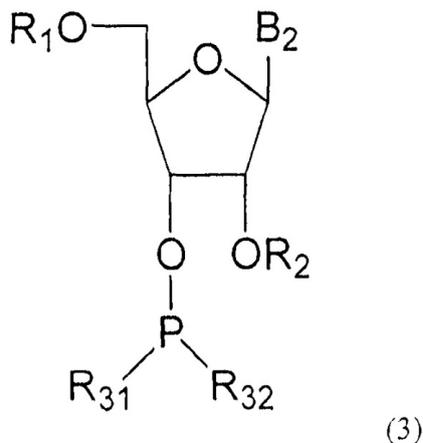
- 20 Cada uno de  $B_1$  y  $B_2$  es una base a la que se une o no un grupo protector. Los ejemplos de la base que pueden situarse en  $B_1$  y  $B_2$  pueden incluir bases comunes, tales como adenina, citosina, guanina y uracilo, así como sus derivados. Preferentemente, los derivados de las bases incluyen xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 5-halo, uracilo y citosina, 6-azo uracilo y citosina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, oxa, amino, tiol, tionalquil e
- 25 hidroxil adeninas y guaninas, 5-trifluoro-metil uracilos y citosinas, y 7-metilguanina o inosina.

El grupo protector puede unirse a  $B_1$  y  $B_2$ . Los ejemplos del grupo protector pueden incluir, pero no se limitan a, benzoilo o isobutirilo, acetilo, dimetilformamidina (DMF), fenoxiacetilo (PAC) y su derivado, y 4-t-butilfenoxiacetilo (TAC).

30

Como se ha descrito previamente, las condiciones de reacción para el acoplamiento del compuesto de Fórmula 1 al compuesto de Fórmula 2 son las mismas que las del acoplamiento del dímero o trímero nucleotídico.

- Además, el método de la presente invención comprende la etapa adicional de preparación de un dímero
- 35 ribonucleotídico (rNMP)<sub>2</sub>, que comprende acoplar un compuesto de Fórmula 3 y un compuesto de Fórmula 2:



En las Fórmulas 2 y 3, cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente grupos protectores, y cada  $B_1$  y  $B_2$  son independientemente nucleobases.

5 Preferentemente, los ejemplos de los grupos protectores  $R_1$  y  $R_4$  pueden incluir independientemente, pero no se limitan a, dimetoxitritilo, monometoxitritilo, tritilo, y 9-fenil-xanten-9-ilo (pixilo). Los ejemplos de grupos adecuados para  $R_2$  y  $R_5$  pueden incluir independientemente, pero no se limitan a, t-butil-dimetilsililo, tri-isopropil sililoximetilo (TOM), 1-(2-cloro etoxi)etilo (CEE), 2-cianoetoximetilo (CEM), bis(2-acetoxi)metilo (ACE), 1-(2- fluorofenil)-4-  
 10 metoxipiperidin-4-ilo (Fmp), 1-(4-cloro-fenil)-4-etoxipiperidin-4-ilo (CPEP), 1-[2-cloro-4-metil]fenil]-4-metoxi-piperidin-4-ilo (Ctmp), 4-nitrofeniletilsulfonilo (NPES), 4-cloro feniletilsulfonilo (CPES), 1-(2-cianoetoxi)etilo (CNEE), trimetil sililetoximetilo (SEM), metoxietoximetilo (MEM), levulinilo, 4-nitrofeiletilo (NPE), y 4-nitrofeniletiloxicarbonilo (NPEOC). Los ejemplos de grupos adecuados para  $R_{31}$  pueden incluir, pero no se limitan a, cianoalquiloxi (tal como cianoetoxi y cianometoxi), 4-ciano-2-buteniloxi, y difenilmetilsiletoxi. Los ejemplos no limitantes de grupos adecuados para  $R_{32}$  pueden incluir diaquilamino. Cada  $B_1$  y  $B_2$  son independientemente adenina, citosina, guanina y uracilo, o  
 15 sus derivados.

Más preferentemente, en la Fórmula 3,  $R_1$  es dimetoxitritilo,  $R_2$  es t-butil-dimetilsililo,  $R_{31}$  es 2-cianoetiloxi, y  $R_{32}$  es diaquilamino (más preferentemente diisopropilamino).

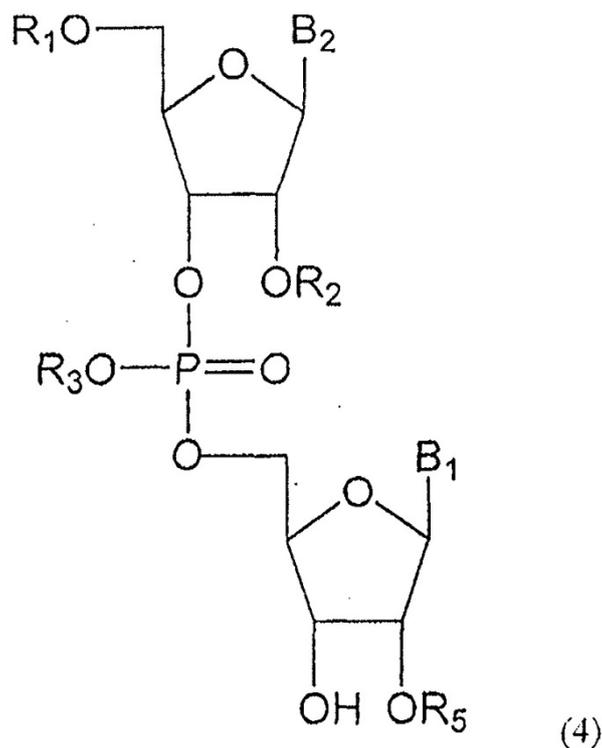
20 El acoplamiento del compuesto de Fórmula 2 al compuesto de Fórmula 3 en la presente invención se puede llevar a cabo de la misma manera anteriormente indicada, y un activador más preferente es 5-etiltiotetrazol.

En la etapa (a) del método reivindicado, se prefiere emplear el trímero ribonucleotídico de Fórmula 6, en el que  $R_1$  es dimetoxitritilo; cada  $R_2$ ,  $R_4$  y  $R_6$  son t-butil-dimetilsililo;  $R_3$  es 2-cianoetilo y  $R_5$  es fenilo sustituido con halógeno.

25 Además, el método de la presente invención comprende la etapa adicional de preparación de un trímero ribonucleotídico, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar un dímero ribonucleotídico de Fórmula 4 con un ácido para eliminar  $R_1$  de Fórmula 4; y

30 (b) acoplar el producto resultante de la etapa (a) a un ribonucleósido 3'-fosforamidita para preparar un trímero ribonucleotídico.



En la Fórmula 4, cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente grupos protectores, y cada  $B_1$  y  $B_2$  son independientemente nucleobases.

5

En la Fórmula 4, los ejemplos preferentes de los grupos protectores  $R_1$  pueden incluir independientemente, pero no se limitan a, dimetoxitritilo, monometoxitritilo, tritilo, y 9-fenil-xanten-9-ilo (pixilo). Los ejemplos de grupos adecuados para  $R_2$  y  $R_5$  pueden incluir independientemente, pero no se limitan a, t-butil-dimetilsililo, tri-isopropil sililoximetilo (TOM), 1-(2-cloro etoxi)etilo (CEE), 2-cianoetoximetilo (CEM), bis(2-acetoxi)metilo (ACE), 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo (Fpmp), 1-(4-cloro-fenil)-4-etoxipiperidin-4-ilo (Cpep), 1-[2-cloro-4-metil]fenil]-4-metoxi-piperidin-4-ilo (Ctmp), 4-nitrofeniletilsulfonilo (NPES), 4-cloro feniletilsulfonilo (CPES), 1-(2-cianoetoxi)etilo (CNEE), trimetil sililetoximetilo (SEM), metoxietoximetilo (MEM), levulinilo, 4-nitrofeiletilo (NPE), y 4-nitrofeniletiloxicarbonilo (NPEOC). Los ejemplos de grupos adecuados para  $R_3$  pueden incluir, pero no se limitan a, hidrógeno, y fenilo o carbobenzoxilo sustituido con halógeno. Cada  $B_1$  y  $B_2$  son independientemente adenina, citosina, guanina, uracilo o sus derivados.

15

Más preferentemente, en la Fórmula 4,  $R_1$  es dimetoxitritilo,  $R_2$  es t-butil-dimetilsililo,  $R_3$  es hidrógeno o fenilo sustituido con halógeno (más preferentemente clorofenilo), y  $R_5$  es terc-butil-dimetilsililo.

20 La eliminación de  $R_1$  del dímero ribonucleotídico de Fórmula 4 puede llevarse a cabo por cualquier método de desprotección convencional conocido en la materia, utilizando un ácido fuerte, por ejemplo, ácido bencenosulfónico.

Las condiciones de acoplamiento de la etapa (b) en el método de preparación previo son las mismas que las condiciones mencionadas anteriormente.

25

### Efectos ventajosos

La presente invención permite la síntesis eficiente de alta velocidad y alta pureza de oligómeros ribonucleotídicos. El método de la presente invención proporciona un oligómero ribonucleotídico que tiene una pureza del 15-20 % mayor que la técnica convencional.

30

### Modo de la invención

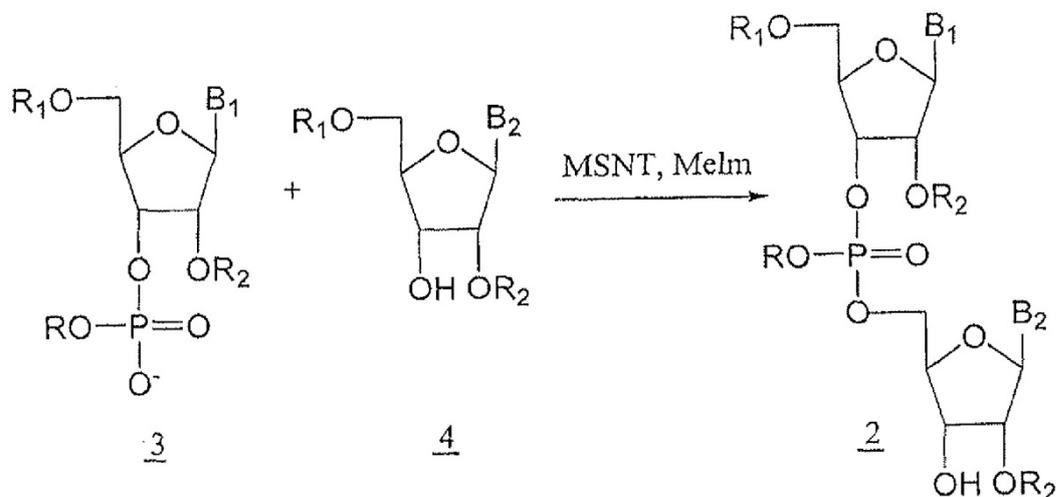
La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos.

35

En lo sucesivo, los valores RMN  $^{31}\text{P}$  medidos son los valores medidos utilizando Varian Mercury Plus 300 MHz.

**Ejemplo 1: Síntesis de dímeros ribonucleotídicos (método de fosfotriéster)**

[Esquema de reacción 1]



## 5 Síntesis de dímeros ribonucleotídicos UpU, CpU y GpA (2a a 2c)

R<sub>1</sub> = DMTr (dimetoxitritil), R<sub>2</sub> = TBDMS (terc-butildimetilsilil), R = o-clorofenil. 2a-B<sub>1</sub> = U, B<sub>2</sub> = U; 2b-B<sub>1</sub> = bzC, B<sub>2</sub> = U; 2c-B<sub>1</sub> = ibG, B<sub>2</sub> = bzA; 3a-B<sub>1</sub> = U; 3b-B<sub>1</sub> = bzC; 3c-B<sub>1</sub> = ibG; 4a-B<sub>2</sub> = U; 4b-B<sub>2</sub> = bzA. bz = benzoil, ib = isobutilil.

10 **Ejemplo 1: Síntesis de 5'-O-(dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsililuridina-3'-O-(2-clorofenilfosfato)-5'-O-2'-O-(t-butildimetilsilil)uridina (2a)****Etapa 1: Síntesis de 5'-O-(dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsililuridina-3'-O-(2-clorofenilfosfato) (sal de trietilamonio (3a)**

15

Se disolvieron triazol (0,63 g, 9,24 mmol, Sigma Aldrich) y trietilamina anhidra (1,3 ml, 9,15 mmol, Sigma Aldrich) en dioxano (20 ml), y la solución se enfrió a 5 °C. Se añadió gota a gota una solución de fosfodichlorhidrato de O-clorofenil (1,1 g, 4,53 mmol, Sigma Aldrich) en 5 ml de dioxano a la solución resultante. Después de una hora, la solución mezclada se filtró y se añadió a 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsililuridina (2 g, 3,02 mmol) en 10 ml de piridina que se había enfriado a -5 °C. A continuación, se añadió a la misma 1-metilimidazol (0,38 ml, 4,6 mmol, Sigma Aldrich). Después de una hora, se añadió tampón de bicarbonato de trietilamonio 0,1 M (TEAB, 10 ml) a la solución enfriada previamente que se concentró a continuación. El residuo se disolvió en diclorometano (50 ml) y se lavó con TEAB 0,1 M (50 ml), y la capa acuosa se extrajo dos veces con 20 ml de diclorometano. La capa orgánica se recogió, se lavó con TEAB 0,1 M (100 ml), y se secó en sulfato de sodio. El residuo se concentró utilizando una

20

bomba de vacío para dar 2,78 g (rendimiento: 97 %) del compuesto del título.

25

**Etapa 2: Síntesis de 5'-O-(dimetoxitritil-2'-O-(t-butildimetilsilil)uridina-3'-O-(2-clorofenilfosfato)-5'-O-2'-O-(t-butildimetilsilil)uridina (2a)**

30

Se preparó sal de trietilamonio de 5'-O-(dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsililuridina-3'-O-(2-clorofenilfosfato) (3a, 1,47 g, 1,54 mmol) en la Etapa 1 y se disolvió 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-terc-butildimetilsililuridina (4a, 0,5 g, 1,4 mmol) en 20 ml de piridina y la solución se secó utilizando una bomba de vacío. Se añadió 1-mesitilenosulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT, 0,68 g, 2,31 mmol, Sigma Aldrich) en 5 ml de piridina fresca al producto seco. La solución de reacción se concentró a aproximadamente 3 ml, y se añadieron a la misma 0,16 ml de 1-metilimidazol (1,89 mmol). Después de una hora, la solución de reacción se enfrió a 0 °C y se añadieron, a la misma, 2 ml de agua. La solución de reacción se concentró. El aceite residual se disolvió en 15 ml de diclorometano y se lavó con 15 ml de TEAB 0,1 M. La capa acuosa se lavó con diclorometano (3 x 5 ml). La capa orgánica se recogió y se secó en sulfato de sodio. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (0,68 g, rendimiento: 41 %).

35

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -6,38, -6,25

40

**Ejemplo 2: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidina-3'-O-(2-clorofenilfosfato)-5'-O-2'-O-(t-butildimetilsilil)uridina (2b)**

45

**Etapa 1: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidina-3'-O-(2-clorofenilfosfato)(sal de trietilamonio) (3b)**

Se disolvieron triazol (0,69 g, 10 mmol) y trietilamina anhidra (1,4 ml, 9,9 mmol) en dioxano (20 ml) y la solución se

enfrió a 5 °C. Se añadió gota a gota una solución de fosfodichlorhidrato de O-clorofenil (1,2 g, 4,90 mmol) en 5 ml de dioxano a la solución resultante. Después de una hora, la solución mezclada se filtró y se añadió a 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidina (2,5 g, 3,27 mmol, Sigma Aldrich) en 10 ml de piridina anhidra que se había enfriado a -5 °C. A continuación, se añadió 1-metilimidazol (0,40 ml, 4,9 mmol, Sigma Aldrich) a la solución previa.

- 5 Después de una hora, se añadió TEAB 0,1 M (10 ml) a la solución enfriada que se concentró. El residuo se disolvió en diclorometano (50 ml) y se lavó con TEAB 0,1 M (50 ml). La capa acuosa se extrajo dos veces con 20 ml de diclorometano. La capa orgánica se recogió, se lavó con TEAB 0,1 M (100 ml), se secó en sulfato de sodio y se concentró utilizando una bomba de vacío para dar 3,08 g (rendimiento: 94 %) del compuesto del título.

**10 Etapa 2: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidina-3'-O-(2-clorofenilfosfato)-5'-O-2'-O-(t-butildimetilsilil)uridina (2b)**

Se preparó 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidina-3'-O-(2-clorofenilfosfato) (sal de trietilamonio) (3b, 3,24 g, 3,07 mmol) en la Etapa 1 y se disolvió 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-terc-butildimetilsililuridina (4a, 1 g, 2,8 mmol) en 20 ml de piridina, y la solución se secó utilizando una bomba de vacío. Se añadió MSNT (1,364 g, 4,61 mmol) en 10 ml de piridina fresca al producto seco. La solución de reacción se concentró a aproximadamente 3 ml y se añadieron a la misma 0,25 ml de 1-metilimidazol (3,07 mmol). Después de una hora, la solución de reacción se enfrió a 0 °C y se añadieron 2 ml de agua a la misma. Después de que se concentrase la solución de reacción, el aceite residual se disolvió en 15 ml de diclorometano y se lavó con 15 ml de TEAB 0,1 M. La capa acuosa se lavó con diclorometano (3 x 5 ml), y la capa orgánica se recogió y se secó en sulfato de sodio. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (1,47 g, rendimiento: 40 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -6,42, -6,10

**25 Ejemplo 3: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosina-3'-O-(2-clorofenilfosfato)-5'-O-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)adenina (2c)**

**Etapa 1: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosina-3'-O-(2-clorofenilfosfato)(sal de trietilamonio) (3c)**

- 30 Se disolvieron triazol (1,37 g, 19,87 mmol) y trietilamina anhidra (2,8 ml, 19,87 mmol) en dioxano (20 ml) y la solución se enfrió a 5 °C. Se añadió gota a gota una solución de fosfodichlorhidrato de O-clorofenil (2,386 g, 9,74 mmol) en 5 ml de dioxano a la solución resultante. Después de una hora, la solución mezclada se filtró y se añadió a 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-t-butildimetilsililguanosina (5 g, 6,5 mmol) en 10 ml de piridina anhidra que se había enfriado a -5 °C. A continuación, se añadió a la misma 1-metilimidazol (0,80 ml, 9,74 mmol). Después de una hora, se añadió TEAB 0,1 M (10 ml) a la solución enfriada que se concentró después. El residuo se disolvió en diclorometano (50 ml) y se lavó con TEAB 0,1 M (50 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 20 ml). La capa orgánica se recogió, se lavó con TEAB 0,1 M (100 ml), se secó en sulfato de sodio y se concentró utilizando una bomba de vacío para dar 6,55 g (rendimiento: 95 %) del compuesto del título.

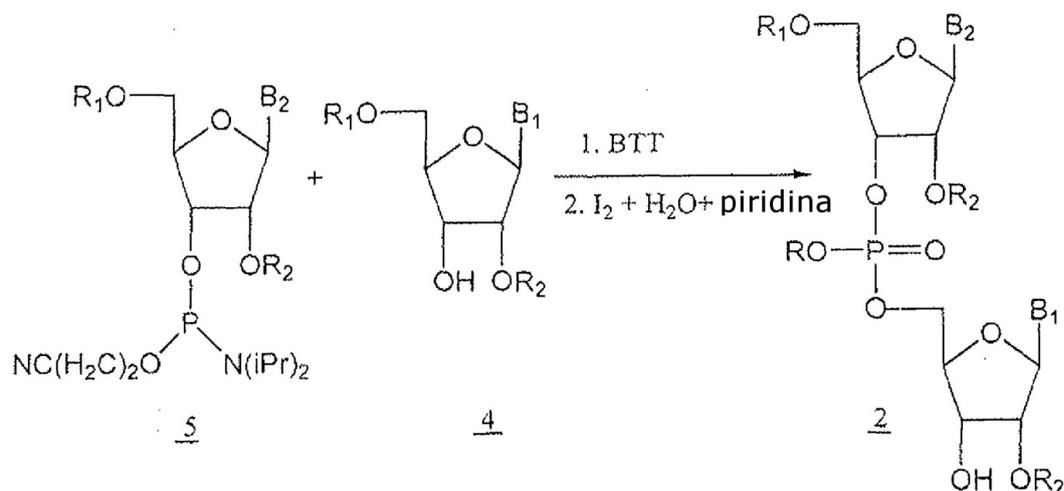
**40 Etapa 2: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosina-3'-O-(2-clorofenilfosfato)-5'-O-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)adenina (2c)**

- Se preparó 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosina-3'-O-(2-clorofenilfosfato) (sal de trietilamonio) (3c, 1,34 g, 1,26 mmol) en la Etapa 1 y se disolvió 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-terc-butildimetilsililadenina (4b, 1 g, 2,8 mmol) en 20 ml de piridina, y la solución se secó utilizando una bomba de vacío. Se añadió MSNT (0,6 g, 1,89 mmol) en 10 ml de piridina fresca al producto seco. La solución de reacción se concentró a aproximadamente 3 ml y se añadieron a la misma 0,16 ml de 1-metilimidazol (1,89 mmol). Después de 30 min, la solución de reacción se enfrió a 0 °C y se añadieron 2 ml de agua a la misma. La solución de reacción se concentró, y el aceite residual se disolvió en 15 ml de diclorometano y se lavó con 15 ml de TEAB 0,1 M. La capa acuosa se lavó con diclorometano (3 x 5 ml), y la capa orgánica se recogió y se secó en sulfato de sodio. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (1,265 g, rendimiento: 84 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -6,33, -6,14

**Ejemplo II: Síntesis de dímico ribonucleotídico (método de la fosforamidita)**

[Esquema de reacción 2]



5 Síntesis de dímeros ribonucleotídicos UU, CU, GU y GA (2d a 2g).

R<sub>1</sub> = DMTr (dimetoxitritil), R<sub>2</sub> = TBDMS, R = 2-cianoetil, 2d-B<sub>1</sub> = U, B<sub>2</sub> = U; 2e-B<sub>1</sub> = U, B<sub>2</sub> = bzC; 2f-B<sub>1</sub> = U, B<sub>2</sub> = lbG; 2g-B<sub>1</sub> = bzA; B<sub>2</sub> = lbG; 4a-B<sub>1</sub> = U; 4b-B<sub>1</sub> = bzA. 5a-B<sub>2</sub> = U, 5b-B<sub>2</sub> = bzC, 5c-B<sub>2</sub> = ibG.

**10 Ejemplo 4: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(t-butildimetilsilil)uridil-3'-O-[cianoetoxifosfino] (3'→5')-2'-O-t-butildimetilsililuridina (2d)**

Se disolvieron 5'-dimetoxitritil-uridina-2'-O-t-butildimetilsilil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamidita (5a, 1,085 g, 1,26 mmol) y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsililuridina (4a, 0,3 g, 0,84 mmol) en 10 ml de acetonitrilo anhidro, y la solución se concentró hasta que se volvió goma. Se disolvió 5-benziltiotetrazol (0,483 g, 2,52 mmol, ChemGene) en 20 ml de acetonitrilo, y la solución se concentró hasta que se formaron cristales. Se combinaron dos soluciones utilizando 20 ml de acetonitrilo y se concentraron a 3 ml. Después de una hora, la solución combinada se enfrió a 0 °C, y se añadió a la misma una solución de yodo 0,5 M en 7,6 ml de THF:piridina:agua (7:1:2). La solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min, y a continuación se añadieron a la misma 3,8 ml de una solución acuosa de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2 M. Después de que la solución se concentrase hasta que se convirtió en goma, el residuo se disolvió en 20 ml de diclorometano y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 5 ml). La capa orgánica se recogió, se lavó con una solución acuosa de TEAB 0,1 M (3 x 10 ml), y se secó en sulfato de sodio. La solución se concentró y se evaporó con tolueno (2 x 10 ml) para eliminar la piridina restante. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (0,5 g, rendimiento: 53 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -1,03, -0,71

**Ejemplo 5: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidil-3'-O-[cianoetoxifosfino](3'→5')-2'-O-t-butildimetilsililuridina (2e)**

Se disolvieron 5'-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoilcitidina-2'-O-t-butildimetilsilil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamidita (5b, 1,928 g, 2,00 mmol) y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsililuridina (4a, 0,358 g, 1,00 mmol) en 10 ml de acetonitrilo anhidro, y la solución se concentró hasta que se volvió goma. Se disolvió 5-etiltiotetrazol (0,528 g, 4 mmol, Sigma Aldrich) en 20 ml de acetonitrilo, y la solución se concentró hasta que se formaron cristales. Se combinaron dos soluciones utilizando 20 ml de acetonitrilo. A continuación, la solución combinada se concentró a 3 ml y se enfrió a 0 °C tras 4 horas, y se añadió a la misma una solución de yodo 0,5 M en 12 ml de THF:piridina:agua (7:1:2). La solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min, y se añadieron, a la misma, 6 ml de una solución acuosa de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2 M. La solución se concentró hasta que se convirtió en goma. El residuo se disolvió en 20 ml de diclorometano y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 5 ml). La capa orgánica se recogió, se lavó con una solución acuosa de TEAB 0,1 M (3 x 10 ml), y se secó en sulfato de sodio. La solución se concentró y se evaporó con tolueno (2 x 10 ml) para eliminar la piridina restante. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (0,868 g, rendimiento: 70 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -1,05, -0,74

45

**Ejemplo 6: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosil-3'-O-[cianoetoxifosfino] (3'→5')-2'-O-t-butildimetilsililuridina (2f)**

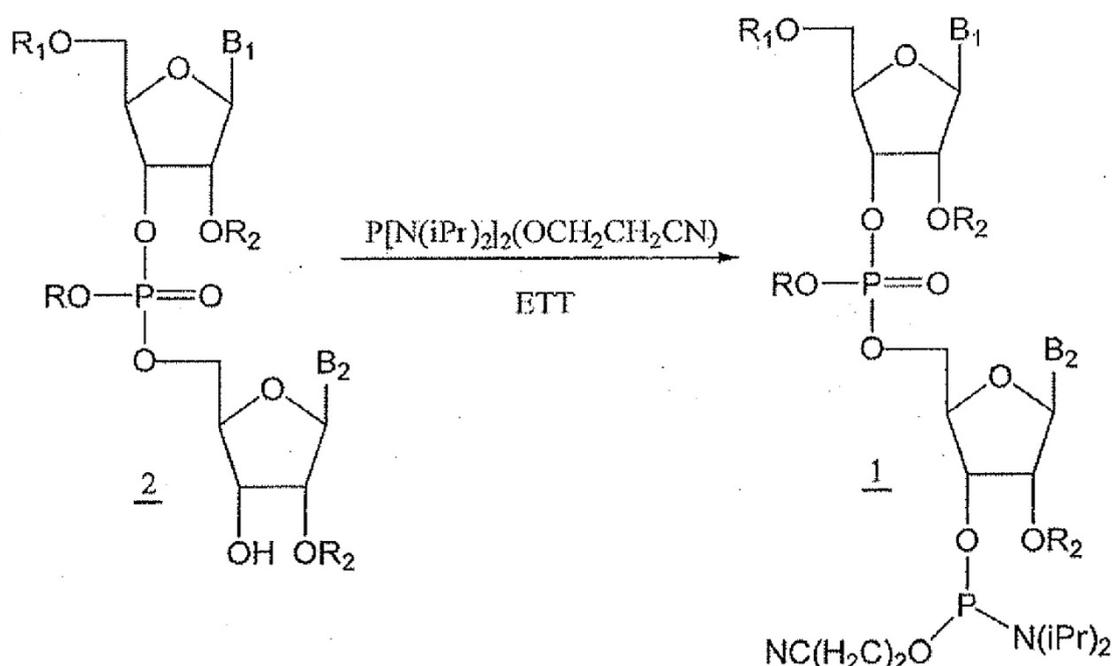
Se disolvieron 5'-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutirilguanosina-2'-O-t-butildimetilsilil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)] fosforamidita (5c, 3,48 g, 3,59 mmol) y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsililuridina (4a, 0,644 g, 1,8 mmol) en 10 ml de acetonitrilo anhidro, y la solución se concentró hasta que se convirtió en goma. Se disolvió 5-benziltiotetrazol (0,379 g, 7,18 mmol) en 20 ml de acetonitrilo y la solución se concentró hasta que se formaron cristales. Se combinaron dos soluciones utilizando 20 ml de acetonitrilo. A continuación, la solución combinada se concentró a 3 ml y se enfrió a 0 °C tras 1,5 horas, y se añadió a la misma una solución de yodo 0,5 M en 22 ml de THF:piridina:agua (7:1:2). Esta solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min, y se añadieron, a la misma, 11 ml de una solución acuosa de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2 M. Después de que la solución se concentrase hasta que se convirtió en goma, el residuo se disolvió en 20 ml de diclorometano y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 5 ml). La capa orgánica se recogió, se lavó con una solución acuosa de TEAB 0,1 M (3 x 10 ml), y se secó en sulfato de sodio. La solución se concentró y se evaporó con tolueno (2 x 10 ml) para eliminar la piridina restante. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (1,126 g, rendimiento: 50 %).  
RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -0,52, -0,68

**Ejemplo 7: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosil-3'-O-[cianoetoxifosfino] (3'→5')-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-t-butildimetilsililadenina (2g)**

Se disolvieron 5'-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutirilguanosina-2'-O-t-butildimetilsilil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)] fosforamidita (5c, 2,8 g, 2,88 mmol) y 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-t-butildimetilsililadenina (4b, 0,7 g, 1,44 mmol) en 10 ml de acetonitrilo anhidro, y la solución se concentró hasta que se convirtió en goma. Se disolvió 5-benziltiotetrazol (1,075 g, 5,6 mmol) en 20 ml de acetonitrilo y la solución se concentró hasta que se formaron cristales. A continuación, se combinaron dos soluciones utilizando 20 ml de acetonitrilo. La solución combinada se concentró a 3 ml y se enfrió a 0 °C tras 1,5 horas, y se añadió a la misma una solución de yodo 0,5 M en 18 ml de THF:piridina:agua (7:1:2). Esta solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min, y se añadieron, a la misma, 9 ml de una solución acuosa de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2 M. La solución se concentró hasta que se convirtió en goma. El residuo se disolvió en 20 ml de diclorometano y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 5 ml). La capa orgánica se recogió, se lavó con una solución acuosa de TEAB 0,1 M (3 x 10 ml), y se secó en sulfato de sodio. La solución se concentró y se evaporó con tolueno (2 x 10 ml) para eliminar la piridina restante. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (2,182 g, rendimiento: 96 %).  
RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -0,69, -0,81

**Ejemplo III Síntesis de dímero de ARN fosforamiditas**

[Esquema de reacción 3]



Síntesis de dímeros ribonucleotídicos de ARN fosforamiditas UU, CU, GU y GA (1a a 1d).

R<sub>1</sub> = DMTr, R<sub>2</sub> = TBDMS, R = 2-cianoetil, 1a-B<sub>1</sub> = U, B<sub>2</sub> = U; 1b-B<sub>1</sub> = bzC, B<sub>2</sub> = U; 1c-B<sub>1</sub> = ibG, B<sub>2</sub> = U; 1d-B<sub>1</sub> = ibG; B<sub>2</sub> = bzA; 2d-B<sub>1</sub> = U; B<sub>2</sub> = U, 2e-B<sub>1</sub> = bzC, B<sub>2</sub> = U, 2f-B<sub>1</sub> = ibG, B<sub>2</sub> = U, 2g-B<sub>1</sub> = ibG, B<sub>2</sub> = bzA.

5 **Ejemplo 8: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-P-cianoetilfosforil-2'-O-(t-butildimetilsilil)uridil-3'-O-[(N,N-diisopropilamino)cianoetoxifosfinol (3'→5')-2'-O-t-butildimetilsililuridina (1a)**

Se disolvieron el compuesto 2d del Ejemplo 4 (0,503 g, 0,44 mmol) y 5-etiltiotetrazol (0,074 g, 0,57 mmol) en 10 ml de acetonitrilo y se concentró la solución. Se colocaron 10 ml de acetonitrilo en un matraz de reacción que se llenó a continuación con argón, y se añadió gota a gota bis-(diisopropilamino)-2-cianoetoxi fosfina (0,17 ml, 0,57 mmol). La solución de reacción se concentró a aproximadamente 1 ml, se dejó reposar durante 2 horas y a continuación se concentró por completo. El residuo se disolvió en 10 ml de diclorometano y se saturó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado (5 x 20 ml) y se secó en sulfato de sodio. La solución de reacción se concentró por completo y se añadió agua hasta que la solución se volvió turbia. La purificación se llevó a cabo utilizando una resina RP18 LiChroprep (Merck & Co., Inc., USA) para dar el compuesto del título (0,4 g, rendimiento: 70 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: ~138,4, ~148,9, ~1,03, ~0,73

20 **Ejemplo 9: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-P-cianoetilfosforil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidil-3'-O-[(N,N-diisopropilamino)cianoetoxifosfinol (3'→5')-2'-O-t-butildimetilsililuridina (1b)**

Se disolvieron el compuesto 2e del Ejemplo 5 (0,868 g, 0,70 mmol) y 5-etiltiotetrazol (0,11 g, 0,84 mmol) en 10 ml de acetonitrilo y se concentró la solución. Se colocaron 10 ml de acetonitrilo en un matraz de reacción que se llenó a continuación con argón, y se añadió gota a gota bis-(diisopropilamino)-2-cianoetoxi fosfina (0,17 ml, 0,57 mmol). La solución de reacción se concentró a aproximadamente 1 ml, se dejó reposar durante 4 horas y a continuación se concentró por completo. El residuo se disolvió en 10 ml de diclorometano y se saturó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado (5 x 20 ml) y se secó en sulfato de sodio. La solución de reacción se concentró por completo y se añadió agua hasta que la solución se volvió turbia. La purificación se llevó a cabo utilizando una resina RP18 LiChroprep para dar el compuesto del título (0,58 g, rendimiento: 60 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: ~148,7, ~143,9, ~1,18, ~0,77

35 **Ejemplo 10: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-P-cianoetilfosforil-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosisil-3'-O-[(N,N-diisopropilamino)cianoetoxifosfinol (3'→5')-2'-O-t-butildimetilsililuridina (1c)**

Se disolvieron el compuesto 2f del Ejemplo 6 (1,126 g, 0,09 mmol) y 5-etiltiotetrazol (0,15 g, 1,17 mmol) en 10 ml de acetonitrilo y se concentró la solución. Se colocaron 10 ml de acetonitrilo en un matraz de reacción que se llenó a continuación con argón, y se añadió gota a gota bis-(diisopropilamino)-2-cianoetoxi fosfina (0,35 ml, 1,17 mmol). La solución de reacción se concentró a aproximadamente 1 ml, se dejó reposar durante 4 horas y a continuación se concentró por completo. El residuo se disolvió en 10 ml de diclorometano y se saturó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado (5 x 20 ml) y se secó en sulfato de sodio. La solución de reacción se concentró por completo y se añadió agua hasta que la solución se volvió turbia. La purificación se llevó a cabo utilizando una resina RP18 LiChroprep para dar el compuesto del título (0,75 g, rendimiento: 57 %).

45 RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: ~150, ~148,9, ~0,66, ~0,49

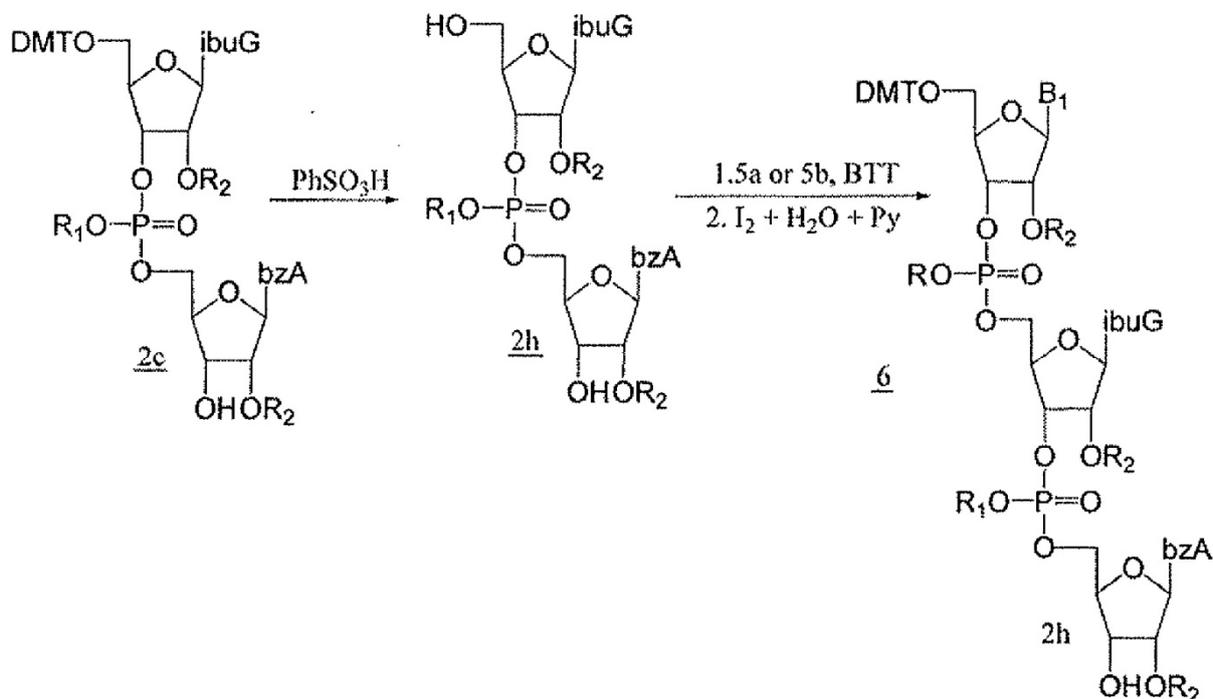
50 **Ejemplo 11: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-P-cianoetilfosforil-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosisil-3'-O-[(N,N-diisopropilamino)cianoetoxifosfinol (3'→5')-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-t-butildimetilsililadenina (1d)**

Se disolvieron el compuesto 2g del Ejemplo 7 (1,5 g, 1,09 mmol) y 5-etiltiotetrazol (0,18 g, 1,42 mmol) en 10 ml de acetonitrilo y se concentró la solución. Se colocaron 10 ml de acetonitrilo en un matraz de reacción que se llenó a continuación con argón, y se añadió gota a gota bis-(diisopropilamino)-2-cianoetoxi fosfina (0,35 ml, 1,17 mmol). La solución de reacción se concentró a aproximadamente 1 ml, se dejó reposar durante 4 horas y a continuación se concentró por completo. El residuo se disolvió en 10 ml de diclorometano y se saturó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado (5 x 20 ml) y se secó en sulfato de sodio. La solución de reacción se concentró por completo y se añadió agua hasta que la solución se volvió turbia. La purificación se llevó a cabo utilizando una resina RP18 LiChroprep para dar el compuesto del título (1,081 g, rendimiento: 63 %).

60 RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: ~150, ~148,8, ~0,63, ~0,41

**Ejemplo IV: Síntesis de trinucleótidos de ARN**

[Esquema de reacción 4]



5 Síntesis de trinucleótidos de ARN UGpA (6a) y CGpA (6b)

R<sub>1</sub> = *o*-clorofenil, R = 2-cianoetil, R<sub>2</sub> = TBDMS. 6a-B<sub>1</sub> = U, 6b-B<sub>1</sub> = bzC**10 Ejemplo 12: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(*t*-butildimetilsilil)uridin-3'-il-clorofenilfosfat-5'-il-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(*t*-butildimetilsilil)guanosin-3'-il-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-*t*-butildimetilsililadenin-5'-il-cianoetilfosfato (6a)****Etapas 1: Síntesis de N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(*t*-butildimetilsilil)guanosin-3'-il-clorofenil-fosfat-5'-il-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-*t*-butildimetilsililadenina (2h)**

15 Se añadieron 9 ml de ácido bencenosulfónico al 4 % a una solución de diclorometano:metanol (7:3) que se enfrió a 0 °C. La solución se añadió al compuesto 2c (1,265 g, 0,88 mmol), se disolvió en 9 ml de una solución de diclorometano:metanol (7:3) y se dejó reposar a 0 °C durante 3 min. Se añadieron a la misma, 25 ml de una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub>, saturado, y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado, se secó en sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el

20 compuesto del título (0,62 g, rendimiento: 63 %).

**Etapas 2: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(*t*-butildimetilsilil)uridin-3'-il-clorofenilfosfat-5'-il-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(*t*-butildimetilsilil)guanosin-3'-il-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-*t*-butildimetilsililadenin-5'-il-cianoetilfosfato (6a)**

25 Se disolvieron fosforamidita U (5a, 0,335 g, 0,39 mmol) y el compuesto de la etapa 1 (2h, 0,292 g, 0,26 mmol) en acetonitrilo anhidro y se concentró la solución. Un matraz de reacción se llenó con gas argón y se añadieron, a la misma, 10 ml de acetonitrilo anhidro. Se disolvió 5-benzitiotetrazol (0,15 g, 0,78 mmol) en 10 ml de acetonitrilo anhidro y la solución se concentró hasta que se formaron cristales, y a continuación se añadió a la solución nucleósida. La solución de reacción se concentró a aproximadamente 3 ml y se dejó reposar durante 2 horas. La

30 solución de reacción se enfrió a 0 °C, y se añadió a la misma una solución de yodo 0,5 M en 2,4 ml de THF:piridina:agua (7:1:2). La solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min, y se añadieron a la solución 1,2 ml de una solución acuosa de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2 M. Después de que la solución se concentrase hasta que se convirtió en goma, el residuo se disolvió en 20 ml de diclorometano, y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa de TEAB 0,1 M. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 5 ml). La capa orgánica se

35 recogió, se lavó con una solución acuosa de TEAB 0,1 M (3 x 10 ml), y se secó en sulfato de sodio. La solución se concentró y se evaporó con tolueno (2 x 10 ml) para eliminar la piridina restante. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (0,413 g rendimiento: 84 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -6,3, -1,4

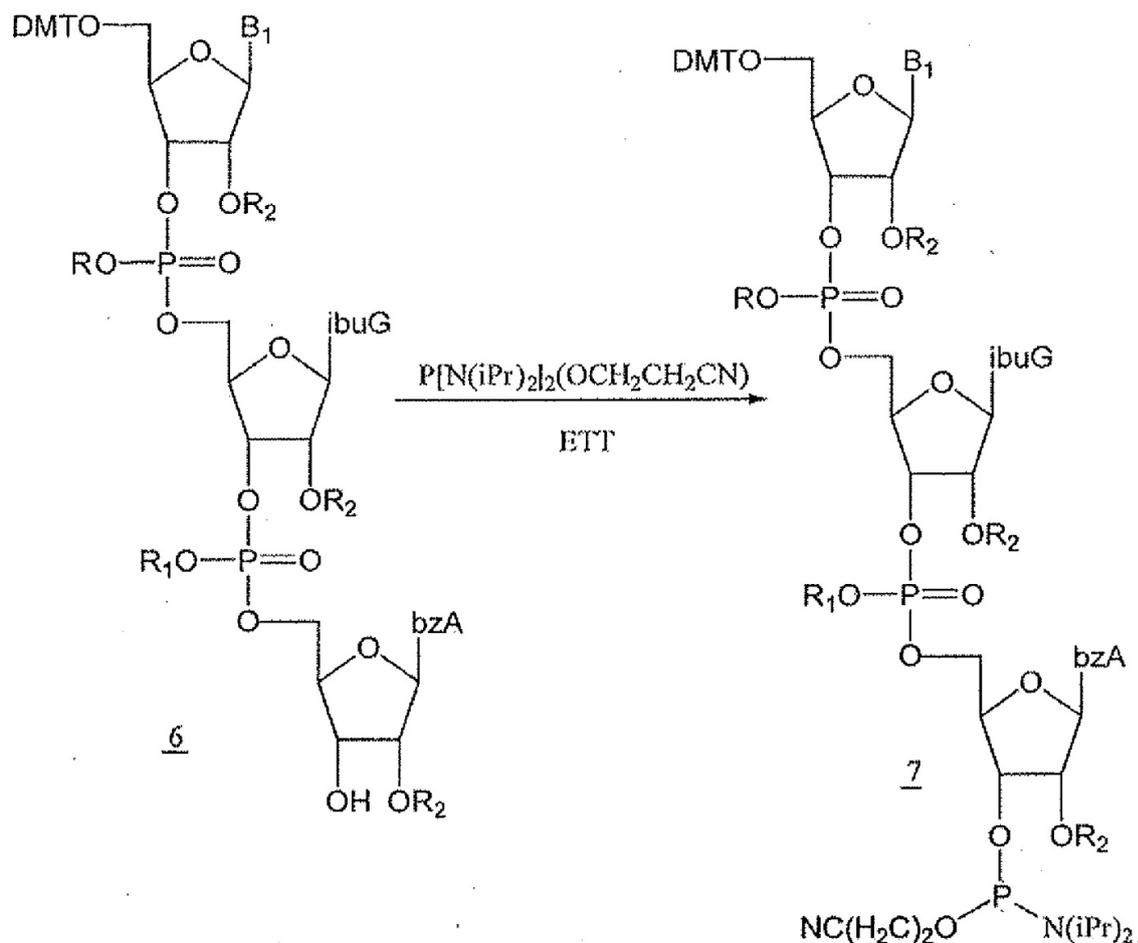
40

**Ejemplo 13: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidin-3'-il-clorofenilfosfat-5'-il-N<sup>4</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosa-3'-il-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-t-butildimetilsililadenin-5'-il-cianoetilfosfato (6b)**

- 5 Se disolvieron y se concentraron fosforamidita rC (5b, 0,409 g, 0,42 mmol) y el compuesto de la etapa 1 del Ejemplo 12 (2h, 0,238 g, 0,21 mmol) en acetonitrilo anhidro. Un matraz de reacción se llenó con gas argón y se añadieron al mismo 10 ml de acetonitrilo anhidro. Se disolvió 5-benzotetrazol (0,123 g, 0,64 mmol) en 10 ml de acetonitrilo anhidro y la solución se concentró hasta que se formaron cristales, y a continuación se añadió a la solución nucleósida. La solución de reacción se concentró a aproximadamente 3 ml y se dejó reposar durante 3 horas.
- 10 La solución de reacción se enfrió a 0 °C, y se añadió a la misma una solución de yodo 0,5 M en 2,6 ml de THF:piridina:agua (7:1:2). La solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min, y se añadieron a la misma a continuación 1,3 ml de una solución acuosa de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2 M. Después de que la solución se concentrase hasta que se convirtió en goma, el residuo se disolvió en 20 ml de diclorometano, y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa de TEAB 0,1 M. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 5 ml). La capa orgánica se recogió, se lavó con una solución acuosa de TEAB 0,1 M (3 x 10 ml), y se secó en sulfato de sodio. La solución se concentró y se evaporó con tolueno (2 x 10 ml) para eliminar la piridina restante. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (0,298 g rendimiento: 71 %).
- 15 RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: -6,3, -1,2
- 20

**Ejemplo V: Síntesis de trimero ribonucleotídico fosforamiditas**

[Esquema de reacción 5]



- 25 Síntesis de trimero ribonucleotídico fosforamiditas (7a y 7b)

R<sub>1</sub> = o-clorofenilo, R = 2-cianoetilo, R<sub>2</sub> = TBDMS. 6a, 7a-B1 = U, 6b, 7b-B1 = bzC

**Ejemplo 14: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(t-butildimetilsilil)uridin-3'-il-clorofenilfosfat-5'-il-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosin-3'-il-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-t-butildimetilsililadenin-5'-il-cianoetilfosfato-3-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita (7a)**

5 Se disolvieron y se concentraron el compuesto 6a del Ejemplo 12 (0,41 g, 0,21 mmol) y 5-etiltiotetrazol (0,037 g, 0,57 mmol) en 10 ml de acetonitrilo. Se colocaron 10 ml de acetonitrilo anhidro en un matraz de reacción que se llenó a continuación con argón, y se añadió gota a gota bis-(diisopropilamino)-2-cianoetoxi fosfina (0,084 ml, 0,28 mmol). La solución de reacción se concentró a aproximadamente 1 ml, se dejó reposar durante 4 horas, seguido de la concentración completa. El residuo se disolvió en 10 ml de diclorometano y se saturó con solución acuosa de

10 NaHCO<sub>3</sub> saturado. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado (5 x 20 ml) y se secó en sulfato de sodio. La solución de reacción se concentró por completo y se añadió agua hasta que la solución se volvió turbia. La purificación se llevó a cabo utilizando una resina RP18 LiChroprep para dar el compuesto del título (0,319 g, rendimiento: 72 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: ~150,2, ~148,9, ~-6, ~-1,4

15 **Ejemplo 15: Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-(t-butildimetilsilil)citidin-3'-il-clorofenilfosfat-5'-il-N<sup>4</sup>-isobutiril-2'-O-(t-butildimetilsilil)guanosin-3'-il-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-O-t-butildimetilsililadenin-5'-il-cianoetilfosfato-3-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita (7b)**

20 Se disolvieron y se concentraron el compuesto 6b del Ejemplo 13 (0,298 g, 0,15 mmol) y 5-etiltiotetrazol (0,025 g, 0,20 mmol) en 10 ml de acetonitrilo. Se colocaron 10 ml de acetonitrilo anhidro en un matraz de reacción que se llenó a continuación con argón, y se añadió al mismo gota a gota bis-(diisopropilamino)-2-cianoetoxi fosfina (0,06 ml, 0,20 mmol). La solución de reacción se concentró a aproximadamente 1 ml y se dejó reposar durante 4 horas, seguido de la concentración completa. El residuo se disolvió en 10 ml de diclorometano y se saturó con solución

25 acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado (5 x 20 ml) y se secó en sulfato de sodio. La solución de reacción se concentró por completo y se añadió agua hasta que la solución se volvió turbia. La purificación se llevó a cabo utilizando una resina RP18 LiChroprep para dar el compuesto del título (0,180 g, rendimiento: 60 %).

RMN <sup>31</sup>P (DMSO), δ<sub>ppm</sub>: ~150,2, ~148,9, ~-6, ~-1,0

30 **Ejemplo VI: Síntesis de ARNpi que utiliza dímero de ARN fosforamiditas**

Se sintetizaron todos los ARNpi utilizando un sintetizador de ADN/ARN Polygen (Polygen) a una escala de 0,8 μmol en su forma *tritil-off*. El extremo 3'-terminal empleó ARN CPG. El ARN CPG (Glen Research) se utilizó en una

35 cantidad de 30 μmmol/g de carga, y las bases monómeras fueron respectivamente fosforamiditas rA<sup>tac</sup>, rC<sup>tac</sup>, rG<sup>tac</sup> y U (Proligo). Se utilizaron el monómero y dímero de fosforamiditas en forma de una solución 0,05 M en acetonitrilo. Los equivalentes de los monómeros y dímeros fueron respectivamente 2,5 equivalentes por ciclo. Un activador fue 5-etiltiotetrazol 0,5 M (en acetonitrilo). Los soportes sólidos y los grupos protectores se desprotegieron al calentar la solución de reacción a 65 °C durante 2 horas utilizando una mezcla de amoníaco acuoso y etanol (3:1), y la solución

40 se liofilizó. El residuo se disolvió en 0,4 ml de una solución de N-metilpiridona:trietilamina:trihidrofluoruro de trietilamina (6:3:4) y se calentó a 65 °C durante 2 horas. Se añadieron 4 ml de alcohol *n*-butílico a la solución resultante que se enfrió a continuación en un refrigerador durante 2 horas y se centrifugó para obtener ARNpi sólidos, seguido de liofilización. El rendimiento de los ARNpi crudos se analizó cuantitativamente utilizando un espectrofotómetro UV a 260 nm y la pureza de los mismos se analizó por HPLC en fase inversa. Los coeficientes de

45 extinción de ribonucleótidos de origen natural para el cálculo de la concentración son los siguientes: rA, 15400; rC, 7200; U, 9900; y rG, 11500. Se confirmó un peso molecular de cada ARNpi por análisis de masas utilizando MALDI-TOF (Bruker, Autoflex).

**Ejemplo 16: Síntesis de ARNpi sentido GFP que utiliza el dímero de ARN GU**

50 El ARNpi sentido GFP tenía una secuencia de 5'-GUU CAG CGU GUC CGG CGA GUU-3' (SEC ID N° 1). La síntesis de ARNpi se llevó a cabo de manera análoga al Ejemplo 15, y el periodo de acoplamiento para el dímero GU y los monómeros fue de 10 min cada uno. El dímero utilizado para la primera etapa de acoplamiento fue GU, al que se unieron a continuación unidades monómeras. La pureza del producto se midió por cromatografía en fase

55 inversa, y el analizador empleado fue un sistema Agilent 1100. El tampón de cromatografía fue una mezcla de 100 nM de TEAA (pH 7,0) y acetonitrilo. La pureza y rendimiento del producto de ARNpi se compararon con los del ARNpi sentido GFP que se obtuvo utilizando el monómero en lugar del dímero como el primer ribonucleótido. Los resultados se ofrecen a continuación en la Tabla 1.

60 [Tabla 1]

Primer ribonucleótido	Pureza de ARNpi
Monómero	52 %
Dímero	73 %

**Ejemplo 17: Síntesis de ARNpi antisentido GFP que utiliza el dímero de ARN CU**

El ARNpi antisentido GFP tenía una secuencia de 5'-CUC GCC GGA CAC GCU GAA CUU-3' (SEC ID N° 2). La síntesis de ARNpi se llevó a cabo de manera análoga al Ejemplo 15, y el periodo de acoplamiento para el dímero CU y los monómeros fue de 10 min cada uno. El dímero utilizado para la primera etapa de acoplamiento fue CU, al que se unieron a continuación unidades monómeras. La pureza del producto se midió por cromatografía en fase inversa, y el analizador empleado fue un sistema Agilent 1100. El tampón de cromatografía fue una mezcla de 100 nM de TEAA (pH 7,0) y acetonitrilo. La pureza y rendimiento del producto de ARNpi se compararon con los del ARNpi antisentido GFP que se obtuvo utilizando el monómero en lugar del dímero como el primer ribonucleótido. Los resultados se aportan a continuación en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Primer ribonucleótido	Pureza de ARNpi
Monómero	63 %
Dímero	78 %

**15 Ejemplo 18: Síntesis de ARNpi antisentido JNK que utiliza el dímero de ARN UU**

El ARNpi antisentido JNK tenía una secuencia de 5'-AGA AGG UAG GAC AUU CUU UUU-3' (SEC ID N° 3). La síntesis de ARNpi se llevó a cabo de manera análoga al Ejemplo 15, y el periodo de acoplamiento para el dímero UU y los monómeros fue de 10 min cada uno. El dímero utilizado para la primera etapa de acoplamiento fue UU, al que se unieron a continuación unidades monómeras. La pureza del producto se midió por cromatografía en fase inversa, y el analizador empleado fue un sistema Agilent 1100. El tampón de cromatografía fue una mezcla de 100 nM de TEAA (pH 7,0) y acetonitrilo. La pureza y rendimiento del producto de ARNpi se compararon con los del ARNpi antisentido JNK que se obtuvo utilizando el monómero en lugar del dímero como el primer ribonucleótido. Los resultados se aportan a continuación en la Tabla 3.

25

[Tabla 3]

Primer ribonucleótido	Pureza de ARNpi
Monómero	71 %
Dímero	88 %

**Ejemplo 19: Síntesis de ARNpi sentido SEI que utiliza el dímero de ARN GA**

30

El ARNpi sentido SEI tenía una secuencia de 5'-GCA AGG GUC UGA AGC GGA A-3' (SEC ID N° 4). La síntesis de ARNpi se llevó a cabo de manera análoga al Ejemplo 15, y el periodo de acoplamiento fue de 10 min y 15 min para los monómeros y el dímero GA, respectivamente. El dímero utilizado para la primera etapa de acoplamiento fue GA, al que se unieron a continuación unidades monómeras. La pureza del producto se midió por cromatografía en fase inversa, y el analizador empleado fue un sistema Agilent 1100. El tampón de cromatografía fue una mezcla de 100 nM de TEAA (pH 7,0) y acetonitrilo. La pureza y rendimiento del producto de ARNpi se compararon con los del ARNpi sentido SEI que se obtuvo utilizando el monómero en lugar del dímero como el primer ribonucleótido. Los resultados se aportan a continuación en la Tabla 4.

40 [Tabla 4]

Primer ribonucleótido	Pureza de ARNpi
Monómero	65 %
Dímero	78 %

Aunque se han desvelado realizaciones preferentes de la presente invención con fines ilustrativos, los expertos en la materia apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance de la invención según se desvela en las reivindicaciones adjuntas.

45

**Aplicabilidad industrial**

La presente invención permite la síntesis eficiente de alta velocidad y alta pureza de oligómeros ribonucleotídicos. El método de la presente invención proporciona un oligómero ribonucleotídico que tiene una pureza del 15-20 % mayor que la de la técnica convencional.

50

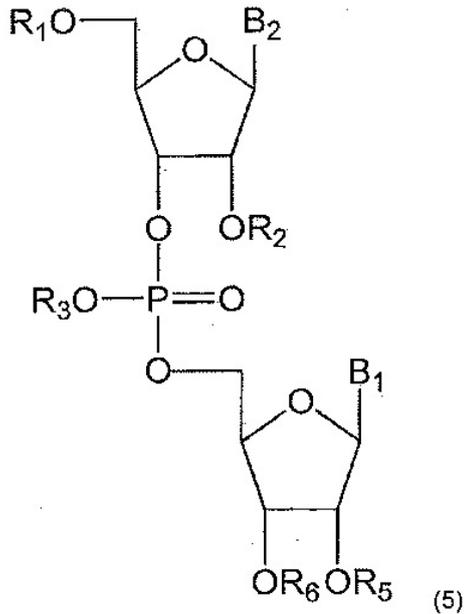
REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de oligómeros ribonucleotídicos, que comprende:

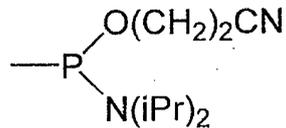
- 5 (a) acoplar un dímero ribonucleotídico o trímero ribonucleotídico a un ribonucleósido unido a soportes sólidos o a soportes sólidos universales como material de partida;
- (b) acoplar de forma secuencial monómeros ribonucleotídicos a las estructuras resultantes de la etapa (a) para preparar oligómeros ribonucleotídicos; y
- (c) eliminar los oligómeros ribonucleotídicos de los soportes sólidos.

10

en el que el dímero ribonucleotídico en la etapa (a) se representa por la Fórmula 5:



en la que cada R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente grupos protectores, cada B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son independientemente

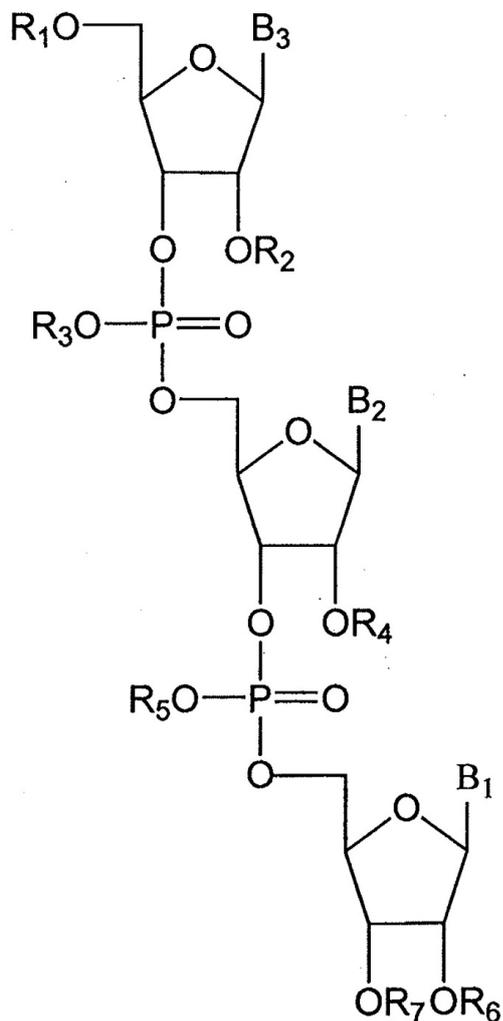


bases nucleosídicas, y R<sub>6</sub> es hidrógeno o

en el que iPr es isopropilo;

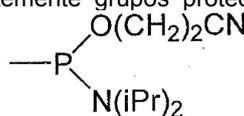
15

en el que el trímero ribonucleotídico en la etapa (a) se representa por la Fórmula 6:



(6)

en la que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  son independientemente grupos protectores, cada  $B_1$ ,  $B_2$  y  $B_3$  son independientemente bases nucleosídicas, y  $R_7$  es hidrógeno o



en el que iPr es isopropilo.

5 2. El método de la reivindicación 1, en el que el método incluye:

- (a) acoplar un dímero ribonucleotídico según la reivindicación 1 a un ribonucleósido unido a soportes sólidos o a soportes sólidos universales como material de partida;
- (b) acoplar de forma secuencial monómeros ribonucleotídicos a las estructuras resultantes de la etapa (a) para preparar oligómeros ribonucleotídicos; y
- (c) eliminar los oligómeros ribonucleotídicos de los soportes sólidos.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el método incluye:

- (a) acoplar un trímero ribonucleotídico según la reivindicación 1 a un ribonucleósido unido a soportes sólidos o a soportes sólidos universales como material de partida;
- (b) acoplar de forma secuencial monómeros ribonucleotídicos a las estructuras resultantes de la etapa (a) para preparar oligómeros ribonucleotídicos; y
- (c) eliminar los oligómeros ribonucleotídicos de los soportes sólidos.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el monómero ribonucleotídico es una fosforamidita ribonucleosido.

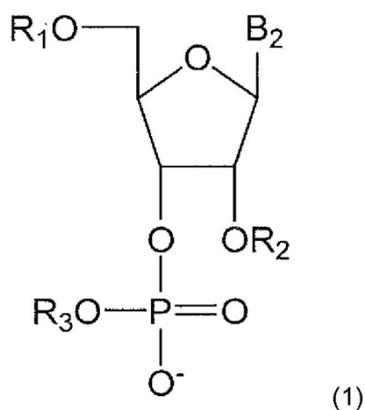
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligómero ribonucleotídico es uno que contiene al menos un ribonucleótido seleccionado entre 2'-O-halógeno ribonucleótido, 2'-amino ribonucleótido, 2'-O-alkilo ribonucleótido y 2'-O-alkoxi ribonucleótido.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligómero ribonucleotídico tiene un enlace fosfodiéster, fosforamidato, alquilfosforamidato, alquilfosfonato, fosforotioato, alquilfosfotriéster o alquilfosfonotioato.

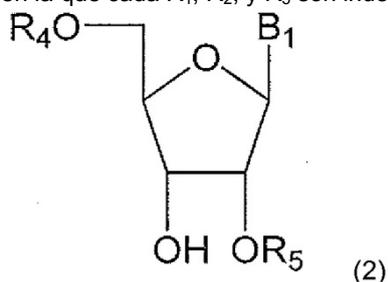
7. El método de la reivindicación 6, en el que el oligómero ribonucleotídico tiene un enlace fosfodiéster o fosforamidato.

10

8. El método de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de preparar un dímero ribonucleotídico de la etapa (a) mediante una reacción que incluye el acoplamiento de un compuesto de Fórmula 1 con un compuesto de Fórmula 2:

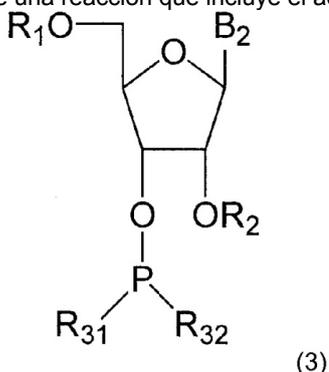


15 en la que cada  $R_1$ ,  $R_2$ , y  $R_3$  son independientemente grupos protectores, y  $B_2$  es una base nucleosídica;

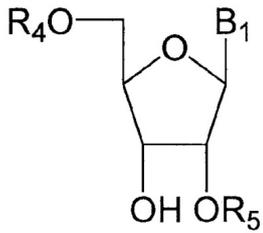


en la que cada  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente grupos protectores, y  $B_1$  es una base nucleosídica.

9. El método de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además preparar el dímero ribonucleotídico de la etapa (a) mediante una reacción que incluye el acoplamiento de un compuesto de Fórmula 3 con un compuesto de Fórmula 2:



en la que cada  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente grupos protectores,  $R_{31}$  es 2-cianoetoxi, cianometoxi, 4-ciano-2-buteniloxi o difenilmetilsililetoxi,  $R_{32}$  es diaquilamino, y  $B_2$  es una base nucleosídica;



(2)

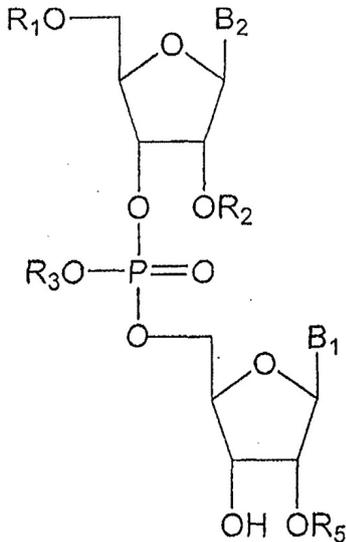
en la que cada  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente grupos protectores, y  $B_1$  es una nucleobase.

10. El método de la reivindicación 1 ó 3, que comprende además preparar el trímero ribonucleotídico de la etapa (a) 5 mediante una reacción que incluye:

(a) hacer reaccionar un dímero ribonucleotídico de Fórmula 4 con un ácido para eliminar  $R_1$  de Fórmula 4;

y

10 (b) acoplar el producto resultante de la etapa (a) con un ribonucleósido 3'-fosforamidita para preparar un trímero ribonucleotídico:



(4)

en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_5$  son independientemente grupos protectores, y cada  $B_1$  y  $B_2$  son independientemente bases nucleosídicas.

15 11. El método de la reivindicación 10, en el que el ácido de la etapa (a) es ácido bencenosulfónico.

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- 10
- US 5149798 A [0003]
  - WO 0220543 A [0017]
  - US 4458066 A [0038]
  - US 4415732 A [0038]

## Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15
- KHORANA et al. *J. Molec. Biol.*, 1972, vol. 72, 209 [0003]
  - REESE. *Tetrahedron Lett.*, 1978, vol. 34, 3143 [0003]

20

  - BEAUCAGE ; CARUTHERS. *Tetrahedron Lett.*, 1981, vol. 22, 1859 [0003]
  - AGRAWAL ; GOODCHILD. *Tetrahedron Lett.*, 1987, vol. 28, 3539 [0003]

25

  - CONNOLLY et al. *Biochemistry*, 1984, vol. 23, 3443 [0003]
  - JAGER et al. *Biochemistry*, 1988, vol. 27, 7237 [0003]

30

  - AGRAWAL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 7079 [0003]
  - METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. Protocols for Oligonucleotides and Analogs. Humana Press, 1993, vol. 20, 63-80 [0003]

35

  - Methods in Molecular Biology. Protocols for Oligonucleotide Conjugates. Humana Press, 1994, vol. 26 [0003]
  - Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach. IRL Press, 1991, 155-183 [0003]
  - Antisense Res. and Applns. CRC Press, 1993, 375 [0003]
  - Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA. Raven Press, 1992 [0003]

40

  - BARKER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 514 [0004]
  - AGRAWAL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 7079 [0004]
  - LETTER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3420-3434 [0004]
  - OFFENSPERGER et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 1257 [0004]
  - SHEN C et al. *FEBS Lett.*, 2003, vol. 539 (1-3), 111-4 [0005]
  - FIRE A et al. *Nature*, 1998, vol. 391 (6669), 806-11 [0005]
  - ELBASHIR, S.M. et al. *Nature*, 2001, vol. 411 (6836), 494-8 [0005]
  - MOULDY SIOUD. Therapeutic siRNAs. *Trends in pharmacological Sciences*, 2004, 22-28 [0006]
  - KROTZ A.H. et al. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 1997, vol. 7 (1), 73-78 [0013]
  - ELEUTERIA A et al. *Nucleosides & Nucleotides*, 1999, vol. 18 (3), 475-483 [0014]
  - CARUTHERS et al. *Genetic Engineering*, 1982, vol. 4, 1-17 [0038]
  - Users Manual Model 392 and 394 Polynucleotide Synthesizers. Applied Biosystems, 1991, 6-1, 6-22 [0038]

45