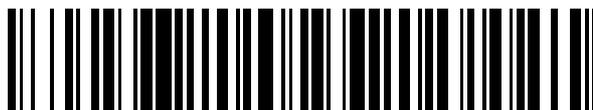


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 512**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2012 PCT/US2012/031107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12138530**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012 E 12712204 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2694524**

54 Título: **Derivados de 2'-O-aminooximetil nucleósido para su uso en la síntesis y modificación de nucleósidos, nucleótidos y oligonucleótidos**

30 Prioridad:

**04.04.2011 US 201161471451 P**

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

**25.10.2016**

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE  
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND  
HUMAN SERVICES (100.0%)  
Office of Technology Transfer National Institutes  
of Health 6001 Executive Boulevard, Suite 325  
Msc 7660  
Bethesda, MD 20892-7660**

72 Inventor/es:

**BEAUCAGE, SERGE L. y  
CIESLAK, JACEK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 587 512 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

Derivados de 2'-O-aminoximetil nucleósido para su uso en la síntesis y modificación de nucleósidos, nucleótidos y oligonucleótidos

**Referencia cruzada a una solicitud relacionada**

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos con n.º 61/471.451, presentada el 4 de abril de 2011.

**Antecedentes de la invención**

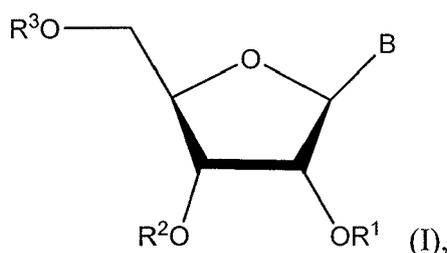
Desarrollos recientes en el silenciamiento de la expresión de genes específicos, a través de rutas de interferencia de ARN, han llevado a un aumento de demanda de secuencias de ARN sintético y han creado una necesidad apremiante de procedimientos rápidos y eficientes para la síntesis de ARN. Algunos de los requisitos para la producción de secuencias de ARN en una cantidad y en una pureza suficientes para las aplicaciones farmacéuticas son los relacionados con el diseño y la implementación de grupos protectores de hidroxilo que, históricamente, han mostrado ser de una importancia crítica en la síntesis de ARN. Además, se han investigado exhaustivamente las modificaciones químicas de la función hidroxilo de los ribonucleótidos, con el fin de identificar los parámetros biofísicos y bioquímicos que son necesarios para unas actividades de silenciamiento de genes mediado por interferencia de ARN eficaces y duraderas (véase, por ejemplo, el documento US 6.194.598). Por ejemplo, las modificaciones de 2'-hidroxilo confieren una alta afinidad de unión a las secuencias de ARN, una lipofilia aumentada, y una estabilidad química y una resistencia a nucleasa potenciadas. El grupo 2'-hidroxilo de los ribonucleósidos es también una función atractiva para la unión a ligandos; existen numerosos ejemplos de conjugados de 2' de ribonucleósido que se han notificado además de las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

A pesar de que la 2'-O-alkilación de ribonucleósidos o bien con el propio ligando o bien con un grupo funcional que puede realizar la unión a ligando indirecta se ha empleado con frecuencia en la síntesis de conjugados de 2' de ribonucleósido, este procedimiento en general está limitado por unos bajos rendimientos y la ausencia de regioselectividad. Se han realizado intentos de preparación de productos intermedios sintéticos de oligonucleótido modificado con aminooxi; véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 6.194.598, que notifica la síntesis de derivados de 2'-O-aminoxietilo. Los derivados de 2'-O-aminoxietilo, sin embargo, presentan ciertos inconvenientes tales como que la protección ofrecida por este derivado frente al grupo 2'-OH es más permanente de lo deseable.

Lo anterior muestra que existe una necesidad no satisfecha de derivados de nucleósidos O-protegidos que sean fáciles de preparar y de que el grupo protector se retire fácilmente. Existe también una necesidad no satisfecha de un procedimiento de síntesis de oligonucleótidos basándose en derivados O-protegidos de este tipo.

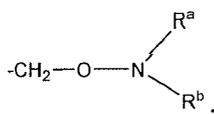
**Breve resumen de la invención**

La invención proporciona un compuesto de la fórmula (I):



en el que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

- 35 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicli alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicli, heteroarilo, un grupo protector de hidroxilo, un resto ácido nucleico o nucleótido, un soporte sólido y un grupo de la fórmula:

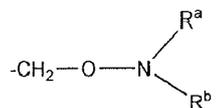


- 40 en el que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>

alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo, heteroarilo y amido, o R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> o bien independientemente o bien junto con el N forman una imida o una imina;

o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> forman juntos un anillo protector de hidroxilo;

en el que al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> es

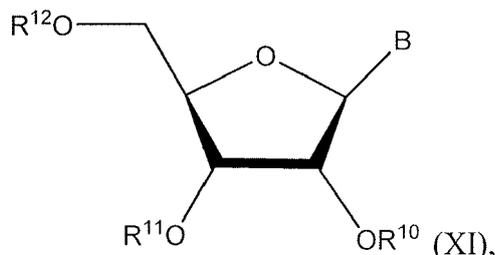


Los compuestos de la fórmula (I) tienen una o más de las siguientes características ventajosas: (i) el compuesto O-  
protegido, en concreto el compuesto 2'-O-protegido, es estable durante las diversas etapas de reacción implicadas  
en la síntesis de oligonucleótidos; el grupo protector se puede retirar fácilmente después de la síntesis del  
oligonucleótido, por ejemplo, por reacción con fluoruro de tetrabutilamonio; (ii) los grupos O-protegidos, en concreto  
los grupos 2'-O-protegidos del compuesto de la fórmula (I) no generan productos secundarios de alquilación de  
ADN/ARN, que se han notificado durante la retirada de grupos 2'-O-(2-cianoetil)oximetilo o 2'-O-[2-(4-  
tolilsulfonil)etoximetilo en unas condiciones similares; (iii) la facilidad de la introducción del grupo O-protector para  
producir el compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con un plan de síntesis que es compatible con purina y pirimidina  
ribonucleósidos; (iv) la versatilidad de ser útil para etiquetar, de forma transitoria o permanente, secuencias de ARN  
y/o de ADN; y (v) permitir la síntesis de secuencias de ARN nativas o modificadas con la flexibilidad de seleccionar  
diversos grupos O-protectores o funcionales.

La invención también proporciona un método para preparar el compuesto de la fórmula (I). La invención también  
proporciona un método para preparar un oligorribonucleótido de longitud de cadena n, en el que n es el número de  
residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento la adición por etapas de residuos  
de nucleótido al extremo 5' terminal de una cadena de crecimiento en la que los residuos de nucleótido están  
protegidos en la posición 2' con un grupo protector de aminooximetilo.

La invención también proporciona un método para preparar un oligorribonucleótido de longitud de cadena n, en el  
que n es el número de residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento:

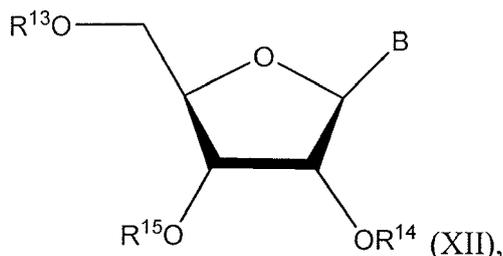
(i) proporcionar un sustrato que comprende un nucleósido protegido en una de la función 2'-, 3'- o 5'- hidroxil con  
un grupo protector derivado de aminooximetilo y un soporte sólido unido de forma covalente a una de las  
funciones hidroxil restantes, teniendo dicho sustrato la fórmula (XI):



en el que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

en el que al menos uno de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> es un grupo protector derivado de aminooximetilo y el otro de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup>  
es un soporte sólido, opcionalmente unido al átomo de oxígeno a través de un grupo carbonilo (>C=O); y R<sup>12</sup>  
es H;

(ii) proporcionar una fosforamidita de nucleósido 5'-OH-protegido de la fórmula (XII):



en el que:

R<sup>13</sup> es un grupo protector de hidroxilo;

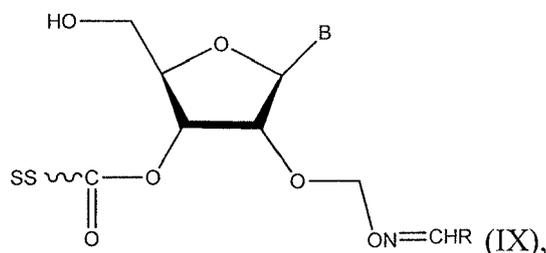
R<sup>14</sup> es un grupo protector derivado de aminooximetilo de la fórmula -CH<sub>2</sub>-O-N=CHR<sup>16</sup> y R<sup>15</sup> es un grupo

fosforamidita, si  $R^{10}$  del sustrato de la fórmula (XI) es un grupo protector derivado de aminooximetilo y  $R^{11}$  es un soporte sólido, opcionalmente unido a través de un grupo carbonilo ( $>C=O$ ); o  $R^{15}$  es un grupo protector derivado de aminooximetilo de la fórmula  $-CH_2-O-N=CHR^{16}$  y  $R^{14}$  es un grupo fosforamidita, si  $R^{11}$  del sustrato de la fórmula (XI) es un grupo protector derivado de aminooximetilo y  $R^{10}$  es un soporte sólido, opcionalmente unido a través de un grupo carbonilo ( $>C=O$ ); en el que  $R^{16}$  se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, haloalquilo, cianoalquilo, alcoxialquilo, ariloxialquilo, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfinilalquilo, arilsulfinilalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, cianohaloalquilo, alcoxihaloalquilo, ariloxihaloalquilo, alquiltiohaloalquilo, ariltiohaloalquilo, alquilsulfinilhaloalquilo, arilsulfinilhaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo y arilsulfonilhaloalquilo; en el que el grupo fosforamidita de  $R^{14}$  o  $R^{15}$  es de la fórmula:  $-P(R^{17})(OR^{18})$ , en el que  $R^{17}$  es un grupo N,N-dialquilamino o un grupo heterocíclico saturado que tiene al menos un átomo de nitrógeno, opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O y S; y  $OR^{18}$  es un grupo protector de fósforo;

- (iii) acoplar el derivado de la fórmula (XII) con el sustrato de la fórmula (XI) para obtener un producto que comprende el sustrato acoplado al derivado de la fórmula (XII);
- (iv) terminar en 5' el sustrato sin reaccionar de la fórmula (XI) de la etapa (iii);
- (v) oxidar la función fosfito triéster presente en el producto de la etapa (iii) para obtener un producto que tiene una función fosfato triéster protegida;
- (vi) desproteger el grupo 5'-hidroxi del producto de la etapa (v);
- (vii) repetir las etapas (iii) - (vi)  $n - 1$  veces para construir una cadena de oligonucleótido protegida que contiene "n" residuos de nucleótido sobre el soporte sólido;
- (viii) retirar la nucleobase y grupos protectores de fosfato y escindir el oligonucleótido del soporte sólido; y
- (ix) opcionalmente desproteger el grupo 2'-OH o el grupo 3'-OH.

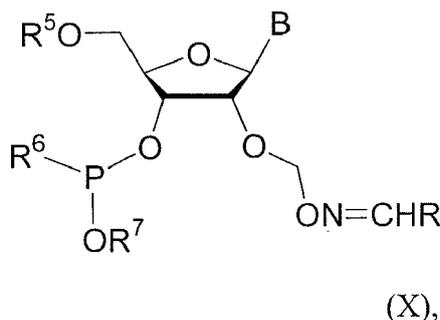
En una realización, la presente invención adicional proporciona un método para preparar un oligorribonucleótido de longitud de cadena n, en el que n es el número de residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento:

- (i) proporcionar un sustrato que comprende un nucleósido protegido en la función 2'-hidroxi con un grupo protector derivado de aminooximetilo y un soporte sólido unido de forma covalente a su función 3'-hidroxi, teniendo dicho sustrato la fórmula (IX):



en el que B es una nucleobase opcionalmente protegida; R se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, haloalquilo, cianoalquilo, alcoxialquilo, ariloxialquilo, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfinilalquilo, arilsulfinilalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, cianohaloalquilo, alcoxihaloalquilo, ariloxihaloalquilo, alquiltiohaloalquilo, ariltiohaloalquilo, alquilsulfinilhaloalquilo, arilsulfinilhaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo y arilsulfonilhaloalquilo; y SS es un soporte sólido;

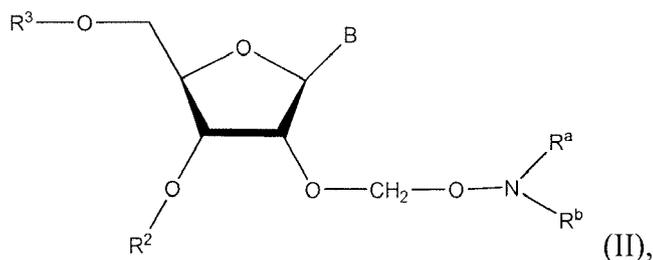
- (ii) proporcionar una fosforamidita de nucleósido 5'-OH-protégido de la fórmula (X):



en el que  $R^5$  es un grupo protector de hidroxilo;  $R^6$  es un grupo N,N-dialquilamino o un grupo heterocíclico saturado que tiene al menos un átomo de nitrógeno, opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O y S;  $OR^7$  es un grupo protector de fósforo;

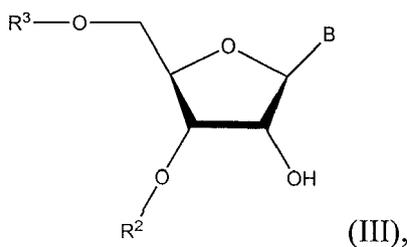
- (iii) acoplar el derivado de la fórmula (X) con el sustrato de la fórmula (IX) para obtener un producto que comprende el sustrato acoplado al derivado de la fórmula (X);  
 (iv) terminar en 5' cualquier sustrato sin reaccionar de la fórmula (IX) de la etapa (iii);  
 (v) oxidar la función fosfito triéster presente en el producto de la etapa (iii) para obtener un sustrato que tiene una función fosfato triéster protegida;  
 (vi) desproteger el grupo 5'-hidroxi del producto de la etapa (v);  
 (vii) repetir las etapas (iii) - (vi) n - 1 veces para construir una cadena de oligonucleótido protegida que contiene "n" residuos de nucleótido sobre el soporte sólido;  
 (viii) retirar la nucleobase y grupos protectores de fosfato y escindir el oligonucleótido del soporte sólido; y  
 (ix) opcionalmente desproteger el grupo 2'-OH.

La presente invención también proporciona un método para preparar un compuesto de la fórmula II:

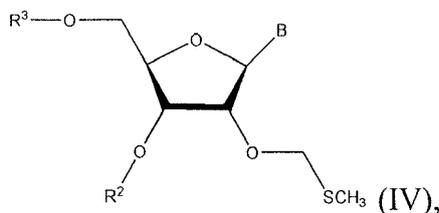


en el que B es una nucleobase opcionalmente protegida;  
 R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicalcoalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicliil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicliilo, heteroarilo y amido, o R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> o bien independientemente o bien junto con el N forman una imida o una imina;  
 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicalcoalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicliil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicliilo, heteroarilo, un grupo protector de hidroxilo, un resto ácido nucleico, un resto nucleótido y un soporte sólido; comprendiendo el procedimiento:

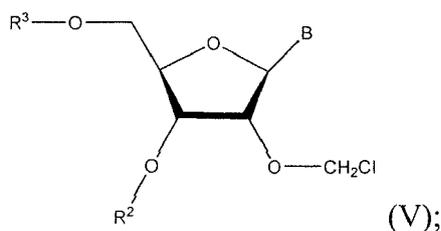
- (i) convertir el grupo 2'-OH en un grupo 2'-metiltiometoxi del compuesto de la fórmula (III)



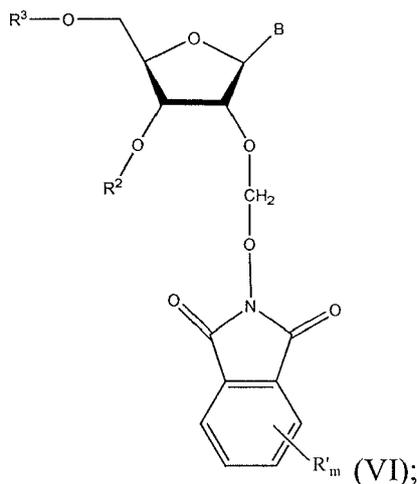
para obtener un compuesto de la fórmula (IV):



- (ii) convertir el grupo 2'-metiltiometoxi en un grupo 2'-clorometoxi para obtener un compuesto de la fórmula (V):

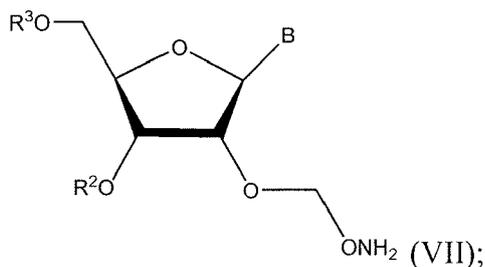


(iii) convertir el grupo 2'-clorometoxi del compuesto de la fórmula (V) para obtener un compuesto de la fórmula (VI);



5 en el que R' es H o un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en halo, hidroxilo, ciano, formilo, acilo, alquil carbonilo, carboxilo, fosforilo, fosfonilo, fosfona alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, sulfonilo, ciano, nitro, alcoxi, alquiltio, acilo, aciloxi, tioacilo, aciltio, ariloxi, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, guanidina, aldehído, ureido, aminocarbonilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y m es 1 a 4;

10 (iv) hacer reaccionar el compuesto de la fórmula (VI) con fluoruro de amonio para obtener un compuesto de la fórmula VII, *in situ*,



15 y (v) hacer reaccionar el compuesto de la fórmula VII con un compuesto que tiene grupo aldehído o cetona para obtener un compuesto de la fórmula (II).

**Breve descripción de las varias vistas de los dibujos**

20 La figura 1 muestra a un diagrama esquemático para la preparación de los productos intermedios **2a - 2d**, **3a - 3d**, **4a - 4d**, y **5a - 5d** y los compuestos **6a - 6d** de la fórmula (I) de acuerdo con una realización de la invención. Los compuestos **1a - 1d** están disponibles en el mercado.

La figura 2 muestra las estructuras de los compuestos **8**, **10**, **12**, **14**, y **16** de acuerdo con una realización de la invención y de los compuestos **7**, **9**, **11**, **13**, y **15** que se usaron para preparar los compuestos **8**, **10**, **12**, **14**, y **16**, respectivamente.

25 La figura 3 ilustra la conversión asistida por fluoruro de los ribonucleósidos 2'-O-pirenilados (**6a - d**) de acuerdo con una realización de la invención en ribonucleósidos nativos. TBAF: fluoruro de tetra-*n*-butilamonio; B: uracil-1-ilo, citosin-1-ilo, adenin-9-ilo o guanin-9-ilo.

La figura 4 muestra el análisis por RP-HPLC de la conversión asistida por fluoruro de 2'-O-(piren-1-ilmetanimina-

*N*-oximetil)uridina (**6a**) purificada con gel de sílice en uridina, en la que el eje X es el tiempo de retención en minutos y el eje Y es la intensidad en unidades arbitrarias (UA).

La figura 4A muestra el cromatograma del compuesto **6a** purificado con gel de sílice.

La figura 4B muestra el cromatograma de la conversión del compuesto **6a** en uridina (pico en aproximadamente 10 minutos de tiempo de retención) por tratamiento con fluoruro de tetra-*n*-butilamonio 0,5 M en THF durante 3 h a 55 °C.

La figura 4C muestra el cromatograma de unas muestras disponibles en el mercado de uridina y de pireno-1-carbonitrilo (**17**) mezcladas. Condiciones para esta figura así como para las figuras 5 - 9: el análisis por RP-HPLC se realizó usando detección UV (254 nm) y una columna Supelcosil LC-18S de 5 µm (25 cm X 4,6 mm) de acuerdo con las siguientes condiciones: partiendo de trietilacetato de amonio 0,1 M de pH 7,0, un gradiente lineal de un 1 % de MeCN/min se bombeó a un caudal de 1 ml/min durante 40 min; el gradiente a continuación se aumentó a un 6 % de MeCN/min durante 10 min al mismo caudal y se mantuvo isocrático durante 15 min más. Las alturas de pico se normalizan con respecto al pico más alto, que se ajusta a 1 unidad arbitraria.

La figura 5 muestra el análisis por RP-HPLC de la conversión asistida por fluoruro del conjugado biotinilado **10** purificado con gel de sílice en uridina.

La figura 5A muestra el cromatograma del conjugado de biotina-uridina **10** purificado con gel de sílice.

La figura 5B muestra el cromatograma de la conversión del compuesto **10** en uridina por tratamiento con fluoruro de tetra-*n*-butilamonio 0,5 M en THF durante 6 h a 55 °C.

La figura 5C muestra el cromatograma de una muestra disponible en el mercado de uridina.

La figura 6 muestra el análisis por RP-HPLC de la conversión asistida por fluoruro del conjugado de uridina dansilado **12** purificado con gel de sílice en uridina.

La figura 6A muestra el cromatograma del conjugado **12** purificado con gel de sílice.

La figura 6B muestra el cromatograma de la conversión del compuesto **12** en uridina por tratamiento con fluoruro de tetra-*n*-butilamonio 0,5 M en THF durante 24 h a 55 °C.

La figura 6C muestra el cromatograma de una muestra disponible en el mercado de uridina.

La figura 7 muestra el análisis por RP-HPLC de la conversión asistida por fluoruro del conjugado de uridina dansilado **14** purificado con gel de sílice en uridina.

La figura 7A muestra el cromatograma del conjugado **14** purificado con gel de sílice.

La figura 7B muestra el cromatograma de la conversión del compuesto **14** en uridina por tratamiento con fluoruro de tetra-*n*-butilamonio 0,5 M en THF durante 48 h a 55 °C.

La figura 7C muestra el cromatograma de una muestra disponible en el mercado de uridina mezclada conjuntamente con una muestra analítica de *N*-(4-cianobut-1-il)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (**18**).

La figura 8 muestra el análisis por RP-HPLC de la conversión asistida por fluoruro del conjugado de uridina dansilado **19** purificado con gel de sílice en uridina.

La figura 8A muestra el cromatograma del compuesto **19** purificado con gel de sílice.

La figura 8B muestra el cromatograma de la conversión del compuesto **19** en uridina por tratamiento con fluoruro de tetra-*n*-butilamonio 0,5 M en THF durante 72 h a 55 °C.

La figura 9 muestra el análisis por RP-HPLC de la conversión asistida por fluoruro del conjugado de uridina dansilada **16** purificado con gel de sílice en uridina.

La figura 9A muestra el cromatograma del compuesto **16** purificado con gel de sílice.

La figura 9B muestra el cromatograma de la conversión del compuesto **16** en citidina por tratamiento con fluoruro de tetra-*n*-butilamonio 0,5 M en THF durante 24 h a 55 °C.

La figura 9C muestra el cromatograma de una muestra disponible en el mercado de citidina.

La figura 10 ilustra algunas de las etapas de reacciones que se pueden emplear en la preparación de oligonucleótidos de acuerdo con una realización de la invención, en la que R = H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)F, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -CH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)S(O)CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CY(Z)F, -CY(Z)CN, -CY(Z)OCH<sub>3</sub>, -CY(Z)SCH<sub>3</sub>, -CY(Z)S(O)CH<sub>3</sub>, o -CY(Z)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, en el que Y es F o CH<sub>3</sub> y Z es F o CH<sub>3</sub>.

La figura 11 ilustra unas etapas adicionales que se pueden emplear en la preparación de oligonucleótidos de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 12 ilustra un procedimiento de síntesis de fase sólida del fosfodiéster de dinucleósido UpT a partir de la fosforamidita de ribonucleósido **22a** (R = H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)F, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -CH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)S(O)CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CY(Z)F, -CY(Z)CN, -CY(Z)OCH<sub>3</sub>, -CY(Z)SCH<sub>3</sub>, -CY(Z)S(O)CH<sub>3</sub>, o -CY(Z)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, en el que Y es F o CH<sub>3</sub> y Z es F o CH<sub>3</sub>). Condiciones: (i) el compuesto **22a**, 1*H*-tetrazol, MeCN, 3 min; (ii) I<sub>2</sub> 0,02 M en THF/piridina/H<sub>2</sub>O; (iii) TCA al 3 %, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3 min; (iv) NH<sub>3</sub> conc., 25 °C, 30 min; (v) *n*-Bu<sub>4</sub>NF 0,5 M, DMSO, 55 °C, 1 h; Keys: Ura, uracil-1-ilo; Thy, timin-1-ilo; CPG, vidrio de poro controlado; DMTr, 4,4'-dimetoxitritilo.

La figura 13 compara el análisis por RP-HPLC de r(Up)<sub>20</sub>dT que se prepara a partir de o bien la fosforamidita de ribonucleósido **22a** (R = CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>) o bien fosforamiditas de 2'-O-TBDMS ribonucleósido disponibles en el mercado, en la que el eje X es el tiempo de retención en minutos y el eje Y es la intensidad en unidades arbitrarias (UA).

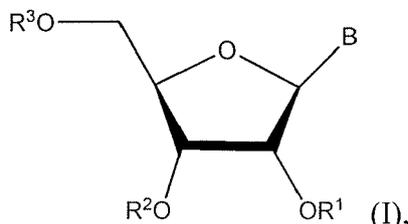
La figura 13A muestra el cromatograma de RP-HPLC de r(Up)<sub>20</sub>dT no purificado y desalado que se prepara a partir de la 2'-O-TBDMS uridina fosforamidita disponible en el mercado en las condiciones de síntesis y de desbloqueo que se notifican en la bibliografía.

La figura 13B muestra el cromatograma de RP-HPLC de r(Up)<sub>20</sub>dT no purificado y desalado que se prepara a partir del ribonucleósido **22a** (R = CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>) en las condiciones de síntesis y de desbloqueo que se describen

en el Ejemplo 2 [0136 - 0137].

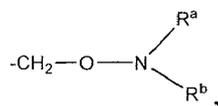
### Descripción detallada de la invención

De acuerdo con una realización, la invención proporciona un compuesto O-protogado de la fórmula (I):



5 en el que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

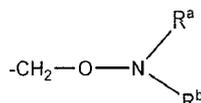
10 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo, heteroarilo, un grupo protector de hidroxilo, un resto ácido nucleico, un resto nucleótido, un soporte sólido y un grupo de la fórmula:



15 en el que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo, heteroarilo y amido, o R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> o bien independientemente o bien junto con el N forman una imida o una imina;

o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> forman juntos un anillo protector de hidroxilo;

en el que al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> es



20 De acuerdo con la invención, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono-, bi- o tricíclico que tiene uno, dos, o tres anillos aromáticos, por ejemplo, fenilo, naftilo, antraceniilo o bifenilo. El término "arilo" se refiere a un resto carbocíclico aromático no sustituido o sustituido, tal como se entiende comúnmente en la técnica, e incluye compuestos aromáticos monocíclicos y policíclicos tales como, por ejemplo, fenilo, bifenilo, naftilo, antraceniilo, pirenilo, y similares. Un resto arilo contiene en general, por ejemplo, de 6 a 30 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 18 átomos de carbono, más preferiblemente de 6 a 14 átomos de carbono y lo más preferiblemente de 6 a 10 átomos de carbono. Se entiende que el término arilo incluye restos carbocíclicos que son planos y comprenden 4 n + 2 π electrones, de acuerdo con la Regla de Hückel, en el que n = 1, 2 o 3.

30 De acuerdo con una realización, el grupo alquilo puede ser un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, preferiblemente un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Los ejemplos de grupo alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo, y similares. Esta definición también es de aplicación siempre que aparezca "alquilo", tal como en hidroxialquilo, monohalo alquilo, dihalo alquilo y trihalo alquilo. De acuerdo con una realización, el grupo alquenilo es preferiblemente un alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>. Los ejemplos de grupo alquenilo incluyen etenilo, alilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 1-hexenilo, y similares. De acuerdo con una realización, el grupo alcoxi es preferiblemente un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>. Los ejemplos de grupo alcoxi incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, isobutoxi, terc-butoxi, n-pentoxi, isopentoxi, n-hexoxi, y similares. El término "halo" se refiere a un halógeno que se selecciona de entre el grupo que consiste en flúor, cloro, bromo, y yodo, preferiblemente flúor.

40 De acuerdo con la invención, el término "heteroarilo" se refiere a un radical aromático cíclico que tiene de cinco a diez átomos en el anillo de que al menos un átomo es O, S o N, y los átomos restantes son de carbono. Los ejemplos de radicales heteroarilo incluyen piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo e isoquinolinilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen piridilo, piperidinilo, piperazinilo, pirazinilo, pirrolilo, piranilo, tetrahidropiranilo,

tetrahidrotiopiraniolo, pirrolidinilo, furanilo, tetrahidrofuranilo, tiofenilo, tetrahidrotiofenilo, purinilo, pirimidinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, tiazolinilo, oxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tetrazinilo, benzoxazolilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, quinolinilo e isoquinolinilo.

5 Cualquiera de los grupos que comprenden alquilo puede ser lineal o ramificado. Cuando un grupo arilo está sustituido con un sustituyente, por ejemplo, halo, amino, alquilo, hidroxilo, alcoxi, y otros, el hidrógeno del anillo aromático se sustituye con el sustituyente y esto puede tener lugar en cualquiera de los hidrógenos disponibles, por ejemplo, las posiciones 2, 3, 4, 5 y/o 6 en las que la posición 1 es el punto de unión del grupo arilo en el compuesto de la presente invención.

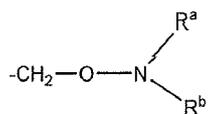
10 Siempre que se indique un intervalo del número de átomos en una estructura (por ejemplo, un alquilo, alquilamino, etc., C<sub>1-12</sub>, C<sub>1-8</sub>, C<sub>1-6</sub>, o C<sub>1-4</sub>), se contempla especialmente que también se pueda usar cualquier sub-intervalo o número individual de átomos de carbono que caiga dentro del intervalo indicado. Por lo tanto, por ejemplo, la exposición de un intervalo de 1 - 8 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1-8</sub>), 1 - 6 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1-6</sub>), 1 - 4 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1-4</sub>), 1 - 3 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1-3</sub>), o 2 - 8 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>2-8</sub>) tal como se usa con respecto a cualquier grupo químico (por ejemplo, alquilo, alquilamino, etc.) al que se haga referencia en el presente documento abarca y describe de forma específica 1, 2, 3, 15 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y/o 12 átomos de carbono, según sea apropiado, así como cualquier sub-intervalo de los mismos (por ejemplo, 1 - 2 átomos de carbono, 1 - 3 átomos de carbono, 1 - 4 átomos de carbono, 1 - 5 átomos de carbono, 1 - 6 átomos de carbono, 1 - 7 átomos de carbono, 1 - 8 átomos de carbono, 1 - 9 átomos de carbono, 1 - 10 átomos de carbono, 1 - 11 átomos de carbono, 1 - 12 átomos de carbono, 2 - 3 átomos de carbono, 2 - 4 átomos de carbono, 2 - 5 átomos de carbono, 2 - 6 átomos de carbono, 2 - 7 átomos de carbono, 2 - 8 átomos de carbono, 2 - 9 átomos de carbono, 2 - 10 átomos de carbono, 2 - 11 átomos de carbono, 2 - 12 átomos de carbono, 3 - 4 átomos de carbono, 3 - 5 átomos de carbono, 3 - 6 átomos de carbono, 3 - 7 átomos de carbono, 3 - 8 átomos de carbono, 3 - 9 átomos de carbono, 3 - 10 átomos de carbono, 3 - 11 átomos de carbono, 3 - 12 átomos de carbono, 4 - 5 átomos de carbono, 4 - 6 átomos de carbono, 4 - 7 átomos de carbono, 4 - 8 átomos de carbono, 4 - 9 átomos de carbono, 4 - 10 átomos de carbono, 4 - 11 átomos de carbono y/o 4 - 12 átomos de carbono, etc., según sea apropiado).

De acuerdo con una realización, la nucleobase o nucleobase protegida puede ser cualquier nucleobase adecuada, por ejemplo, la nucleobase incluirá aquellos restos que contienen no solo las bases de purina y de pirimidina de origen natural, por ejemplo, adenina (A), timina (T), citosina (C), guanina (G) o uracilo (U), sino también bases de purina y de pirimidina modificadas y otras bases heterocíclicas que se han modificado. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, y similares, o la adición de un grupo protector tal como acetilo, difluoroacetilo, trifluoroacetilo, isobutirilo, benzoilo, o similares. La base de purina o de pirimidina también puede ser un análogo de los anteriores; los expertos en la materia conocerán análogos adecuados y estos se describen en los textos y la bibliografía pertinentes. Los ejemplos de análogos incluyen, pero 30 sin limitación, una nucleobase que se selecciona de entre el grupo que consiste en citosina, adenina, guanina, uracilo, timina, xantina, hipoxantina, derivados de alquilo de los mismos, derivados de amino de los mismos, derivados de halógeno de los mismos, y similares. En unas realizaciones, ejemplos de nucleobases o nucleobases protegidas incluyen 2- u 8- amino adenina, 2- u 8-alquilo adenina, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, 2,6-diaminopurina, 6-aza uracilo, 4-tio uracilo, 5- trifluorometil uracilo, 5-trifluorometil citosina, 6-aza timina, 6-tioguanina, 7- 35 desazaadenina, 7-desazaguanina, 8- mercapto adenina, 8-tioalquilo adenina, 8-hidroxil/oxo adenina, 8-mercapto guanina, 8-tioalquil guanina, y 8-hidroxil/oxo guanina.

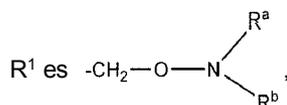
Ejemplos adicionales de nucleobases o nucleobases protegidas incluyen 1-metiladenina, 2-metiladenina, N<sup>6</sup>-metiladenina, N<sup>6</sup>-isopentiladenina, 2-metil-N<sup>6</sup>-isopentiladenina, N,N-dimetiladenina, 8-bromo adenina, 2- tiocitosina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, 5-etilcitosina, 4-acetilcitosina, 1-metilguanina, 2-metilguanina, 7-metilguanina, 2,2- 45 dimetilguanina, 8-bromoguanina, 8-cloroguanina, 8-aminoguanina, 8-metilguanina, 8-tioguanina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, 5-etiluracilo, 5-propiluracilo, 5-metoxiuracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-(metilaminometil)uracilo, 5-(carboximetilaminometil)- uracilo, 2-tiouracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-(2-bromovinil)uracilo, ácido uracil-5-oxiacético, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, 1-metilpseudouracilo, queosina, inosina, 1-metilinosina, hipoxantina, xantina, 2-aminopurina, 6- 50 hidroxiaminopurina, 6-tiopurina y 2,6-diaminopurina.

De acuerdo con unas realizaciones de la invención, la nucleobase opcionalmente protegida es una nucleobase cuyo grupo amino exocíclico está protegido por un grupo protector lábil, grupos de ácido o de base lábil según sea apropiado. Los ejemplos de grupos protectores incluyen, por ejemplo, amidas (por ejemplo, trifluoroacetil, acetil, fenoxiacetil, terc-butilfenoxiacetil, benzoil e isobutiril amidas), carbamatos (por ejemplo, *terc*-butiloxycarbonilo, (4- 55 nitrofenil)etiloxycarbonilo y N-benciloxycarbonilo), tritilo, amidinas y similares. Estos se definen en la bibliografía: véase, por ejemplo, Iyer, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Vol. 1 (Beaucage S. L., Bergstrom, D. E., Glick, G. D. Jones R. A. eds); John Wiley & Sons: Nueva York, 2000, págs. 2.1.1 - 2.1.17; Beaucage, *et al.*, *Tetrahedron*, 48, 2223 - 2311 (1992); y McBride *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 2040 - 2048 (1986).

De acuerdo con unas realizaciones, al menos uno o dos de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, y R<sup>3</sup> pueden ser



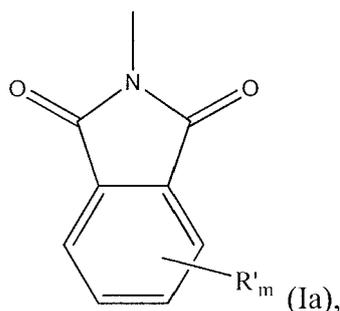
De acuerdo con cualquiera de las realizaciones, en el compuesto de la fórmula (I),



5 en el que  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_6$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , cicloalqueno  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , dicicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , bicicloalquilo  $\text{C}_7\text{-C}_{12}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , tricicloalquilo  $\text{C}_7\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , diarilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , heterociclil alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , heterociclilo, heteroarilo y amido, o  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  o bien independientemente o bien junto con el N forman una imida o una imina; y  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_6$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , cicloalqueno  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , dicicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , bicicloalquilo  $\text{C}_7\text{-C}_{12}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , tricicloalquilo  $\text{C}_7\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , diarilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , heterociclil alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , heterociclilo, heteroarilo, un grupo protector de hidroxilo, un resto ácido nucleico, un resto nucleótido y un soporte sólido; o  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  forman juntos un anillo protector de hidroxilo.

15 De acuerdo con una realización,  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  juntos forman una imida.

De acuerdo con una realización,  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  juntos forman un grupo imida, por ejemplo, un grupo imida de la fórmula (Ia)

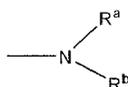


20 en el que  $\text{R}'$  es H o un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en halo, hidroxilo, ciano, formilo, acilo, alquil carbonilo, carboxilo, fosforilo, fosfonilo, fosfona alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , sulfonilo, ciano, nitro, alcoxi, alquiltio, acilo, aciloxi, tioacilo, aciltio, ariloxi, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, guanidina, aldehído, ureido, aminocarbonilo, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , halo alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , hidroxilo alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_6$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , cicloalqueno  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  y arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ; y m es 1 a 4. En una realización preferida,  $\text{R}'$  es H.

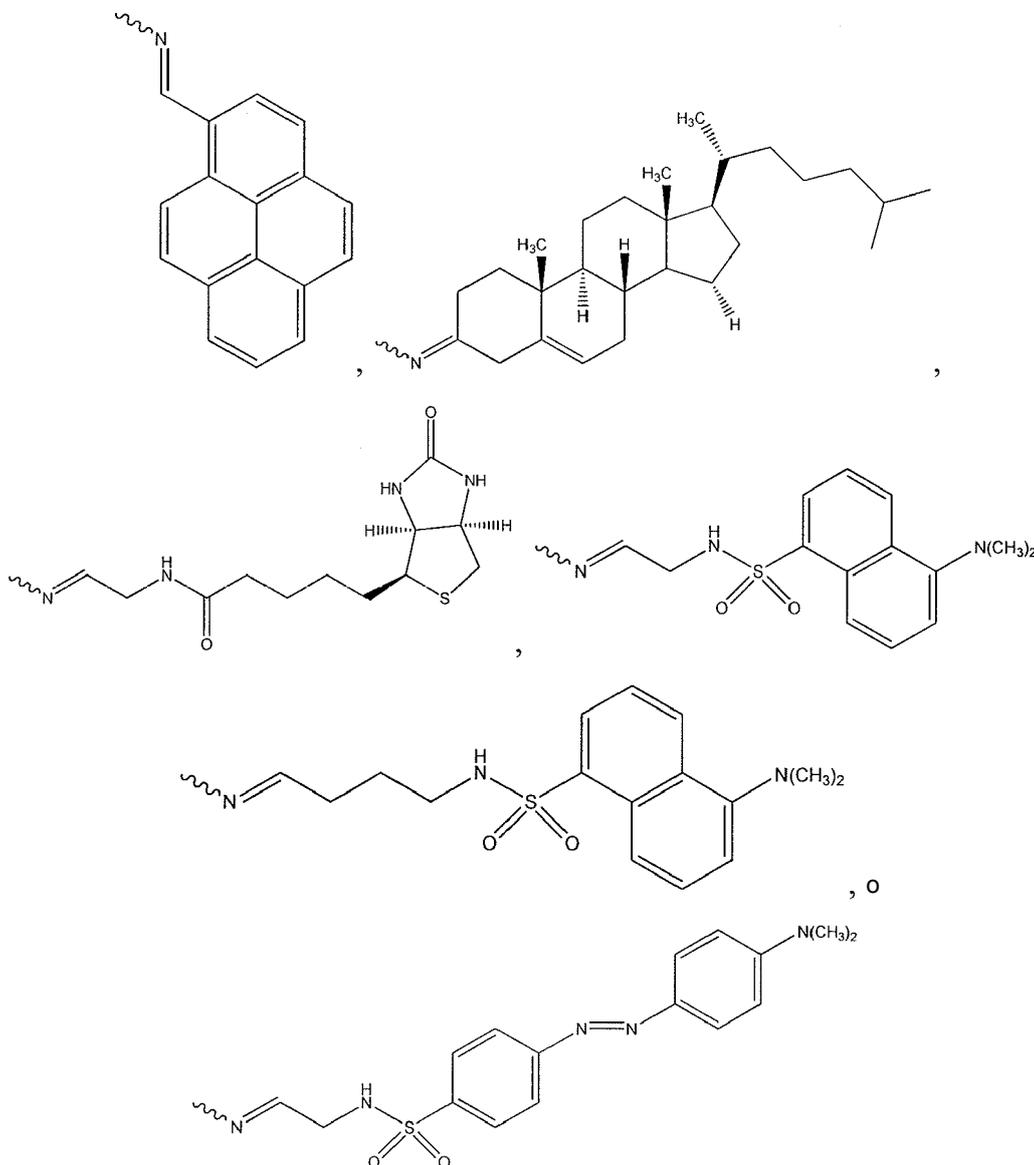
25 De acuerdo con una realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula (I), en el que  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  forman un fragmento de un grupo funcional, que podría ser, por ejemplo,  $=\text{CHR}$ , en el que R se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, haloalquilo, cianoalquilo, alcohalquilo, ariloxialquilo, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfinilalquilo, arilsulfinilalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, cianohaloalquilo, alcohaloalquilo, ariloxihaloalquilo, alquiltiohaloalquilo, ariltiohaloalquilo, alquilsulfinilhaloalquilo, arilsulfinilhaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo y arilsulfonilhaloalquilo. Ejemplos particulares de R incluyen H,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{F}$ ,  $-\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{S(O)CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{F}$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S(O)CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Br}$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{F}$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{CN}$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{S(O)CH}_3$ , o  $-\text{CY}(\text{Z})\text{SO}_2\text{CH}_3$ , en el que Y es F o  $\text{CH}_3$  y Z es para  $\text{CH}_3$ .

35 De acuerdo con una realización de la invención, el grupo funcional del compuesto de la fórmula (I) se selecciona de entre el grupo que consiste en marcadores fluorescentes, grupos indicadores, grupos lipófilos, grupos hidrófilos, grupos de reticulación, grupos tensoactivos, ligandos de afinidad, carbohidratos, esteroides, aminoácidos, péptidos, proteínas y complejos de metal.

De acuerdo con una realización, el resto



en la fórmula (I) es un resto imina de una de las siguientes fórmulas:

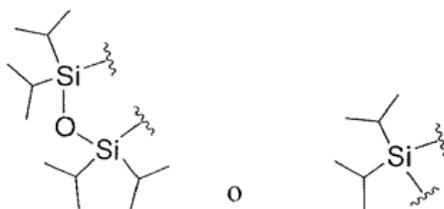


5

De acuerdo con una realización, se puede usar cualquier grupo protector de hidroxilo adecuado, por ejemplo, el grupo protector de hidroxilo es un grupo silil éter, por ejemplo, trimetilsililo, trietilsililo, *tert*-butildimetilsililo, *tert*-butildifenilsililo, dimetilfenilsililo y difenilmethylsililo; carbonatos de bencilo, grupo tritilo, monometoxitritilo y dimetoxitritilo; ésteres, por ejemplo, acetato, benzoato, y similares; pixilo; *tert*-butiloxycarbonilo, 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), un grupo tetrahidropiranilo y grupos protectores fotolábiles, en concreto, pixilo, acetilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), *t*-butildimetilsililo (TBDMS), tritilo, monometoxitritilo ("MMT" o "MMTr"), dimetoxitritilo ("DMT" o "DMTr").

10

En una realización, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> juntos forman un anillo o grupo protector de hidroxilo, por ejemplo, en el que el anillo o grupo protector de hidroxilo es de la fórmula que protege dos grupos hidroxilo de forma simultánea:



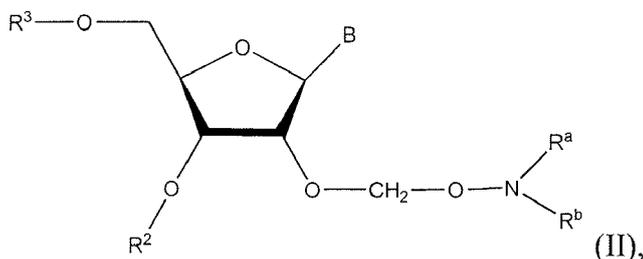
15

De acuerdo con una realización, R<sup>3</sup> es un soporte sólido. Se puede usar cualquier soporte sólido adecuado de acuerdo con la presente invención. En la técnica se conocen comúnmente soportes sólidos e incluyen, por ejemplo,

soportes sólidos orgánicos (por ejemplo, poliestireno reticulado), soportes sólidos inorgánicos (por ejemplo, soportes de sílice), y similares. Preferiblemente, el soporte sólido es un soporte inorgánico, que es más preferiblemente un soporte de sílice. Se apreciará que el soporte sólido puede incluir enlazadores, espaciadores, ramas y otros restos (restos orgánicos e inorgánicos) que se conocen en la técnica para manipular la unión a un soporte sólido. También se apreciará que el soporte sólido se puede unir la molécula directamente, sin el uso de enlazadores, espaciadores, ramas, u otros restos de conexión; véase, por ejemplo Beaucage *et al.*, Tetrahedron, 49, 6123 - 6194 (1993). En una realización particular, el soporte sólido es un soporte de vidrio de poro controlado.

En una realización, R<sup>3</sup> es dimetoxitritilo. En otra realización, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son H. En una realización más, R<sup>2</sup> y/o R<sup>3</sup> es un resto nucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido unido a través de un enlace fosfortriéster, fosfodiéster, fosforotioato triéster, fosforotioato diéster o fosforamidato.

De acuerdo con una realización, la invención también proporciona un método para preparar un compuesto de la fórmula II:



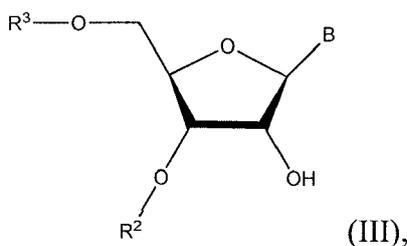
en el que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo, heteroarilo y amido, o R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> o bien independientemente o bien junto con el N forman una imida o una imina; y

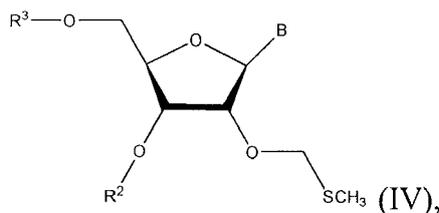
R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo, heteroarilo, un grupo protector de hidroxilo, un resto ácido nucleico, un resto nucleótido y un soporte sólido;

comprendiendo el procedimiento:

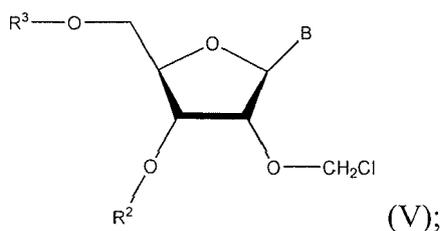
(i) convertir el grupo 2'-OH en un grupo 2'-metiltiometoxi del compuesto de la fórmula (III)



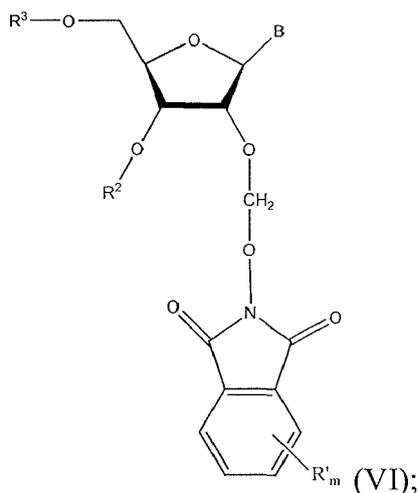
para obtener un compuesto de la fórmula (IV):



(ii) convertir el grupo 2'-metiltiometoxi en un grupo 2'-clorometoxi para obtener un compuesto de la fórmula (V):

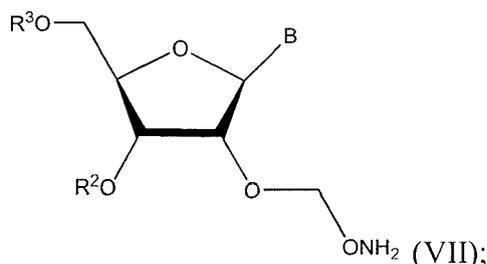


(iii) convertir el grupo 2'-clorometoxi del compuesto de la fórmula (V) para obtener un compuesto de la fórmula (VI);



5 en el que R' es H o un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en halo, hidroxilo, ciano, formilo, acilo, alquil carbonilo, carboxilo, fosforilo, fosfonilo, fosfono alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, sulfonilo, ciano, nitro, alcoxi, alquiltio, acilo, aciloxi, tioacilo, aciltio, ariloxi, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, guanidina, aldehído, ureido, aminocarbonilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y m es 1 a 4;

10 (iv) hacer reaccionar el compuesto de la fórmula (VI) con fluoruro de amonio para obtener un compuesto de la fórmula VII, *in situ*,



15 y  
(v) hacer reaccionar el compuesto de la fórmula VII con un compuesto que tiene grupo aldehído o cetona para obtener un compuesto de la fórmula (II).

20 En una realización, el procedimiento anterior puede incluir adicionalmente proteger el grupo 5'-OH del compuesto de la fórmula II en el que R<sup>3</sup> = H, para obtener un compuesto 5'-OH protegido. De acuerdo con una realización, el procedimiento anterior puede incluir adicionalmente el acoplamiento del compuesto 5'-OH protegido a un soporte sólido a través del grupo 3'-OH seguido de la retirada del grupo protector en la posición 5 para obtener un compuesto de la fórmula I que está unido a un soporte sólido. En una realización, el procedimiento anterior incluye adicionalmente la conversión del grupo 3'-OH en un éster de fosoramidita.

25 La figura 1 ilustra un método para preparar compuestos de realización de la fórmula (I). Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos **6a - d** se pueden preparar partiendo de los compuestos **1a - d**. La reacción de los compuestos **1a - d** con DMSO, anhídrido acético y ácido acético durante un periodo de 16 h a ~ 50 °C dio, después de la purificación por cromatografía sobre gel de sílice, los 2'-tioacetales de ribonucleósido **2a - d** en unos rendimientos aislados de un 85 a un 94 %. Los rendimientos de los compuestos **2a - d** son en cierta medida dependientes de la relación de los reactivos que se usan en la tioacetilización de los compuestos **1a - d**; las relaciones de DMSO, anhídrido acético y ácido acético, tal como es notificado por Semenyuk *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 12356 - 12357, se

implementaron en la preparación de los compuestos **2a - d**, que se caracterizaron mediante espectroscopías de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  y mediante espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). La conversión de las funciones metiltiometil éter de los compuestos **2a - d** en derivados de clorometil éter (**3a - d**) se efectuó por tratamiento con cloruro de sulfurilo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; **3a - d** se aislaron como materiales amorfos. La adición de una solución previamente mezclada de *N*-hidroxifalimida y una cantidad limitante de DBU (0,9 equiv. molares) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los compuestos **3a - d** produjo los 2'-*O*-ftalimidooximetil ribonucleósidos **4a - d** en unos rendimientos de un 66 % a un 94 % en relación con las cantidades molares de los compuestos **2a - d** que se usaron como materiales de partida. Los ribonucleósidos purificados con gel de sílice **4a - d** se caracterizaron mediante espectroscopías de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  y HRMS.

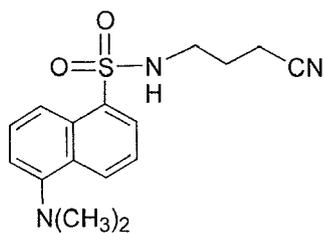
La desililación de los compuestos **4a - d** se realizó usando una suspensión de  $\text{NH}_4\text{F}$  en metanol (Semenyuk *et al.*, mencionado anteriormente) durante un periodo de 16 h a  $\sim 25^\circ\text{C}$ . De forma inesperada, el grupo ftalimido también se escindió en estas condiciones, dando los 2'-*O*-aminooximetil ribonucleósidos **5a - d** después de la *N*-desacilación de las nucleobases mediante la exposición a  $\text{NH}_3$  acuoso conc. Después de la retirada del  $\text{NH}_3$  en exceso, los compuestos **5a - d** se hicieron reaccionar con 1-pirenocarboxaldehído a  $55^\circ\text{C}$  en MeOH para dar los conjugados de ribonucleósido pirenilado **6a - d** en unos rendimientos de un 69 % a un 82 % en relación con las cantidades molares de los compuestos **4a - d** que se usaron como materiales de partida. Las identidades de los compuestos **6a - d** se confirmaron mediante HRMS. Como una medida de precaución general, es preferible realizar la *N*-desacilación de las nucleobases antes de cualquier reacción de oximación con el fin de evitar la escisión parcial de éteres de oxima, especialmente aquellos con unos protones oxímicos relativamente ácidos, en condiciones básicas.

Merece la pena hacer notar que, cuando la desililación del compuesto **4a** se efectuó por tratamiento con TBAF 0,5 M en THF, el único producto nucleosídico que se detectó mediante análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) de la reacción de desprotección fue uridina. De forma análoga, cuando el compuesto **4a** se trató sucesivamente con hidrazina hidrato, para liberar la función aminooximetilo, y con  $\text{NH}_4\text{F}$  en metanol para desililar los grupos 5'-y 3'-hidroxi, el análisis por RP-HPLC de la reacción reveló solo uridina como el producto nucleosídico. Las identidades de los compuestos **5a - d** fueron corroboradas por HRMS y mediante análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de muestras purificadas con gel de sílice que se aislaron a partir de la desprotección  $\text{NH}_4\text{F}/\text{MeOH}$  de los compuestos **4a - d**.

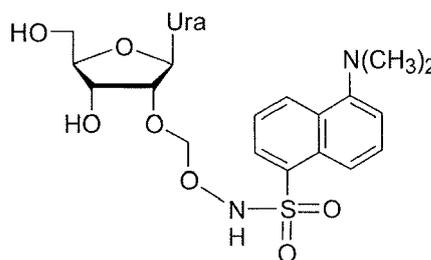
Con el fin de mostrar adicionalmente la versatilidad de los compuestos **4a - d** en la preparación de conjugados de 2' de ribonucleósido (la figura 2), el ribonucleósido **4a** se convirtió en 2'-*O*-aminooximetil uridina (**5a**), tal como se ha descrito en lo que antecede, por tratamiento con  $\text{NH}_4\text{F}/\text{MeOH}$ , y se hizo reaccionar con colestén-3-ona (**7**) y aldehídos derivados de *N*-(2,2-dimetoxietil)biotinamida (**9**), *N*-(2,2-dimetoxietil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (**11**) y *N*-(4,4-dietoxibutil)-5-(dimetilamino) naftaleno-1-sulfonamida (**13**) para producir los conjugados de 2' de uridina **8**, **10**, **12** y **14**, respectivamente. La reacción de 2'-*O*-aminooximetil citidina (**5b**) con el aldehído derivado de *N*-(2,2-dimetoxietil)-4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida (**15**) dio el conjugado de 2' de citidina **16**. Los acetales **9**, **11**, **13** y **15** se prepararon de forma conveniente a partir de la reacción de aminoacetaldehído dimetil acetal o 4-aminobutiraldehído dietil acetal con éster D-(+)-biotin 2-nitrofenílico, cloruro de dansilo y cloruro de dabsilo en presencia de trietilamina. Estos acetales se aislaron en unos rendimientos de un 91 - 95 % y se caracterizaron mediante espectroscopías de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  y mediante HRMS. El equilibrio entre los acetales **9**, **11**, y **13** y sus aldehídos correspondientes con la exposición a HCl concentrado en MeOH condujo, después de la evaporación a presión reducida y preferiblemente después de la neutralización del ácido residual con  $\text{NaHCO}_3$  ac., a una conjugación eficiente con 2'-*O*-aminooximetil ribonucleósidos. El acetal **15** no se convirtió de forma significativa en el aldehído cuando se hizo reaccionar con HCl concentrado; la protonación de la función azo puede haber disminuido de forma significativa su solubilidad en MeOH. Esta deficiencia se evitó cuando el acetal **15** se trató con una solución de yodo al 10 % en acetona y se procesó adicionalmente tal como se describe en la bibliografía. Sun, J.; Dong, Y.; Cao, L.; Wang, X.; Wang, S.; Hu, Y. *J. Am. Chem.* 2004, 69, 8932 - 8934. La *N*-(2-oxoetil)-4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida en bruto se aisló y sin purificación adicional, se hizo reaccionar con el 2'-*O*-aminooximetil ribonucleósido **5b**. El conjugado de 2' de citidina **16** se obtuvo en un rendimiento de un 61 % y se caracterizó mediante HRMS y mediante espectroscopías de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ .

Los conjugados de 2' de uridina y de citidina **6a - d**, **10**, **12**, **14** y **16** son conjugados estables, que se pueden convertir de forma conveniente y eficiente en sus ribonucleósidos nativos tras el tratamiento con TBAF 0,5 M en THF. Un mecanismo propuesto para estas transformaciones se muestra en la figura 3 y está soportado por unos perfiles de RP-HPLC representativos que ilustran la conversión de los compuestos **6a**, **10** y **14** en uridina. Los cromatogramas de RP-HPLC en la figura 4 muestran la formación de pireno-1-carbonitrilo (**17**) y *N*-(4-cianobut-1-il)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (**18**) como productos secundarios a partir de la escisión asistida por fluoruro de la función 2'-iminooximetil éter a partir de los compuestos **6a** y **14**, respectivamente.

Las identidades de pireno-1-carbonitrilo y *N*-(4-cianobut-1-il)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida se confirmaron mediante análisis de RP-HPLC de muestras auténticas, que revelaron unos tiempos de retención idénticos ( $t_R = 61,5$  y  $48,2$  min, respectivamente, véanse las figuras 4 y 7). Por consiguiente, la presente invención proporciona en una realización un procedimiento para escindir 2'-arilo o -alquiliminooxí éteres de ribonucleósido a través de una reacción mediada por fluoruro.



18



19

En contraste con la oximación de aldehídos con el compuesto **5a**, su reacción con colesteno-3-ona (**7**) y cloruro de dansilo dio, según lo esperado, los conjugados de 2' de uridina permanentes **8** y **19**, respectivamente. Se halló que ambos de estos conjugados eran estables frente a TBAF/THF en las condiciones que se usan para la conversión de los compuestos **6a - d**, **10**, **12**, **14**, y **16** en uridina o citidina. De hecho, el tratamiento del compuesto **19** con TBAF 0,5 M en THF durante 72 h a 55 °C produjo uridina hasta el grado de menos de un 1 %, tal como se determina mediante el análisis por RP-HPLC de los productos de reacción.

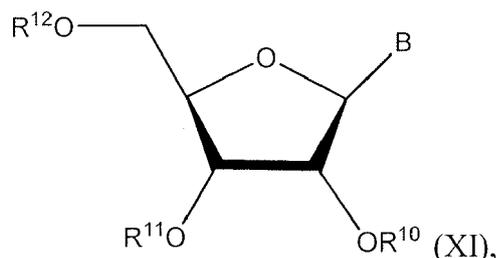
Los conjugados **6a - d**, **10**, **12**, **14** y **16** existen como una mezcla de isómeros geométricos *E* y *Z*; parece que uno de estos isómeros experimenta una escisión asistida por fluoruro de la función 2'-iminooximetil éter a una velocidad más rápida que el otro isómero geométrico tal como se evalúa mediante el análisis por RP-HPLC de las reacciones de escisión. La proximidad de una función de donación de electrones a la función 2'-iminooximetil éter afecta claramente a las velocidades de la reacción de escisión asistida por fluoruro. A pesar de que la conversión mediada por fluoruro de los compuestos **6a - d** en uridina se completó dentro de un plazo de 4 h a 55 °C, fueron precisas 6 h para que el compuesto **10** se convirtiera en uridina en unas condiciones idénticas.

Sin desear quedar limitado por teoría o mecanismo alguno, se cree que, en presencia del ión fluoruro, que es una base fuerte en un disolvente aprótico, la función amida del compuesto **10** ( $pK_a \sim 25$ ) se puede ionizar hasta cierto grado y disminuye la acidez del protón oxímico, en relación con la de los compuestos **6a - d**, como una consecuencia de las propiedades de donación de electrones de la función amida ionizada; entonces, la acidez reducida del protón oxímico daría como resultado una reacción de eliminación  $\beta$  más lenta. Esta creencia se ve soportada adicionalmente por la conversión asistida por fluoruro, considerablemente más lenta, del compuesto **12** en uridina, que solo estaba completa al 15 % después de 24 h a 55 °C. Presumiblemente, la función sulfonamida relativamente ácida del compuesto **12** ( $pK_a \sim 10$ ) es ionizada hasta un grado mayor que el de una función amida por el fuertemente básico ión fluoruro y disminuye adicionalmente la acidez del protón oxímico, conduciendo de ese modo a unas velocidades de eliminación  $\beta$  más lentas en relación con las de los compuestos **6a - d** y **10** en unas condiciones idénticas. También es consistente con esta creencia que, cuando la función sulfonamida es cada vez más distal con respecto al protón oxímico, las propiedades de donación de electrones de la sulfonamida ionizada tienen un efecto menor sobre la acidez del protón oxímico y dan como resultado unas velocidades de eliminación  $\beta$  relativamente más rápidas. Por lo general, la conversión asistida por fluoruro del compuesto **14** en uridina se completó dentro de un plazo de 48 h a 55 °C; esta velocidad de eliminación  $\beta$  es más rápida que la del compuesto **12** pero aún significativamente más lenta que las de los compuestos **6a - d** y **10**. Dada la similitud de los compuestos **16** y **12** en términos de la proximidad de la función sulfonamida al protón oxímico, la conversión del compuesto **16** en citidina por tratamiento con TBAF 0,5 M en THF solo estaba completa al 25 % después de 24 h a 55 °C.

La presente invención también proporciona un método para preparar un oligorribonucleótido de longitud de cadena  $n$ , en el que  $n$  es el número de residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento la adición por etapas de residuos de nucleótido al extremo 5' terminal de una cadena de crecimiento en la que los residuos de nucleótido están protegidos en la posición 2' con un grupo protector derivado de aminooximetilo.

En una realización más, la invención proporciona un método para preparar un oligorribonucleótido de longitud de cadena  $n$ , en el que  $n$  es el número de residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento:

(i) proporcionar un sustrato que comprende un nucleósido protegido en una de la función 2'-, 3'- o 5'- hidroxil con un grupo protector derivado de aminooximetilo y un soporte sólido unido de forma covalente a una de las funciones hidroxil restantes, teniendo dicho sustrato la fórmula (XI):

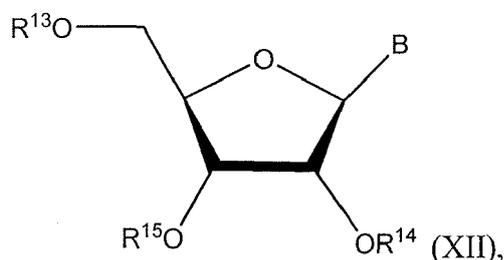


en el que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

en el que al menos uno de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> es un grupo protector derivado de aminooximetilo y el otro de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> es un soporte sólido, opcionalmente unido al átomo de oxígeno a través de un grupo carbonilo (>C=O); y R<sup>12</sup> es H;

5

(ii) proporcionar una fosforamidita de nucleósido 5'-OH-protégido de la fórmula (XII):



en el que:

R<sup>13</sup> es un grupo protector de hidroxilo;

R<sup>14</sup> es un grupo protector derivado de aminooximetilo de la fórmula -CH<sub>2</sub>-O-N=CHR<sup>16</sup> y R<sup>15</sup> es un grupo fosforamidita, si R<sup>10</sup> del sustrato de la fórmula (XI) es un grupo protector derivado de aminooximetilo y R<sup>11</sup> es un soporte sólido, opcionalmente unido a través de un grupo carbonilo (>C=O); o

R<sup>15</sup> es un grupo protector derivado de aminooximetilo de la fórmula -CH<sub>2</sub>-O-N=CHR<sup>16</sup> y R<sup>14</sup> es un grupo fosforamidita, si R<sup>11</sup> del sustrato de la fórmula (XI) es un grupo protector derivado de aminooximetilo y R<sup>10</sup> es un soporte sólido, opcionalmente unido a través de un grupo carbonilo (>C=O);

en el que R<sup>16</sup> se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, haloalquilo, cianoalquilo, alcoxialquilo, ariloxialquilo, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfinilalquilo, arilsulfinilalquilo, alquilsulfonylalquilo, arilsulfonylalquilo, cianohaloalquilo, alcoxihaloalquilo, ariloxihaloalquilo, alquiltiohaloalquilo, ariltiohaloalquilo, alquilsulfinilhaloalquilo, arilsulfinilhaloalquilo, alquilsulfonylhaloalquilo y arilsulfonylhaloalquilo;

en el que el grupo fosforamidita R<sup>14</sup> o R<sup>15</sup> es de la fórmula: -P(R<sup>17</sup>)(OR<sup>18</sup>), en el que R<sup>17</sup> es un grupo N,N-dialquilamino o un grupo heterocíclico saturado que tiene al menos un átomo de nitrógeno, opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O y S; y OR<sup>18</sup> es un grupo protector de fósforo;

(iii) acoplar el derivado de la fórmula (XII) con el sustrato de la fórmula (XI) para obtener un producto que comprende el sustrato acoplado al derivado de la fórmula (XII);

(iv) terminar en 5' el sustrato sin reaccionar de la fórmula (XI) de la etapa (iii);

(v) oxidar la función fosfito triéster presente en el producto de la etapa (iii) para obtener un producto que tiene una función fosfato triéster protegida;

(vi) desproteger el grupo 5'-hidroxi del producto de la etapa (v);

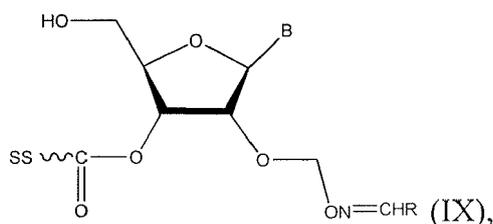
(vii) repetir las etapas (iii) - (vi) n - 1 veces para construir una cadena de oligonucleótido protegida que contiene "n" residuos de nucleótido sobre el soporte sólido;

(viii) retirar la nucleobase y grupos protectores de fosfato y escindir el oligonucleótido del soporte sólido; y

(ix) opcionalmente desproteger el grupo 2'-OH o el grupo 3'-OH.

De acuerdo con una realización particular, la invención proporciona un método para preparar un oligorribonucleótido de longitud de cadena n, en el que n es el número de residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento:

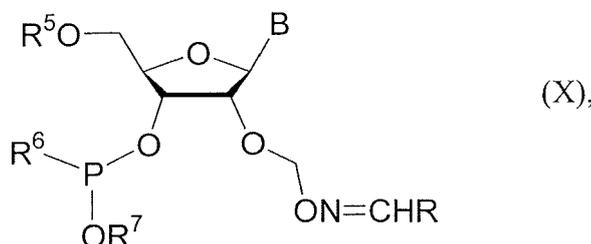
(i) proporcionar un sustrato que comprende un nucleósido, la función 2'-hidroxi o que está protegido con un grupo derivado de aminooximetilo, y un soporte sólido unido de forma covalente a la función 3'-hidroxi del nucleósido, teniendo el sustrato la fórmula (IX):



en el que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

R se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, haloalquilo, cianoalquilo, alcoxialquilo, ariloxialquilo, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, cianohaloalquilo, alcoxihaloalquilo, ariloxihaloalquilo, alquiltiohaloalquilo, ariltiohaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo, arilsulfonilhaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo y arilsulfonilhaloalquilo; y SS es un soporte sólido;

(ii) proporcionar un derivado de fosforamidita 5'-OH-protégido de un nucleósido de la fórmula (X):



en el que R<sup>5</sup> es un grupo protector de hidroxilo; R<sup>6</sup> es un grupo N,N-dialquilamino o un grupo heterocíclico saturado que tiene al menos un átomo de nitrógeno, opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O y S, por ejemplo, grupo pirrolidino, piperidino, morfolino o tiomorfolino; OR<sup>7</sup> es un grupo protector de fósforo;

(iii) acoplar el derivado de la fórmula (X) con el sustrato de la fórmula (IX) para obtener un producto que comprende el sustrato acoplado al derivado de la fórmula (X);

(iv) terminar en 5' el sustrato sin reaccionar de la fórmula (IX) de la etapa (iii);

(v) oxidar la función fosfito triéster presente en el producto de la etapa (iii) para obtener un producto que tiene una función fosfato triéster protegida;

(vi) desproteger el grupo 5'-hidroxi del producto de la etapa (v);

(vii) repetir las etapas (iii) - (vi) n - 1 veces para construir un oligonucleótido protegido de longitud de cadena n sobre el soporte sólido;

(viii) retirar la nucleobase y grupos protectores de fosfato y escindir el oligonucleótido del soporte sólido; y

(ix) opcionalmente desproteger el grupo 2'-OH.

En las realizaciones anteriores de la invención, n puede ser de 2 a 200, preferiblemente de 5 a 100, y más preferiblemente de 10 a 30. Realizaciones particulares incluyen n = 10, 20, 30, 40, 50, 60, y superiores.

De acuerdo con una realización de la invención, el grupo protector de fósforo tricoordinado R<sup>6</sup> se selecciona de entre el grupo que consiste en un grupo N,N-dialquilamino o un grupo heterocíclico saturado que tiene al menos un átomo de nitrógeno, opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O y S, y OR<sup>7</sup> se selecciona de entre el grupo que consiste en alcoxi, alqueniloxi, por ejemplo, aliloxi, cianoalcoxi, trialquilsililalcoxi, metilsulfonilalcoxi y arilsulfonilalcoxi, por ejemplo, tal como se describe en la bibliografía (Beaucage, *et al.*, Tetrahedron, 48, 2223 - 2311 (1992)). Definiciones similares son de aplicación a R<sup>17</sup> y OR<sup>18</sup>.

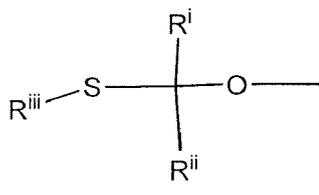
Los agentes oxidantes que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier reactivo adecuado que pueda oxidar un átomo de fósforo tricoordinado, en concreto un fosfito, para proporcionar un átomo de fósforo que tiene una valencia de más de tres, preferiblemente un átomo de fósforo tetracoordinado tal como, por ejemplo, un fosfato, o un equivalente del mismo. Los agentes oxidantes adecuados incluyen, por ejemplo, I<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, peróxidos, tales como hidroperóxido de *tert*-butilo, y similares.

Los agentes sulfurizantes que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier reactivo adecuado que pueda sulfurizar un átomo de fósforo tricoordinado, en concreto un fosfito, para proporcionar un átomo de fósforo con una valencia de más de tres, preferiblemente un átomo de fósforo tetracoordinado tal como, por ejemplo, a fosforotioato, o un equivalente del mismo. Los agentes sulfurizantes adecuados incluyen, por ejemplo, 3H-1,2-benzoditioil-3-ona-1,1-dióxido ("Reactivo de Beaucage"), disulfuro de fenilacetilo, disulfuro de bis(O,O-diisopropoxifosfinotioilo), N-formamidino-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona, y similares.

Los agentes selenizantes que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier reactivo adecuado que pueda selenizar un átomo de fósforo tricoordinado, en concreto un fosfito, para proporcionar un átomo

de fósforo que tiene una valencia de más de tres, preferiblemente un átomo de fósforo tetracoordinado tal como un fosforoselenoato, o un equivalente del mismo. Los agentes selenizantes adecuados incluyen, por ejemplo, selenocianato de potasio (KSeCN), selenio elemental y similares.

Los grupos R<sup>6</sup> y OR<sup>7</sup> que se pueden usar de acuerdo con la presente invención pueden ser cualquier grupo adecuado que pueda proteger el fósforo trivalente que está unido a la función o bien 2'- o bien 3'-hidroxi del nucleósido de fosforamidita entrante. Los ejemplos de grupos protectores de fósforo R<sup>6</sup> incluyen grupos N,N-dialquilamino, tal como diisopropilamino, o un grupo heterocíclico saturado que tiene al menos un átomo de nitrógeno, opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O y S, tal como pirrolidino, piperidino, morfolino, y tiomorfolino; y ejemplos de OR<sup>7</sup> incluyen grupos alcoxi, tal como grupos metoxi, cianoalcoxi, alqueniloxi, trialquilsililalcoxi, metilsulfonilalcoxi, y arilsulfonilalcoxi, y cualquier combinación de los mismos. Para ejemplos adicionales de grupos protectores, véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 7.368.550, que divulga grupos protectores de la fórmula:



en los que R<sup>iii</sup> es alquilo inferior, alquilo inferior modificado, o alquilo; cada uno de R<sup>i</sup> y R<sup>ii</sup> se selecciona independientemente de entre H, alquilo inferior, alquilo inferior modificado, alquilo, alquilo modificado o arilo.

La figura 10 ilustra algunas de las etapas de reacciones que se pueden emplear en la preparación de oligonucleótidos de acuerdo con una realización de la invención. Los compuestos **2a - d**, **3a - d**, **4a - d**, y **5a - d** se pueden preparar tal como se ha descrito en lo que antecede a partir de los compuestos **1a - d** disponibles en el mercado. La reacción del compuesto **5a** con aldehídos en MeOH dio los derivados de 2'-O-metanimina-N-oximetil ribonucleósido **20a** correspondientes (R= H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>Br, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)F, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -CH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)S(O)CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br, -CY(Z)F, -CY(Z)CN, -CY(Z)OCH<sub>3</sub>, -CY(Z)SCH<sub>3</sub>, -CY(Z)S(O)CH<sub>3</sub>, o -CY(Z)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, en el que Y es F o CH<sub>3</sub> y Z es F o CH<sub>3</sub>, en unos rendimientos de un 69 % a un 82 % en relación con las cantidades molares del compuesto **4a** que se usaron como materiales de partida. Las identidades de los ribonucleósidos **20a** se confirmaron mediante HRMS. El tratamiento del compuesto **20a** (R = H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)F, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -CH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)S(O)CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CY(Z)F, -CY(Z)CN, -CY(Z)OCH<sub>3</sub>, -CY(Z)SCH<sub>3</sub>, -CY(Z)S(O)CH<sub>3</sub> o -CY(Z)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, en el que Y es F o CH<sub>3</sub> y Z es F o CH<sub>3</sub>) con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo en piridina anhidra dio el compuesto **21a** (R = H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)F, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -CH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)S(O)CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CY(Z)F, -CY(Z)CN, -CY(Z)OCH<sub>3</sub>, -CY(Z)SCH<sub>3</sub>, -CY(Z)S(O)CH<sub>3</sub> o -CY(Z)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, en el que Y es F o CH<sub>3</sub> y Z es F o CH<sub>3</sub>), que se purificaron por cromatografía sobre gel de sílice y se obtuvieron en unos rendimientos de un 85 - 95 %. La fosfitilación de los ribonucleósidos **21a** se realizó en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro tras la adición de Et<sub>3</sub>N y 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita dando las fosforamiditas de ribonucleósido **22a** (R = H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)F, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -CH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)S(O)CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CY(Z)F, -CY(Z)CN, -CY(Z)OCH<sub>3</sub>, -CY(Z)SCH<sub>3</sub>, -CY(Z)S(O)CH<sub>3</sub> o -CY(Z)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, en el que Y es F o CH<sub>3</sub> y Z es F o CH<sub>3</sub>) en unos rendimientos de un 70 % a un 90 % después de la cromatografía sobre gel de sílice. La figura 11 ilustra unas etapas adicionales que se pueden emplear en la preparación de oligonucleótidos de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 12 ilustra un procedimiento de síntesis de fase sólida del fosfodiéster de dinucleósido UpT a partir de la fosforamidita de ribonucleósido **22a** (R = H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)F, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -CH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)S(O)CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CY(Z)F, -CY(Z)CN, -CY(Z)OCH<sub>3</sub>, -CY(Z)SCH<sub>3</sub>, -CY(Z)S(O)CH<sub>3</sub> o -CY(Z)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> en el que Y es F o CH<sub>3</sub> y Z es F o CH<sub>3</sub>). La reacción de cada una de las fosforamiditas de ribonucleósido **22a** con timidina unida de forma covalente a alquilamina de cadena larga - vidrio de poro controlado (LCAA-CPG) a través de un enlazador de 3'-O-hemisuccinato (TsuccCPG) en presencia de 1H-tetrazol en MeCN seco produjo un producto intermedio de fosfito triéster de dinucleósido, que después del tratamiento con una solución disponible en el mercado de yodo acuoso proporcionó el fosfato triéster de dinucleósido **25** (R = H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)F, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -CH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SCH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)S(O)CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CY(Z)F, -CY(Z)CN, -CY(Z)OCH<sub>3</sub>, -CY(Z)SCH<sub>3</sub>, -CY(Z)S(O)CH<sub>3</sub> o -CY(Z)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, en el que Y es F o CH<sub>3</sub> y Z es F o CH<sub>3</sub>). Después del desbloqueo completo de los grupos protectores de 5'-hidroxi y de fosfato, el fosfato diéster de dinucleósido **26** se liberó del soporte sólido en unas condiciones amoniacales a temperatura ambiente (~ 25 °C). El tratamiento del compuesto **26** con fluoruro de tetra-n-butilamonio 0,5 M en DMSO seco a 25 °C dio como resultado la conversión completa del compuesto **26** en UpT. Las fosforamiditas de ribonucleósido **22a** (R = CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>) se seleccionaron para la síntesis de fase sólida de r(Up)<sub>20</sub>dT como un modelo exploratorio para

evaluar: (i) cinética de acoplamiento de fosforamidita y eficiencias de acoplamiento y; (ii) la cinética de desbloqueo asistida por fluoruro y la eficiencia de las funciones 2'-hidroxi.

En las realizaciones anteriores, el grupo R puede incluir un grupo aceptor de electrones junto a Z.

5 La síntesis de fase sólida del r(Up)<sub>20</sub>dT se llevó a una escala de 0,2 μmoles usando el compuesto **22a** como soluciones 0,2 M en MeCN anhidro. Se usó 5-etiltio-1*H*-tetrazol para la activación del compuesto **22a** en la preparación de r(Up)<sub>20</sub>dT. En estas condiciones, la eficiencia de acoplamiento del compuesto **22a** promedió un 99 % a lo largo de un tiempo de acoplamiento de 180 s. Los rendimientos de acoplamiento por etapas se determinaron mediante el ensayo espectrofotométrico de 4,4'-dimetoxitritilo a 498 nm. Después de la compleción de la síntesis, el 20-mero unido a fase sólida se trató con NH<sub>3</sub> acuoso conc. durante 30 min a ~ 25 °C para desbloquear los grupos protectores de fosfato de 2- cianoetilo y liberar el r(Up)<sub>20</sub>dT 2'-O-protégido del soporte sólido. El oligonucleótido a continuación se disolvió en fluoruro de tetra-*n*-butilamonio 0,5 M en DMSO; la solución se calentó a 55 °C durante 48 h. El oligonucleótido r(Up)<sub>20</sub>dT desalado se analizó por RP-HPLC y se caracterizó mediante espectrometría de masas de MALDI-TOF. El cromatograma de RP-HPLC de r(Up)<sub>20</sub>dT se muestra en la figura 13 y se compara con un cromatograma de RP-HPLC de r(Up)<sub>20</sub>dT que se preparó usando fosforamiditas de 2'-O-TBDMS ribonucleósido disponibles en el mercado en unas condiciones que se describen en la bibliografía (Ogilvie, K. K.; Usman, N.; Nicoghosian, K.; Cedergren, R. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988, 85, 5764 - 5768).).

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención si bien, por supuesto, no se deberían interpretar como limitantes en modo alguno de su alcance.

### Ejemplo 1

20 Este ejemplo ilustra un procedimiento de preparación de determinados productos intermedios o compuestos de acuerdo con una realización de la invención.

**Materiales y procedimientos.** Los productos químicos y disolventes comunes además de DMSO, ácido acético glacial, anhídrido acético, carbonato de potasio, yodo elemental, bisulfato de sodio, piridina, trietilamina, cloruro de sulfurilo, *N*-hidroxiftalimida, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), fluoruro de amonio, 1-pirenocarboxaldehído, 25 pireno-1-carbonitrilo, 5-colesten-3-ona, éster D-(+)-biotin 2-nitrofenílico, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo (cloruro de dansilo), cloruro de 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonilo (cloruro de dabsilo), aminoacetaldehído dimetil acetal, 4- aminobutiraldehído dietil acetal, 4-clorobutironitrilo y ftalimida de potasio se compraron, todos ellos, de fuentes comerciales y se usaron sin purificación adicional.

30 *N*<sup>4</sup>-acetil-5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)citidina, *N*<sup>6</sup>-isobutiril-5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano- 1,3-diil)adenosina, 5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)uridina, *N*<sup>2</sup>-fenoxiacetil-5'-O-(1,1,3,3- tetraisopropil disiloxano-1,3-diil)guanosina, disolventes anhidros (MeCN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, piridina, THF) y disolventes deuterados (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, D<sub>2</sub>O, DMSO-*d*<sub>6</sub>) se obtuvieron de fuentes reputadas y se usaron tal como se recibieron.

35 Las purificaciones por cromatografía ultrarrápida se realizaron en unas columnas de vidrio (6,0 y 2,5 cm de D. I.) rellenas con gel de sílice 60 (230 - 400 de malla), mientras que los análisis analíticos de cromatografía de capa fina (TLC) se realizaron sobre unas placas de vidrio de 2,5 cm X 7,5 cm revestidas una capa de 0,25 mm de espesor de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>.

40 Los análisis de RP-HPLC analíticos se realizaron usando una columna Supelcosil LC-18S de 5 μm (25 cm X 4,6 mm) de acuerdo con las siguientes condiciones: partiendo de trietilacetato de amonio 0,1 M de pH 7,0, un gradiente lineal de un 1 % de MeCN/min se bombea a un caudal de 1 ml/min durante 40 min o, tal como se indicó, partiendo de trietilacetato de amonio 0,1 M de pH 7,0, un gradiente lineal de un 1 % de MeCN/min se bombeó a un caudal de 1 ml/min durante 40 min; el gradiente a continuación se aumentó a un 6 % de MeCN/min durante 10 min al mismo caudal y se mantuvo isocrático durante 15 min más. En todos los cromatogramas de RP-HPLC, las alturas de pico se normalizan con respecto al pico más alto, que se ajusta a 1 unidad arbitraria. Se compró tampón de trietilacetato de amonio 2 M a Applied Biosystem y se diluyó hasta 0,1 M con agua de calidad HPLC antes del uso.

45 Todos los experimentos de RMN se realizaron usando un espectrómetro en el campo de 300,13, 75,47 y 121,5 MHz para <sup>1</sup>H unidimensional, <sup>13</sup>C desacoplado de <sup>1</sup>H y <sup>31</sup>P desacoplado de <sup>1</sup>H, respectivamente. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 298 K. Todos los espectros se registraron en disolventes deuterados o tal como se indicó y los desplazamientos químicos δ se notificaron en partes por millón (ppm) en relación con unas referencias internas apropiadas.

50 Los espectros de masas de alta resolución que se usaron para confirmar la composición elemental de nuevos compuestos se obtuvieron en un espectrómetro de masas Bruker Daltonics ApexQ FT-ICR equipado con un imán de 12 T. Se usó una ionización por electropulverización en modo de iones positivos para generar iones [M + H]<sup>+</sup> y [M + Na]<sup>+</sup> de entre unas muestras de prueba (0,01 mg disuelto en 1 ml de acetato de amonio 10 mM en MeCN:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v)). Los espectros se calibraron externamente usando una solución de 0,5 mg/ml de Csl en agua, lo que dio una serie de picos en el intervalo de masas que se usó para el análisis (200 - 2000 m/z).

55

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(metiltiometil)uridina (2a).** La preparación del compuesto **2a** se realizó con modificaciones de menor importancia de un procedimiento publicado (Cieslak, J., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 2774 - 2783). A una solución de 5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)uridina disponible en el mercado (compuesto **1a**, 7,3 g, 15 mmol) en DMSO (15 ml) se añadió AcOH glacial (23 ml) y Ac<sub>2</sub>O (15 ml). La solución se agitó a 50 ± 2 °C hasta la compleción de la reacción (~ 16 h), que se controló por TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5 v/v). La solución se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2 l al que se añadió, con una agitación vigorosa, una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (31 g) en agua (200 ml). El material precipitado se aisló o bien por filtración o bien por decantación y se disolvió de nuevo en un volumen mínimo de THF (15 - 20 ml). La solución resultante a continuación se vertió en agua (250 ml) para dar el producto en bruto en forma de un material gomoso. La mayor parte del agua se decantó; el producto en bruto se secó cuidadosamente mediante una evaporación conjunta consecutiva con piridina (30 ml), tolueno (3 X 30 ml) y diclorometano (30 ml). El ribonucleósido **2a** en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (~ 150 g en una columna de vidrio de 6,5 cm [D. I.]) usando un gradiente de MeOH (0 → 3 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el compuesto **2a** puro (TLC), se evaporaron para dar una espuma a baja presión, y se disolvieron en C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> seco (~ 20 ml); la solución se congeló y, a continuación, se liofilizó a alto vacío dando un polvo de color blanco (7 g, 12,8 mmol, 85 %). Los datos de caracterización que se obtienen a partir del análisis de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C del compuesto **2a** están de acuerdo con los que son notificados por Semenyuk *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 12356 - 12357.

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(ftalimidooximetil)uridina (4a).** A una solución del compuesto **2a** secado minuciosamente (1,1 g, 2,0 mmol) en diclorometano anhidro (20 ml) se añadió cloruro de sulfuro puro (2,20 mmol, 176 µl); la solución se agitó a ~ 25 °C durante 2 h y, a continuación, se concentró a presión reducida para dar el derivado de 2'-O-clorometiluridina **3a** en forma de un sólido amorfo. *N*-Hidroxitftalimida (1,3 g, 8,0 mmol) se puso en un vaso de reacción separado al que se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 ml) y DBU (1,04 ml, 7,00 mmol). Después de 10 min, la solución de color rojo se añadió al compuesto **3a** no purificado; la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a ~ 25 °C durante 24 h a lo que a continuación se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 ml). La solución se mezcló de forma vigorosa con ácido acético acuoso 1 M (20 ml); la capa acuosa se descartó y la fase orgánica se lavó dos veces con una solución saturada acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (20 ml). La capa orgánica se recogió, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó para dar un sólido espumoso a presión reducida. El producto en bruto **4a** se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (~ 35 g en una columna de vidrio de 2,5 cm [D. I.]) usando un gradiente de MeOH (0 → 3 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el compuesto **4a** y se evaporaron al vacío para dar un sólido (1,24 mg, 1,88 mmol) en un rendimiento de un 94 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**2a**) que se usó. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11,41 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 7,88 - 7,80 (m, 4H), 7,65 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,62 (dd, *J* = 8,2, 2,2 Hz, 1H), 5,39 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 5,34 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,87 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 4,63 (dd, *J* = 5,2, 5,2 Hz, 1H), 4,03 (dd, *J* = 13,0, 3,0 Hz, 1H), 3,90 (dd, *J* = 13,0, 3,0 Hz, 1H), 3,79 (dt, *J* = 9,0, 3,0 Hz, 1H), 1,07 - 0,95 (m, 28H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163,2, 163,0, 150,0, 142,6, 134,8, 128,4, 123,3, 101,3, 98,0, 90,6, 80,2, 77,9, 69,8, 60,2, 17,2, 17,1, 17,0, 16,81, 16,77, 16,7, 12,5, 12,3, 12,1, 12,0. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 662,2560, encontrado 662,2560.

**2'-O-(Aminooximetil)uridina (5a).** El compuesto **4a** purificado (330 mg, 500 µmol) se disolvió en metanol (3 ml), y se añadió fluoruro de amonio (185 mg, 5,00 mmol). La mezcla de reacción heterogénea se agitó a ~ 25 °C hasta que se obtuvo la desililación y la retirada completas del grupo ftalimido (~ 16 h) tal como se indicó mediante TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 v/v). El producto de reacción se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0 → 12 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto, se evaporaron a sequedad para proporcionar el compuesto **5a**. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11,4 (s a, 1H), 7,93 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,21 (s a, 2H), 5,87 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 5,64 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,17 (t, *J* = 4,9 Hz, 1H), 4,74 (s, 2H), 4,11 (m, 2H), 3,88 (m, 1H), 3,65 (ddd, *J* = 12,0, 5,0, 3,1 Hz, 1H), 3,56 (ddd, *J* = 12,0, 5,0, 3,1 Hz, 1H), 3,16 (d, *J* = 5,0 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163,1, 150,7, 140,4, 101,8, 98,0, 86,7, 84,9, 79,1, 69,0, 60,4. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M + H]<sup>+</sup> 290,0983, encontrado 290,0986.

**2'-O-(Piren-1-ilmetanimina-*N*-oximetil)uridina (6a).** 2'-O-(Aminooximetil)uridina (**5a**) se preparó a partir del compuesto **4a** a la escala y en unas condiciones idénticas a las que se han descrito en lo que antecede. Después de la desililación mediada por NH<sub>4</sub>F y la retirada completas del grupo ftalimido en MeOH, 1-pirenocarboxaldehído (2,00 mmol, 460 mg) se añadió a la mezcla de reacción, que a continuación se calentó a 55 ± 2 °C en un frasco dotado de tapa a rosca de 4 ml hasta la compleción de la reacción de oximación (1 h) tal como se indicó mediante TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 v/v). La mezcla de reacción se transfirió a un frasco de vidrio dotado de tapa a rosca de 20 ml al que se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 ml) y una solución saturada acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (2 ml); después de una agitación vigorosa la fase orgánica se recogió y se evaporó a sequedad al vacío. El ribonucleósido pirenilado **6a** se purificó por cromatografía sobre gel de sílice empleando un gradiente de MeOH (0 → 8 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto puro, se evaporaron a sequedad a presión reducida dando el compuesto **6a** como un polvo de color amarillo (206 mg, 410 µmol) en un rendimiento de un 82 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4a**) que se usó. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M + H]<sup>+</sup> 502,1609, encontrado 502,1609.

***N*<sup>4</sup>-Acetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(metiltiometil)citidina (2b).** La preparación del compuesto **2b** se realizó con modificaciones de menor importancia de un procedimiento publicado. Cieslak, J., *et al.*, mencionado anteriormente. A una solución de *N*<sup>4</sup>-acetil-5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)citidina disponible en el mercado (compuesto **1b**, 7,9 g, 15 mmol) en DMSO (15 ml) se añadió AcOH glacial (15 ml) y Ac<sub>2</sub>O

(10 ml). La solución se agitó a  $50 \pm 2$  °C hasta la compleción de la reacción (~ 16 h), que se controló por TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5 v/v). La solución se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2 l al que se añadió, con una agitación vigorosa, una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (31,2 g) en agua (240 ml). El material precipitado se sometió a tratamiento, se purificó y se procesó en unas condiciones idénticas a las que se emplean en la preparación, la purificación y el procesamiento del compuesto **2a**. El ribonucleósido **2b** se aisló en forma de un sólido de color blanco (8,30 g, 14,1 mmol) en un rendimiento de un 94 %. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11,08 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,77 (s, 1H), 5,14 (d, *J* = 11,2 Hz, 1H), 5,04 (d, *J* = 11,2 Hz, 1H), 4,44 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,22 (m, 3H), 3,93 (dd, *J* = 13,6, 1,9 Hz, 1H), 2,16 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 1,08 - 0,95 (m, 28H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170,9, 162,6, 154,1, 143,1, 95,0, 88,9, 81,3, 77,0, 73,0, 67,0, 59,2, 24,2, 17,1, 17,0, 16,9, 16,9, 16,8, 16,7, 16,5, 12,6, 12,4, 12,3, 12,2, 11,8. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>SSi<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 580,2590, encontrado 580,2597

**N<sup>4</sup>-Acetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(ftalimidooximetil) citidina (4b)**. La preparación y la purificación del compuesto **4b** se realizaron a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se han descrito en lo que antecede para la preparación y la purificación del compuesto **4a**. El ribonucleósido **4b** se obtuvo en forma de un sólido (1,04 g, 1,48 mmol) en un rendimiento de un 74 % sobre la base de la cantidad del material de partida (**2b**) que se usó. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10,98 (s, 1H), 8,10 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,87 - 7,80 (m, 4H), 7,22 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,76 (s, 1H), 5,52 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 5,45 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,70 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,41 (dd, *J* = 4,8, 4,8 Hz, 1H), 4,15 (dd, *J* = 12,9, 1,2 Hz, 1H), 4,00 - 3,88 (m, 2H), 2,10 (s, 3H), 1,04 - 0,89 (m, 28H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171,0, 162,9, 162,7, 154,0, 145,2, 134,7, 134,2, 128,5, 123,2, 122,9, 98,1, 95,0, 90,1, 80,8, 79,3, 68,3, 59,7, 24,3, 17,2, 17,12, 17,09, 17,0, 16,8, 16,7, 16,6, 12,5, 12,3, 12,2, 11,9. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 703,2825, encontrado 703,2825.

**2'-O-(Aminooximetil)citidina (5b)**. El compuesto **4b** purificado con gel de sílice (351 mg, 500 μmol) se disolvió en metanol (3 ml), y se añadió fluoruro de amonio (185 mg, 5,00 mmol). La mezcla de reacción heterogénea se agitó a ~ 25 °C hasta que se obtuvo la desililación y la retirada completas del grupo ftalimido (~ 16 h) tal como se indicó mediante TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 v/v). Se usó una corriente de aire para retirar MeOH de la mezcla de reacción y fue seguido de la adición de NH<sub>3</sub> acuoso concentrado (28 %) disponible en el mercado (3 ml); la solución resultante se mantuvo a 55 °C durante 1 h en un frasco de vidrio dotado de tapa a rosca de 4 ml herméticamente cerrado. El amoníaco en exceso se retiró en una corriente de aire; el material que quedó se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0 → 25 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto, se evaporaron a sequedad a baja presión para dar **5b**. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,92 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,26 (m, 2H), 5,83 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 5,74 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 5,15 (s, 1H), 4,77 (c, *J* = 7,2 Hz, 2H), 4,04 (m, 2H), 3,84 (m, 2H), 3,70 (dd, *J* = 12,2, 2,2 Hz, 1H), 3,70 (dd, *J* = 12,2, 2,7 Hz, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165,6, 155,3, 140,9, 97,7, 94,0, 88,2, 83,9, 79,3, 68,3, 59,9. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [M + H]<sup>+</sup> 289,1143, encontrado 289,1145.

**2'-O-(Piren-1-ilmetanimina-N-oximetil)citidina (6b)**. **2'-O-(Aminooximetil)citidina (5b)** se preparó a partir del compuesto **4b** a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se han descrito en lo que antecede. Después de la retirada del amoníaco en exceso, el material que quedó se suspendió en MeOH (3 ml) y 1-pirenocarboxaldehído (460 mg, 2,00 mmol) se añadió a la suspensión en un frasco de vidrio dotado de tapa a rosca de 4 ml. La mezcla de reacción se calentó a ~ 55 °C hasta la compleción de la reacción de oximación (1 h), se transfirió a un frasco de vidrio dotado de tapa a rosca de 20 ml y se diluyó mediante la adición de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 ml) y una solución saturada acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (2 ml). Después de una agitación vigorosa, la fase orgánica se recogió y se evaporó a sequedad a baja presión. El ribonucleósido pirenilado **6b** se purificó por cromatografía sobre gel de sílice empleando un gradiente de MeOH (0 → 8 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto puro, se evaporaron a sequedad a presión reducida dando el compuesto **6b** en forma de un polvo de color amarillo (188 mg, 375 μmol) en un rendimiento de un 75 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4b**) que se usó. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [M + H]<sup>+</sup> 501,1769, encontrado 501,1769

**N<sup>6</sup>-Isobutiril-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(metiltiometil) adenosina (2c)**. La preparación del compuesto **2c** se realizó con modificaciones de menor importancia de un procedimiento publicado. Cieslak, J., *et al.*, mencionado anteriormente. A una solución de N<sup>6</sup>-isobutiril-5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)adenosina disponible en el mercado (compuesto **1c**, 8,7 g, 15 mmol), en DMSO (23 ml) se añadió AcOH glacial (23 ml) y Ac<sub>2</sub>O (15 ml). La solución se agitó a  $50 \pm 2$  °C hasta la compleción de la reacción (~ 16 h), que se controló por TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5 v/v). La solución se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2 l al que se añadió, con una agitación vigorosa, una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (46,2 g) en agua (231 ml). El material precipitado se sometió a tratamiento y se purificó en unas condiciones idénticas a las que se emplean en la preparación, la purificación y el procesamiento del compuesto **2a**. El ribonucleósido **2c** se aisló en forma de un sólido de color blanco (8,5 g, 13,3 mmol) en un rendimiento de un 89 %. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10,69 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 6,11 (d, *J* = 1 Hz, 1H), 5,00 (dd, *J* = 5,3, 5,2 Hz, 1H), 4,97 (d, *J* = 11,4 Hz, 1H), 4,91 (d, *J* = 11,4 Hz, 1H), 4,89 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,08 (dd, *J* = 12,9, 2,5 Hz, 1H), 4,02 (dt, *J* = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 3,93 (dd, *J* = 12,9, 2,3 Hz, 1H), 2,96 (sept, *J* = 6,7 Hz, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,12 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H), 1,09 - 0,97 (m, 28H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 175,2, 151,4, 150,8, 149,9, 142,6, 124,1, 87,6, 80,8, 76,7, 73,7, 69,3, 59,9, 34,2, 19,1, 17,2, 17,1, 17,0, 16,9, 16,8, 16,7, 12,7, 12,6, 12,3, 12,1, 11,9. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>28</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SSi<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 640,3015, encontrado 640,3016.

**N<sup>6</sup>-Isobutiril-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(ftalimidooximetil) adenosina (4c).** La preparación y la purificación del compuesto **4c** se realizaron a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se han descrito en lo que antecede para la preparación y la purificación del compuesto **4a**. El ribonucleósido **4c** se obtuvo en forma de un sólido (1,24 g, 1,64 mmol) en un rendimiento de un 82 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**2c**) que se usó. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10,72 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,84 - 7,74 (m, 4H), 6,06 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 5,45 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,37 - 5,30 (m, 3H), 4,04 - 3,89 (m, 3H), 2,97 (sept, *J* = 6,8 Hz, 1H), 1,15 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,14 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,04 - 0,96 (m, 28H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 175,2, 163,0, 151,2, 150,9, 149,9, 144,3, 134,8, 134,2, 128,3, 124,3, 123,2, 122,9, 98,4, 87,7, 80,2, 77,8, 70,3, 59,9, 34,3, 19,2, 19,1, 17,1, 17,0, 16,9, 16,8, 16,7, 12,6, 12,3, 12,1. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>35</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 755,3251, encontrado 755,3250.

**2'-O-(Aminooximetil)adenosina (5c).** La preparación del compuesto **5c** a partir del compuesto **4c** se realizó a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se usan para la preparación del compuesto **5b**. Después de la retirada del de amoniaco en exceso en una corriente de aire, 2'-O-(aminooximetil)adenosina se purificó por cromatografía sobre gel de sílice empleando un gradiente de MeOH (0 → 10 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto y se evaporaron a sequedad a baja presión dando el compuesto **5c**. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,38 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,37 (s a, 2H), 6,21 (s a, 2H), 6,06 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 5,43 (m, 2H), 4,68 (c, *J* = 7,3 Hz, 2H), 4,67 (m, 1H), 4,33 (s a, 1H), 3,99 (c, *J* = 3,4 Hz, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,57 (m, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 156,1, 152,4, 148,9, 139,7, 119,2, 98,2, 86,3, 86,1, 79,3, 69,8, 61,4. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 313,1255, encontrado 313,1256.

**2'-O-(Piren-1-ilmetanimina-N-oximetil)adenosina (6c).** La preparación del compuesto **5c** a partir del compuesto **4c** se realizó a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se han descrito en lo que antecede. Después de la retirada del amoniaco en exceso, el material que quedó se hizo reaccionar con 1-pirencarboxaldehído a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se emplean para la preparación del compuesto **6b**. El ribonucleósido pirenilado **6c** se purificó por cromatografía sobre gel de sílice en unas condiciones idénticas a las que se describen para la purificación del compuesto **6b** y se obtuvo en un rendimiento de un 77 % (200 mg, 385 μmol) sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4c**) que se usó. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 525,1881, encontrado 525,1882.

**N<sup>2</sup>-Fenoxiacetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(metiltiometil) guanosina (2d).** La preparación del compuesto **2d** se realizó con modificaciones de menor importancia de un procedimiento publicado. Cieslak, J., *et al.*, mencionado anteriormente. A una solución de N<sup>2</sup>-fenoxiacetil-5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)guanosina disponible en el mercado (compuesto **1d**, 9,9 g, 15 mmol) en DMSO (22,5 ml) se añadió AcOH glacial (22,5 ml) y Ac<sub>2</sub>O (15,0 ml). La solución se agitó a 50 ± 2 °C hasta la compleción de la reacción ~ 16 h), que se controló por TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5 v/v). La solución se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2 l al que se añadió, con una agitación vigorosa, una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (51,0 g) en agua (270 ml). El material precipitado se sometió a tratamiento y se purificó en unas condiciones idénticas a las que se emplean en la preparación, la purificación y el procesamiento del compuesto **2a**. El ribonucleósido **2d** se aisló en forma de un sólido de color blanco (9,3 g, 13 mmol) en un rendimiento de un 87 %. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11,84 (s a, 1H), 11,83 (s a, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,32 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,30 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,98 (m, 3H), 5,91 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 4,84 (s, 2H), 4,52 (m, 2H), 4,16 (dd, *J* = 12,9, 2,5 Hz, 1H), 4,06 (dt, *J* = 8,2, 2,5 Hz, 1H), 3,95 (dd, *J* = 12,9, 2,5 Hz, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,06 - 0,95 (m, 28H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170,7, 157,5, 154,8, 147,6, 147,3, 136,1, 129,4, 121,3, 120,5, 114,5, 86,5, 81,3, 77,8, 73,8, 68,8, 66,2, 60,0, 17,2, 17,16, 17,13, 17,1, 17,05, 17,03, 16,8, 16,74, 16,70, 12,8, 12,7, 12,6, 12,3, 12,2, 11,9. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>32</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 720,2913, encontrado 720,2918.

**N<sup>2</sup>-Fenoxiacetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(ftalimidooximetil)guanosina (4d).** La preparación y la purificación del compuesto **4d** se realizaron a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se han descrito en lo que antecede para la preparación y la purificación del compuesto **4a**. El ribonucleósido **4d** se obtuvo en forma de un sólido (1,10 g, 1,32 mmol) en un rendimiento de un 66 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**2d**) que se usó. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11,81 (s a, 1H), 11,55 (s a, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,85 - 7,70 (m, 4H), 7,34 - 7,28 (m, 3H), 6,99 - 6,94 (m, 3H), 5,94 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H), 5,48 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 5,39 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 5,48 (dd, *J* = 5,2, 1,2 Hz, 1H), 4,75 (m, 2H), 4,64 (m, 1H), 4,07 - 3,89 (m, 3H), 1,07 - 0,95 (m, 28H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170,5, 162,9, 157,5, 154,9, 148,1, 147,2, 137,2, 134,8, 129,5, 128,3, 123,2, 121,3, 114,5, 98,4, 86,0, 80,7, 78,6, 70,2, 66,2, 60,1, 17,2, 17,1, 16,9, 16,8, 12,8, 12,6, 12,3, 12,05, 12,02. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>39</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 835,3149, encontrado 835,3148.

**2'-O-(Aminooximetil)guanosina (5d).** La preparación del compuesto **5d** a partir del compuesto **4d** se realizó en unas condiciones idénticas a las que se usan para la preparación del compuesto **5b**. Después de la retirada del de amoniaco en exceso en una corriente de aire, 2'-O-(aminooximetil) guanosina se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0 → 25 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto, se evaporaron a sequedad a presión reducida proporcionando el compuesto **5d**. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10,77 (s a, 1H), 7,96 (s, 1H), 6,59 (s a, 2H), 5,85 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 5,12 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 4,72 (m, 2H), 4,46 (dd, *J* = 6,0, 5,7 Hz, 1H), 4,26 (dd, *J* = 4,8, 4,8 Hz, 1H), 3,91 (c, *J* = 3,8 Hz, 1H), 3,61 (dt, *J* = 11,8, 4,4 Hz, 1H), 3,52 (dt, *J* = 11,8, 4,4 Hz, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 156,6, 153,8, 151,1, 135,3, 116,5, 98,0, 85,6, 84,8, 79,6, 69,6, 61,1. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M + H]<sup>+</sup> 329,1204, encontrado 329,1211.

**2'-O-(Piren-1-ilmetanimina-N-oximetil)guanosina (6d).** La preparación del compuesto **5d** a partir del compuesto **4d** se realizó a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se usan y se han descrito en lo que antecede. Después de la retirada del amoniaco en exceso, el material que quedó se hizo reaccionar con 1-pirenocarboxaldehído a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se emplean para la preparación del compuesto **6b**. El ribonucleósido pirenilado **6d** se purificó por cromatografía sobre gel de sílice en unas condiciones idénticas a las que se describen para la purificación del compuesto **6b** y se obtuvo en un rendimiento de un 69 % (187 mg, 345  $\mu$ mol) sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4d**) que se usó. +ESI-HRMS: Calculado para  $C_{28}H_{24}N_6O_6$  [M + H]<sup>+</sup> 541,1830, encontrado 541,1829.

**2'-O-(5-Colesten-3-imina-N-oximetil)uridina (8).** 2'-O-(Aminooximetil)uridina (**5a**) se preparó tal como se ha descrito en lo que antecede a partir del compuesto **4a** purificado con gel de sílice (132 mg, 200  $\mu$ mol). Después de la desililación mediada por  $NH_4F$  y la retirada completas del grupo ftalimido, 5-colesten-3-ona (7, 154 mg, 4,00 mmol) se añadió a la mezcla de reacción, que a continuación se calentó a  $55 \pm 2$  °C en un frasco dotado de tapa a rosca de 4 ml hasta la compleción de la reacción de oximación (1 h) tal como se indicó mediante TLC ( $CHCl_3/MeOH$  9:1 v/v). La mezcla de reacción se transfirió a un frasco de vidrio dotado de tapa a rosca de 20 ml al que se añadió  $CH_2Cl_2$  (7 ml) y una solución saturada acuosa de  $NaHCO_3$  (2 ml); después de un mezclado vigoroso la fase orgánica se recogió y se evaporó a sequedad al vacío. El producto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0  $\rightarrow$  4 %) en  $CH_2Cl_2$  como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto puro, se evaporaron a sequedad a presión reducida dando el compuesto **8** en forma de un polvo de color blanco (90 mg, 0,14 mmol) en un rendimiento de un 69 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4a**) que se usó. +ESI-HRMS: Calculado para  $C_{37}H_{57}N_3O_7$  [M + H]<sup>+</sup> 656,4269, encontrado 656,4269

**N-(2,2-Dimetoxietil)biotinamida (9).** A una suspensión de éster D-(+)-biotin 2-nitrofenílico (365 mg, 1,00 mmol) en MeCN (20 ml) se añadió aminoacetaldehído dimetil acetal (130  $\mu$ l, 1,20 mmol) y  $Et_3N$  (170  $\mu$ l, 1,20 mmol). La suspensión se calentó suavemente hasta que se obtuvo una solución; la solución a continuación se agitó durante 16 h a  $\sim 25$  °C. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el material que quedó se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0  $\rightarrow$  10 %) en  $CH_2Cl_2$  como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto y se evaporaron a sequedad a baja presión dando el compuesto **9** (300 mg, 910  $\mu$ mol) en forma de un sólido en un rendimiento de un 91 %. RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  7,87 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 6,43 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 4,32 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 4,28 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 4,12 (ddd,  $J = 7,6, 4,4, 1,8$  Hz, 1H), 3,25 (s, 6H), 3,13 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H), 2,82 (dd,  $J = 12,3, 12,3$  Hz, 1H), 2,56 (d,  $J = 12,3$  Hz, 1H), 2,07 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,66 - 1,22 (m, 7H). RMN de  $^{13}C$  (75 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  172,2, 162,6, 102,0, 61,0, 59,1, 55,4, 53,1, 40,2, 39,8, 34,9, 28,1, 28,0, 25,2. +ESI-HRMS: Calculado para  $C_{14}H_{25}N_3O_4S$  [M + H]<sup>+</sup> 332,1639, encontrado 332,1641.

**N-(2-Oxoetil)biotinamida.** N-(2,2-Dimetoxietil)biotinamida (**9**, 280 mg, 850  $\mu$ mol) se disolvió en MeOH (2 ml) y HCl conc. (0,5 ml) se añadió a la solución, que se dejó en agitación durante 1 h a 25 °C. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida para producir el aldehído, la totalidad de la cantidad de la cual se usó sin purificación adicional en la preparación del compuesto **10**.

**El conjugado de uridina biotilado 10.** 2'-O-(Aminooximetil)uridina (**5a**) se preparó a partir del compuesto **4a** purificado con gel de sílice a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se describen para la preparación del compuesto **8**. Después de la desililación mediada por  $NH_4F$  y la retirada completas del grupo ftalimido, una solución de la totalidad de la N-(2-oxoetil)biotinamida que se produjo en lo que antecede en MeOH (2 ml) se añadió a la mezcla de reacción, que se calentó a  $55 \pm 2$  °C en un frasco dotado de tapa a rosca de 4 ml hasta la compleción de la reacción de oximación (1 h) tal como se indicó mediante TLC ( $CHCl_3/MeOH$  9:1 v/v). La mezcla de reacción a continuación se sometió a tratamiento y se procesó exactamente tal como se describe en la preparación del compuesto **8**. El producto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice empleando un gradiente de MeOH (0  $\rightarrow$  20 %) en  $CH_2Cl_2$  como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto puro, se evaporaron a sequedad a presión reducida proporcionando el compuesto **10** en forma de un polvo de color blanco (74 mg, 0,13 mmol) en un rendimiento de un 66 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4a**) que se empleó. +ESI-HRMS: Calculado para  $C_{22}H_{32}N_6O_9S$  [M + H]<sup>+</sup> 557,2024, encontrado 557,2024

**N-(2,2-Dimetoxietil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (11).** A una solución de cloruro de dansilo (270 mg, 1,00 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (10 ml) se añadió aminoacetaldehído dimetil acetal (130  $\mu$ l, 1,2 mmol) y  $Et_3N$  (170  $\mu$ l, 1,2 mmol); la solución se dejó en agitación durante 1 h a 25 °C. La mezcla de reacción se evaporó a continuación a sequedad a presión reducida y el material que quedó se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0  $\rightarrow$  1 %) en  $CH_2Cl_2$  como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto y se evaporaron a sequedad a baja presión dando el compuesto **11** (318 mg, 940  $\mu$ mol) en forma de un sólido en un rendimiento de un 94 %. RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  8,45 (dt,  $J = 8,5, 1,1$  Hz, 1H), 8,29 (dt,  $J = 8,8, 0,9$  Hz, 1H), 8,16 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 8,10 (dd,  $J = 7,3, 1,1$  Hz, 1H), 7,61 (t,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,58 (t,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,25 (dd,  $J = 7,6, 0,7$  Hz, 1H), 4,11 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 3,06 (s, 6H), 2,89 (t,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 2,81 (s, 6H). RMN de  $^{13}C$  (75 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  151,2, 136,2, 129,3, 128,9, 127,9, 127,7, 123,5, 119,1, 115,0, 102,4, 53,3, 44,9, 43,9. +ESI-HRMS: Calculado para  $C_{16}H_{22}N_2O_4S$  [M + H]<sup>+</sup> 339,1373, encontrado 339,1374.

**N-(2-Oxoetil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida.** El acetal **11** (287 mg, 850  $\mu$ mol) se disolvió en MeOH (1 ml) y HCl concentrado (0,5 ml) se añadió a la solución, que se agitó durante 1 h a 25 °C. La mezcla de reacción se

evaporó a continuación a sequedad; el material que quedó se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) y la solución se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (2 ml de una solución acuosa saturada). La capa orgánica se recogió y se evaporó a baja presión para dar el aldehído como una espuma de color verde claro, la totalidad de la cantidad de la cual se usó sin purificación adicional en la preparación del compuesto **12**.

5 **El conjugado de uridina dansilado 12.** 2'-O-(Aminooximetil)uridina (**5a**) se preparó a partir del compuesto **4a** purificado con gel de sílice a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se describen para la preparación del compuesto **8**. Después de la desililación mediada por NH<sub>4</sub>F y la retirada completas del grupo ftalimido, una solución de la totalidad de la *N*-(2-oxoetil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1- sulfonamida que se generó en lo que antecede en MeOH (1 ml) se añadió la mezcla de reacción, que se calentó a 55 ± 2 °C en un frasco dotado de tapa a rosca de 4 ml hasta la compleción de la reacción de oximación (1 h) tal como se indicó mediante TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 v/v). La mezcla de reacción a continuación se sometió a tratamiento y se procesó exactamente tal como se describe en la preparación del compuesto **8**. El producto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice empleando un gradiente de MeOH (0 → 6 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto puro, se evaporaron a sequedad a presión reducida para dar el compuesto **12** como un polvo de color verde claro (82 mg, 140 μmol) en un rendimiento de un 70 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4a**) que se usó. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 564,1759, encontrado 564,1759.

10 ***N*-(4,4-Dietoxibutil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (13).** A una solución de cloruro de dansilo (270 mg, 1,00 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) se añadió 4-aminobutiraldehído dietil acetal (237 μl, 1,20 mmol) y Et<sub>3</sub>N (170 μl, 1,20 mmol). La solución se agitó durante 1 h a 25 °C y se evaporó a continuación a sequedad a presión reducida. El material que quedó se procesó y se purificó en unas condiciones idénticas a las que se describen para el procesamiento y la purificación del compuesto **11**. Se recogieron fracciones que contenían el producto y se evaporaron a sequedad a baja presión dando el compuesto **13** (366 mg, 930 μmol) en forma de un sólido en un rendimiento de un 93 %. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,45 (dt, *J* = 8,5, 1,1 Hz, 1H), 8,30 (dt, *J* = 8,8, 0,9 Hz, 1H), 8,09 (dd, *J* = 7,3, 1,2 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,61 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,58 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,25 (dd, *J* = 7,6, 0,7 Hz, 1H), 4,19 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 2,81 (s, 6H), 2,77 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 1,31 (m, 4H), 0,99 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 151,2, 136,1, 129,2, 128,9, 128,1, 127,7, 123,5, 119,1, 114,9, 101,6, 60,2, 44,9, 42,2, 30,1, 24,4, 15,1. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 395,1999, encontrado 395,2000.

20 ***N*-(4-Oxobutil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida.** Este aldehído se preparó a partir del acetal **13** a una escala y en unas condiciones idénticas a las que se emplean para la preparación de *N*-(2-oxoetil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida a partir del acetal **11**. *N*-(4-Oxobutil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida se obtuvo como una espuma de color verde claro, la totalidad de la cantidad de la cual se usó sin purificación adicional en la preparación del compuesto **14**.

30 **El conjugado de uridina dansilado 14.** Este conjugado se preparó y se purificó exactamente tal como se notifica a partir de la preparación y la purificación del conjugado de uridina dansilado **12**. El conjugado de uridina dansilado **14** se aisló como un polvo de color verde claro (96 mg, 0,16 mmol) en un rendimiento de un 81 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4a**) que se usó. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 592,2072, encontrado 592,2071.

40 ***N*-(2,2-Dimetoxietil)-4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida (15).** A una solución de cloruro de 4-(dimetilamino) azobenceno-4'-sulfonilo (324 mg, 1,00 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se añadió aminoacetaldehído dimetil acetal (130 μl, 1,20 mmol) y Et<sub>3</sub>N (179 μl, 1,20 mmol). La solución se dejó en agitación durante 16 h a 25 °C. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el material que quedó se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0 → 2 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto y se evaporaron a sequedad a presión reducida dando el compuesto **14** (373 mg, 950 μmol) en forma de un sólido en un rendimiento de un 95 %. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,19 (m, 4H), 7,82 (d, *J* = 9,3 Hz, 2H), 6,85 (d, *J* = 9,3 Hz, 2H), 4,29 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 3,19 (s, 6H), 3,08 (s, 6H), 2,89 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 154,4, 153,0, 142,5, 140,5, 127,7, 125,3, 122,1, 111,5, 102,3, 53,3, 44,1, 39,8. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 393,1591, encontrado 393,1596.

50 ***N*-(2-Oxoetil)-4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida.** El acetal **15** (287 mg, 850 μmol) se disolvió en una solución de I<sub>2</sub> al 10 % (p/v) en acetona (10 ml). La solución resultante se agitó a 25 °C durante 16 h y se evaporó a continuación a sequedad a presión reducida. El material que quedó se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) y se lavó con una solución acuosa de bisulfito de sodio al 5 % (p/v) (5 ml) seguido de una solución saturada acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (5 ml). La capa orgánica se recogió y se evaporó a sequedad al vacío. La totalidad de la cantidad del producto de color naranja se usó en la preparación del compuesto **16**.

55 **El conjugado de citidina dabsilada 16.** 2'-O-(Aminooximetil)citidina (**5b**) se preparó a partir del compuesto **4b** purificado con gel de sílice (140 mg, 0,2 mmol) tal como se ha descrito en lo que antecede para la preparación del compuesto **6b**. Después de la desililación mediada por NH<sub>4</sub>F y la retirada completas del grupo ftalimido, una solución de la totalidad de la *N*-(2-oxoetil)-4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida que se produjo en lo que antecede en MeOH (1 ml) se añadió la mezcla de reacción, que se calentó a 55 ± 2 °C en un frasco dotado de tapa a rosca de 4 ml hasta la compleción de la reacción de oximación (1 h) tal como se indicó mediante TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 v/v). La

60

mezcla de reacción a continuación se sometió a tratamiento y se procesó exactamente tal como se describe en la preparación del compuesto **8**. El producto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluido empleando un gradiente de MeOH (0 → 8 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto puro, se evaporaron a sequedad a presión reducida proporcionando el compuesto **8** como un polvo de color naranja (74 mg, 0,12 mmol) en un rendimiento de un 61 % sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**4b**) que se empleó. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 617,2137, encontrado 617,2134.

**N-(4-Cianobut-1-il)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (18)**. 4-Aminobutironitrilo se preparó a partir de la reacción de 4-clorobutironitrilo (207 mg, 2,00 mmol) con ftalimida de potasio (407 mg, 2,20 mmol) en las condiciones que son descritas por McKay *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 4328 - 4335, con la siguiente modificación: el 4-aminobutironitrilo en bruto, en lugar de clorhidrato de 4-aminobutironitrilo purificado, se hizo reaccionar con una solución agitada de cloruro de dansilo (135 mg, 500 μmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml) durante 10 min a ~ 25 °C. El producto de reacción se analizó por TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5 v/v) y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0 → 3 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el compuesto **18** y se evaporaron al vacío dando el producto puro (123 mg, 390 μmol) en un rendimiento de un 78 % sobre la base de la cantidad de cloruro de dansilo que se usa en la reacción. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,47 (dt, J = 8,5, 1,1 Hz, 1H), 8,28 (dt, J = 8,5, 1,1 Hz, 1H), 8,11 (dd, J = 7,2, 1,2 Hz, 1H), 8,02 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 7,63 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,60 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,26 (dd, J = 7,5, 0,7 Hz, 1H), 2,85 (m, 2H), 2,82 (s, 6H), 2,39 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 1,60 (quint, J = 7,0 Hz, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 151,3, 135,5, 129,5, 129,0, 128,9, 128,3, 127,8, 123,5, 119,9, 118,8, 115,1, 44,9, 40,9, 25,2, 13,4. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 318,1271, encontrado 318,1271.

**2'-O-[5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamidil-N-oximetil]uridina (19)**. 2'-O-(aminoximetil)uridina (**5a**, 87 mg, 0,3 mmol) purificada con gel de sílice se disolvió en piridina (2 ml) y se añadió cloruro de dansilo (135 mg, 0,5 mmol). La solución se agitó a ~ 25 °C durante 2 h y se evaporó a continuación a sequedad al vacío. El producto en bruto **19** se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH (0 → 8 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el compuesto **19** y se evaporaron al vacío dando un sólido de color amarillo en un rendimiento de un 83 % (130 mg, 0,25 mmol) sobre la base de la cantidad molar del material de partida (**5a**) que se usó. +ESI-HRMS: Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 523,1493, encontrado 523,1493.

**Procedimiento general para la retirada de grupos indicadores y funcionales a partir de los ribonucleósidos 6a - d, 10, 12, 14 y 16**. El compuesto **6a** purificado (5 mg, 10 μmol) se puso en un frasco de vidrio dotado de tapa a rosca de 4 ml y se añadió TBAF 0,5 M en THF (100 μl). El frasco herméticamente cerrado se calentó a 55 °C; el progreso de la reacción se determinó mediante RP-HPLC. El disolvente en exceso se retiró en una corriente de aire; el material que quedó se disolvió en un tampón de HPLC A (trietilacetato de amonio 0,1 M, pH 7,0, 500 μl). Una alícuota (2 μl) se analizó por RP-HPLC de acuerdo con las siguientes condiciones para el compuesto **6a - d, 12, 14 y 16**: partiendo de trietilacetato de amonio 0,1 M de pH 7,0, un gradiente lineal de un 1 % de MeCN/min se bombeó a un caudal de 1 ml/min durante 40 min; el gradiente a continuación se aumentó a un 6 % de MeCN/min durante 10 min al mismo caudal y se mantuvo isocrático durante 15 min más. En el caso del compuesto **10**, las condiciones de RP-HPLC fueron: partiendo de trietilacetato de amonio 0,1 M de pH 7,0, un gradiente lineal de un 1 % de MeCN/min se bombea a un caudal de 1 ml/min durante 40 min. Las alturas de pico se normalizaron con respecto al pico más alto, que se ajustó a 1 unidad arbitraria.

## Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra un método para preparar oligonucleótidos de acuerdo con una realización de la invención.

**2'-O-(Metoximatanimina-N-oximetil)uridina [20a (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)]**. El compuesto **4a** purificado (2,0 g, 3,0 mmol) se disolvió en metanol (30 ml) a lo que se añadió fluoruro de amonio (925 mg 25,0 mmol). La mezcla de reacción heterogénea se agitó a ~ 45 °C hasta que se obtuvo la desililación y la deftalimidación completas (~ 16 h) tal como se indicó mediante TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1 v/v)). Sin tratamiento ni purificación algunos, 2-metoxiacetaldehído, que se generó *in situ* en un recipiente separado al mezclar 2-metoxiacetaldehído dimetilacetal (1,2 g, 10 mmol), y HCl concentrado (500 μl) en metanol acuoso al 50 % (5 ml) durante un periodo de 2 h a ~ 25 °C, se añadió en su totalidad a la mezcla de reacción que contenía 2'-O-aminoximetiluridina. La reacción de oximación se dejó avanzar durante 1 h a ~ 45 °C. La mezcla de reacción se evaporó a continuación a sequedad a presión reducida, se disolvió/se suspendió en 10 ml de CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (1:8:1, v/v/v), se mezcló con gel de sílice (~ 10 g) y se dejó secar al aire durante una noche a ~ 25 °C. El gel de mezcla de gel de sílice seco se distribuyó de manera uniforme sobre la parte de arriba de una columna rellena con gel de sílice (100 g) previamente equilibrada en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El producto se eluyó a partir de la columna empleando un gradiente de MeOH (0 → 8 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Se recogieron fracciones que contenían el producto puro (TLC), se evaporaron a sequedad a presión reducida dando el compuesto **26a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) en forma de un polvo de color blanco (770 mg, 2,22 mmol) en un rendimiento de un 74 % sobre la base del compuesto **4a**.

**Preparación del compuesto 20a (R = H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Br y CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>)**. Estos compuestos se prepararon y se purificaron en unas condiciones similares a las del compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) con la excepción de la sustitución de 2-metoxiacetaldehído con formaldehído, acetaldehído, 2-fluoroacetaldehído, 2-cloroacetaldehído, 2-bromoacetaldehído y 2-metiltioacetaldehído. El compuesto **20a** (R = H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Br y CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>) se

obtuvieron en unos rendimientos similares a los del compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>).

**Preparación del compuesto 20a (R = CH<sub>2</sub>CN).** Este compuesto se preparó mediante la reacción del compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>Cl o CH<sub>2</sub>Br) con cianuro de tetra-*n*-butilamonio en metanol. El compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>CN) se purificó en unas condiciones similares a las del compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>).

- 5 **Preparación del compuesto 20a (R = CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>).** Este compuesto se preparó mediante la oxidación del compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>) usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (3 ml) durante un periodo de 10 min a ~ 25 °C. El producto de reacción se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, tal como se describe para el compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) usando un gradiente de MeOH (0 → 10 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. El ribonucleósido **20a** (R = CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>) se aisló en un rendimiento de un 93 %.
- 10 **Preparación del compuesto 20a (R = CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).** Este compuesto se preparó mediante la oxidación del compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>) usando ácido *m*-cloroperbenzoico durante un periodo de 2 h a ~ 25 °C en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El producto de reacción se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, tal como se describe para el compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>) usando un gradiente de MeOH (0 → 10 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. El ribonucleósido **20a** (R = CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) se aisló en un rendimiento de un 62 %.
- 15 **Preparación de 2-cloro-2,2-dimetilbutiraldehído.** Este compuesto se preparó a partir de isobutiraldehído y cloruro de sulfurilo de acuerdo con un procedimiento de la bibliografía y se purificó por destilación (Stevens, C. L.; Gillis, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* 1956,79, 3448 - 3451).

20 **Preparación de 2-bromo-2,2-dimetilbutiraldehído dimetilacetal.** Este compuesto se preparó a partir de isobutiraldehído y N-bromosuccinimida de acuerdo con un procedimiento de la bibliografía y se purificó por destilación al vacío (Marvell, E. N.; Joncich, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 973 - 975).

**Preparación de 2-ciano-2,2-dimetilbutiraldehído.** Este compuesto se preparó a partir de 2-cloro-2,2-dimetilbutiraldehído de acuerdo con un procedimiento de la bibliografía (Reetz, M. T.; Chatziiosifidis, I.; Künzer, H.; Müller-Starke, H. *Tetrahedron* 1983, 39, 961 - 965) o a partir de malononitrilo de acuerdo con un procedimiento de la bibliografía (Maraval, A.; Igau, A.; Donnadieu, B.; Majoral, J. P. *Eur. J. Am. Chem.* 2003, 385 - 394).

25 **Preparación de 2-metiltio-2,2-dimetilbutiraldehído dimetilacetal.** Este compuesto se preparó mediante la reacción de 2-bromo-2,2-dimetilbutiraldehído dimetilacetal con tiometóxido de sodio en etanol acuoso.

**Preparación de 2-metilsulfinil-2,2-dimetilbutiraldehído dimetilacetal.** Este compuesto se preparó mediante la reacción de 2-metiltio-2,2-dimetilbutiraldehído dimetilacetal usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % durante un periodo de 10 min a ~ 25 °C.

30 **Preparación de 2-metilsulfonyl-2,2-dimetilbutiraldehído dimetilacetal.** Este compuesto se preparó mediante la reacción de 2-metiltio-2,2-dimetilbutiraldehído dimetilacetal usando ácido *m*-cloroperbenzoico durante un periodo de 2 h a ~ 25 °C en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

35 **Preparación del compuesto 20a (R = C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CN, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub> y C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).** Estos compuestos se prepararon y se purificaron en unas condiciones similares a las del compuesto **20a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) con la excepción de la sustitución de 2-metoxiacetaldehído con 2-ciano-2,2-dimetilbutiraldehído, 2-metilsulfinil-2,2-dimetilbutiraldehído y 2-metilsulfonyl-2,2-dimetilbutiraldehído, que con la excepción de 2-ciano-2,2-dimetilbutiraldehído, se generaron *in situ* en un recipiente separado al mezclar cada uno del dimetilacetal correspondiente y HCl concentrado en metanol acuoso al 50 % durante un periodo de 2 h a ~ 25 °C.

40 **5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-(metoximatanimina-*N*-oximetil)uridina [21a (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)].** A una solución del ribonucleósido **20a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) (2,0 mmol) en piridina anhidra (15 ml) se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (2,2 mmol). La solución se agitó a ~ 25 °C y el progreso de la reacción se controló por TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5 v/v)) hasta la compleción (~ 2 h). La mezcla de reacción a continuación se vertió en una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (200 ml) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3X150 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. A continuación de la filtración, el filtrado se evaporó a presión reducida y se evaporó conjuntamente con tolueno (3 X 100 ml). El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de CH<sub>3</sub>OH (0 → 2 %) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que contenía trietilamina al 0,2 % (v/v). Se recogieron fracciones que contenían el compuesto **26a** puro y se sometieron a evaporación rotatoria para dar una espuma a baja presión. El ribonucleósido **21a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) se disolvió en C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> seco (10 ml); la solución resultante se congeló y, a continuación, se liofilizó a alto vacío para producir un polvo de color amarillo en un rendimiento de un 89 %.

50 **Preparación de 21 a (R = H, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CN, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S(O)CH<sub>3</sub> o -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).** Estos compuestos se prepararon y se purificaron en unas condiciones idénticas a las del compuesto **21 a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) y se aislaron en unos rendimientos de un 85 - 95 %.

55 **5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-3'-O-[(*N,N*-diisopropilamino) (2-cianoetil)]fosfinil-2'-O-(metoximatanimina-*N*-oximetil) uridina [compuesto **22a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)].** A una solución del ribonucleósido **21 a** (R = CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) (1,0 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (5,0 ml) que contenía Et<sub>3</sub>N (0,70 ml, 5,0 mmol) se añadió 2-cianoetil *N,N*-diisopropilclorofosforamida (525

5  $\mu$ l, 2,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó a  $\sim 25$  °C en una atmósfera de argón hasta que se observó la completa desaparición del material de partida ( $\sim 2$  h) mediante TLC ( $C_6H_6/Et_3N$  (9:1 v/v)). La mezcla de reacción a continuación se vertió en una solución saturada de  $NaHCO_3$  (50 ml) y se extrajo con  $CH_2Cl_2$  (2 X 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $Na_2SO_4$  anhidro y, a continuación, se filtraron. El filtrado se evaporó a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando  $C_6H_6/Et_3N$  (9:1 v/v) como eluyente. Se combinaron entre sí (TLC) fracciones que contenían el producto puro y se evaporaron a sequedad al vacío. El material se disolvió en  $C_6H_6$  seco (3 ml) y la solución resultante se añadió a hexano frío ( $-78^\circ C$ ) agitado (100 ml). De manera inmediata, precipitó fosforamida pura 22a en forma de un sólido de color blanco. Después de la decantación cuidadosa de hexano, el sólido se disolvió en  $C_6H_6$  seco (10 ml). La solución se congeló y, a continuación, se liofilizó a alto vacío dando el compuesto 22a libre de  $Et_3N$  ( $R = CH_2OCH_3$ ) en un rendimiento de un 90 %.

15 Preparación del compuesto 22a ( $R = H, -CH_2F, -CH_2CN, -CH_2OCH_3, -CH_2SCH_3, -CH_2S(O)CH_3, -CH_2SO_2CH_3, -C(CH_3)_2CN, -C(CH_3)_2SCH_3, -C(CH_3)_2S(O)CH_3$  o  $-C(CH_3)_2SO_2CH_3$ ). Estos compuestos se prepararon y se purificaron en unas condiciones idénticas a las del compuesto 22a ( $R = CH_2OCH_3$ ) con la excepción de que se requirió  $MeCN/Et_3N$  (9:1 v/v) para eliminar por elución el compuesto 22a ( $R = CH_2S(O)CH_3$  y  $CH_2SO_2CH_3$ ) de la cromatografía sobre columna de gel de sílice. Estas fosforamiditas de ribonucleósido se aislaron en unos rendimientos de un 85 - 95 %.

20 **Síntesis de oligonucleótido de fase sólida.** La síntesis de fase sólida de  $r(Up)_{20}dT$ , en el que dT quiere decir 2'-desoxitimidina, se realizó a una escala de 0,2  $\mu$ mol en el modo "trityl-off" ("sin tritilo") usando una succinil alquilamina de cadena larga - soporte de vidrio de poro controlado funcionalizado con 5'-O-DMTr-dT como el nucleósido líder. Las síntesis se realizaron usando un sintetizador de ADN/ARN y fosforamida o bien 22a ( $R = CH_2OCH_3$ ) o bien 22a ( $R = CH_2S(O)CH_3$ ). Las fosforamiditas de ribonucleósido se disolvieron en  $MeCN$  seco para dar soluciones 0,2 M. Se empleó 5-etiltio-1H-tetrazol para la activación de fosforamida y se usó como una solución 0,25 M en  $MeCN$  seco. Todos los otros reactivos complementarios necesarios para la preparación de oligonucleótidos se compraron y se utilizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El tiempo de reacción para cada etapa de acoplamiento de fosforamida fue de 180 s. Las etapas de desdimetoxitritilación y de protección con capuchón del ciclo de síntesis se realizaron, cada una, durante un periodo de 60 s. Por razones de comparación, la síntesis de fase sólida de  $r(Up)_{20}dT$  también se realizó usando 2'-O-TBDMS uridina fosforamida disponible en el mercado en unas condiciones de síntesis y de desbloqueo similares a las que se notifican en la bibliografía (Ogilvie, K. K.; Usman, N.; Nicoghosian, K.; Cedergren, R. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988, 85, 5764 - 5768).

35 **Desprotección y caracterización de oligonucleótidos sintetizados a partir de la fosforamida 22a ( $R = CH_2S(O)CH_3$ ).** El oligonucleótido 5'-dedimetoxitritilado unido a fase sólida se puso en un frasco de vidrio dotado de tapa a rosca de 4 ml al que se añadió  $NH_4OH$  concentrado (1 ml). La suspensión se agitó de forma ocasional durante un periodo de 30 min. La solución de amoniaco se transfirió a un frasco de vidrio de 4 ml y se evaporó a sequedad usando una corriente de aire. El oligonucleótido a continuación se disolvió en fluoruro de tetrabutilamonio 0,5 M en DMSO (100  $\mu$ l) y se calentó a  $55$  °C durante 48 h. La solución se cargó en un aparato Sephadex G-25M previamente relleno de columna PD-10 que se equilibró en  $ddH_2O$ . El oligonucleótido se eluyó a partir de la columna usando  $ddH_2O$  como eluyente. Se recogieron unas fracciones (de 1 ml) y aquellas fracciones que contenían el oligonucleótido ( $UV_{260}$ ) se combinaron entre sí. El análisis por RP-HPLC del oligonucleótido desalado se realizó usando una columna Supelcosil LC-18S de 5  $\mu$ m (25 cm X 4,6 mm) de acuerdo con las siguientes condiciones: partiendo de trietilacetato de amonio 0,1 M de pH 7,0, un gradiente lineal de un 1 % de  $MeCN/min$  se bombeó a un caudal de 1 ml/min durante 40 min y, a continuación, se mantuvo, de forma isocrática, durante 10 min. Un cromatograma de  $r(Up)_{20}dT$  no purificado y desalado se muestra en la figura 13B. EM de MALDI-TOF: Calculado para  $C_{190}H_{214}N_{42}O_{165}P_{20}$  [M - H]<sup>-</sup> 6344, encontrado 6349.

45 Se ha de interpretar que el uso de las expresiones "un" y "una" y "el/la" y referentes similar en el contexto de la descripción de la invención (en concreto, en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se incurra en una clara contradicción con el contexto. Los términos "comprendiendo/que comprende", "teniendo/que tiene", "incluyendo/que incluye" y "conteniendo/que contiene" se han de interpretar como expresiones abiertas (es decir, que quieren decir "incluyendo, pero sin limitación"), a menos que se indique otra cosa. La exposición de intervalos de valores en el presente documento tiene por objeto meramente servir como un procedimiento abreviado de hacer referencia de forma individual a cada valor separado que caiga dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si este se hubiera expuesto de forma individual en el presente documento. Todos los procedimientos que se describen en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se incurra de otro modo en una clara contradicción con el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") que se proporcionan en el presente documento, tiene por objeto meramente aclarar mejor la invención y no suponen una limitación al alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna de las expresiones en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativa de que elemento no reivindicado alguno sea esencial para la práctica de la invención.

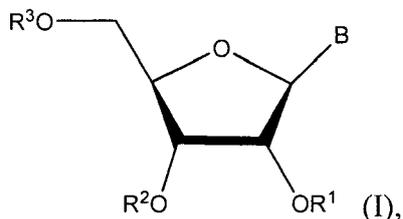
En el presente documento se describen realizaciones preferidas de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores de la presente invención para llevar a cabo la invención. Variaciones de esas

5 realizaciones preferidas se harán evidentes a los expertos en la materia tras la lectura de la descripción anterior. Los inventores de la presente invención esperan que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores de la presente invención tienen por objeto que la invención se ponga en práctica de formas que no sean las que se describen de manera específica en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto que se expone en las reivindicaciones que se adjuntan al presente documento según permita la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos que se han descrito en lo que antecede, en todas las posibles variaciones de los mismos, es abarcada por la invención a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se incurra de otro modo en una clara contradicción con el contexto.

10

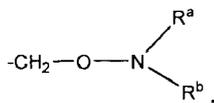
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



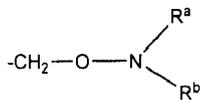
en la que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

5 R¹, R², y R³ se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, cicloalquilo C₃-C₈ alquilo C₁-C₆, cicloalquenilo C₃-C₈, dicicloalquilo C₃-C₈ alquilo C₁-C₆, bicicloalquilo C₇-C₁₂ alquilo C₁-C₆, tricicloalquilo C₇-C₁₄ alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₄, arilo C₆-C₁₄ alquilo C₁-C₆, diarilo C₆-C₁₄ alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₄ alquilo C₁-C₆, heterocicil alquilo C₁-C₆, heterocicilo, heteroarilo, un grupo protector de hidroxilo, un resto ácido nucleico, un resto nucleótido, un soporte sólido y un grupo de fórmula:



10 en la que Rᵃ y Rᵇ se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, cicloalquilo C₃-C₈ alquilo C₁-C₆, cicloalquenilo C₃-C₈, dicicloalquilo C₃-C₈ alquilo C₁-C₆, bicicloalquilo C₇-C₁₂ alquilo C₁-C₆, tricicloalquilo C₇-C₁₄ alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₄, arilo C₆-C₁₄ alquilo C₁-C₆, diarilo C₆-C₁₄ alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₄ alquilo C₁-C₆, heterocicil alquilo C₁-C₆, heterocicilo, heteroarilo y amido, o Rᵃ y Rᵇ o bien independientemente o bien junto con el N forman un resto imida o un resto imina;

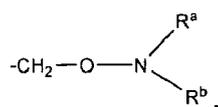
o R² y R³ forman juntos un anillo protector de hidroxilo;  
en el que al menos uno de R¹, R² y R³ es



20 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la nucleobase opcionalmente protegida o la nucleobase se selecciona de entre el grupo que consiste en citosina, adenina, guanina, uracilo, timina, xantina, hipoxantina, derivados de alquilo de los mismos, derivados de amino de los mismos, derivados de halógeno de los mismos, 2- u 8-amino adenina, 2- u 8-alquilo adenina, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, 2,6-diaminopurina, 6-aza uracilo, 4-tio uracilo, 5-trifluorometil uracilo, 5-trifluorometil citosina, 6-aza timina, 6-tioguanina, 7-desazaadenina, 7-desazaguanina, 8-mercapto adenina, 8-tioalquilo adenina, 8-hidroxil/oxo adenina, 8-mercapto guanina, 8-tioalquil guanina, y 8-hidroxil/oxo guanina, 1-metiladenina, 2-metiladenina, N⁶-metiladenina, N⁶-isopentiladenina, 2-metil-N⁶-isopentiladenina, N,N-dimetiladenina, 8-bromo adenina, 2-tiocitosina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, 5-etilcitosina, 4-acetilcitosina, 1-metilguanina, 2-metilguanina, 7-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 8-bromoguanina, 8-cloroguanina, 8-aminoguanina, 8-metilguanina, 8-tioguanina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, 5-etiluracilo, 5-propiluracilo, 5-metoxiuracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-(metilaminometil)uracilo, 5-(carboximetilaminometil)-uracilo, 2-tiouracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-(2-bromovinil)uracilo, ácido uracil-5-oxiacético, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, 1-metilpseudouracilo, queosina, inosina, 1-metilinosina, hipoxantina, xantina, 2-aminopurina, 6-hidroxi aminopurina, 6-tiopurina y 2,6-diaminopurina, 2- u 8-amino adenina, 2- u 8-alquilo adenina, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, 2,6-diaminopurina, 6-aza uracilo, 4-tio uracilo, 5-trifluorometil uracilo, 5-trifluorometil citosina, 6-aza timina, 6-tioguanina, 7-desazaadenina, 7-desazaguanina, 8-mercapto adenina, 8-tioalquilo adenina, 8-hidroxil/oxo adenina, 8-mercapto guanina, 8-tioalquil guanina, y 8-hidroxil/ oxo guanina.

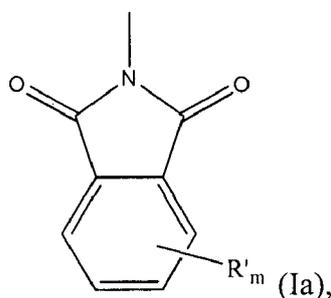
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la nucleobase opcionalmente protegida es una nucleobase cuyo grupo amino exocíclico está protegido por un grupo protector lábil que forma una amida, imida, carbamato, tritilo o amidina, preferiblemente en el que la amida es una trifluoroacetil amida, acetil amida, fenoxiacetil amida, terc-butilfenoxiacetil amida, benzoil amida, o isobutiril amida; y preferiblemente en el que el carbamato es un carbamato de *tert*-butoxicarbonilo, carbamato de (4-nitrofenil)etiloxi carbonilo o carbamato de N-benciloxicarbonilo.

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R¹ es



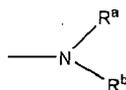
- 5 en que  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alquenilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , cicloalquenilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , dicalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , bicicloalquilo  $\text{C}_7\text{-C}_{12}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , tricicloalquilo  $\text{C}_7\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , diarilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , heterociclil alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , heterociclilo, heteroarilo y amido, o  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  o bien independientemente o bien junto con el N forman un resto imida o un resto imina; y  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alquenilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , cicloalquenilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , dicalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , bicicloalquilo  $\text{C}_7\text{-C}_{12}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , tricicloalquilo  $\text{C}_7\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , diarilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , heterociclil alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , heterociclilo, heteroarilo, un grupo protector de hidroxilo, un resto ácido nucleico, un resto nucleótido y un soporte sólido; o  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  forman juntos un anillo protector de hidroxilo.

5. El compuesto de la reivindicación 1 o 4, en el que  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  junto con N forman un resto imida de fórmula (Ia)

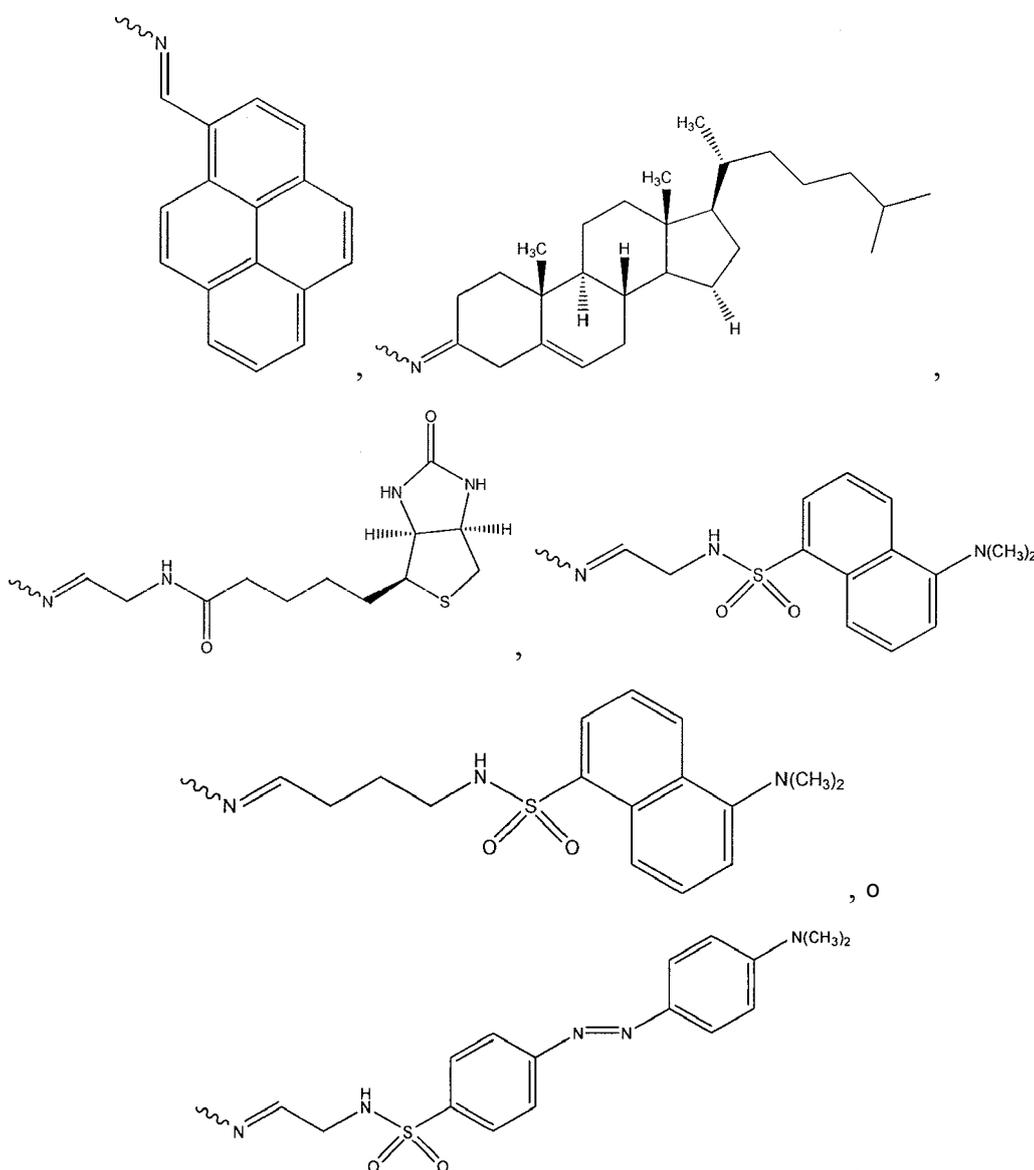


- 15 en la que  $\text{R}'$  es H o un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en halo, hidroxilo, ciano, formilo, acilo, alquil carbonilo, carboxilo, fosforilo, fosfonilo, fosfono alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , sulfonilo, ciano, nitro, alcoxi, alquiltio, acilo, aciloxi, tioacilo, aciltio, ariloxi, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, guanidina, aldehído, ureido, aminocarbonilo, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , halo alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , hidroxilo alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alquenilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , cicloalquilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , cicloalquenilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  y arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{14}$  alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ; y m es 1 a 4.
- 20 6. El compuesto de la reivindicación 1 o 4, en el que  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  forman un resto imina de fórmula:  $=\text{CHR}$ , en el que R se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, haloalquilo, cianoalquilo, alcoxialquilo, ariloxialquilo, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfinilalquilo, arilsulfinilalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, cianohaloalquilo, alcoxihaloalquilo, ariloxihaloalquilo, alquiltiohaloalquilo, ariltiohaloalquilo, alquilsulfinilhaloalquilo, arilsulfinilhaloalquilo, arilsulfonilhaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo y arilsulfonilhaloalquilo, y más preferiblemente en el que R se selecciona de entre el grupo que consiste en H,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{F}$ ,  $-\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{S(O)CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{F}$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S(O)CH}_3$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S(O)CH}_3$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Br}$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{F}$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{CN}$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CY}(\text{Z})\text{S(O)CH}_3$ , y  $-\text{CY}(\text{Z})\text{SO}_2\text{CH}_3$ , en el que Y es F o  $\text{CH}_3$  y Z es F o  $\text{CH}_3$ .
- 30 7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que el grupo funcional se selecciona de entre el grupo que consiste en marcadores fluorescentes, grupos indicadores, grupos lipófilos, grupos hidrófilos, grupos de reticulación, grupos tensioactivos, ligandos de afinidad, carbohidratos, esteroides, aminoácidos, péptidos, proteínas y complejos de metal.

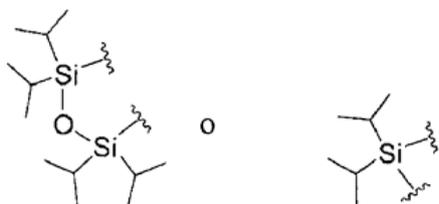
8. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el resto



- 35 es un resto imina de una de las siguientes fórmulas:



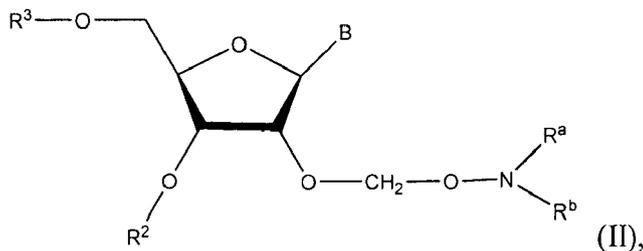
- 5 9. El compuesto de la reivindicación 1 o 4, en el que  $R^2$  y  $R^3$  forman juntos un anillo protector de hidroxilo o  $R^2$  y  $R^3$  son grupos protectores de hidroxilo, preferiblemente en el que el grupo protector de hidroxilo es un sililo, benciloxycarbonilo, tritilo, alquilcarbonilo, alquiloxicarbonilo, pixilo, *tert*-butiloxycarbonilo o 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), y más preferiblemente en el que el anillo protector de hidroxilo o grupo protector de hidroxilo es de fórmula:



- 10 10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que  $R^3$  es un soporte sólido, preferiblemente en el que el soporte sólido es un soporte de vidrio de poro controlado.

11. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que (i)  $R^2$  es dimetoxitritilo; (ii)  $R^2$  y  $R^3$  son H; o (iii)  $R^2$  y/o  $R^3$  es un resto ácido nucleico que es un oligonucleótido unido a través de un enlace fosfotriéster, fosfodiéster, fosforotioato triéster, fosforotioato diéster o fosforamidato.

12. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula II:



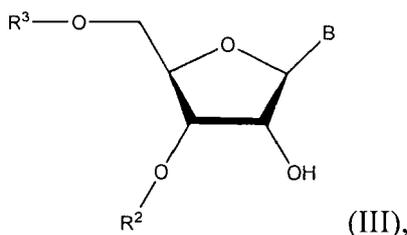
en la que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicalcoalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo, heteroarilo y amido, o R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> o bien independientemente o bien junto con el N forman una imida o imina; y

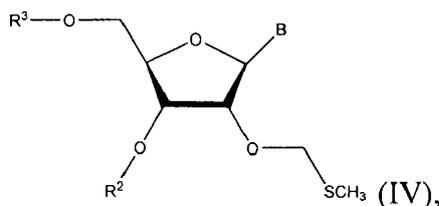
R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, dicalcoalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, bicicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tricicloalquilo C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, diarilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclil alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo, heteroarilo, un grupo protector de hidroxilo, un resto ácido nucleico, un resto nucleótido y un soporte sólido;

comprendiendo el procedimiento:

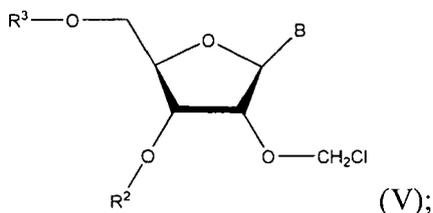
15 (i) convertir el grupo 2'-OH en un grupo 2'-metiltiometoxi del compuesto de fórmula (III):



para obtener un compuesto de fórmula (IV):

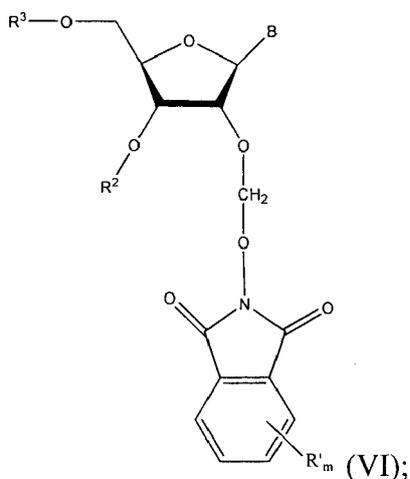


(ii) convertir el grupo 2-metiltiometoxi en un grupo 2-clorometoxi para obtener un compuesto de fórmula (V):

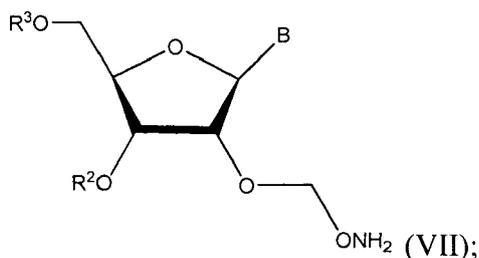


(iii) convertir el grupo 2'-clorometoxi del compuesto de fórmula (V) para obtener un compuesto de fórmula (VI):

20



- 5 en la que R' es H o un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en halo, hidroxilo, ciano, formilo, acilo, alquil carbonilo, carboxilo, fosforilo, fosfonilo, fosfono alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, sulfonilo, ciano, nitro, alcoxi, alquiltio, acilo, aciloxi, tioacilo, aciltio, ariloxi, amino, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, guanidina, aldehído, ureido, aminocarbonilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y m es 1 a 4; (iv) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (VI) con fluoruro de amonio para obtener un compuesto de fórmula VII, *in situ*,

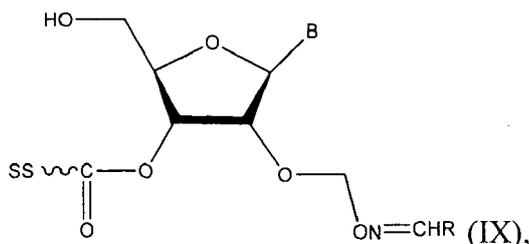


- 10 y (v) hacer reaccionar el compuesto de fórmula VII con un compuesto que tiene grupo aldehído o cetona para obtener un compuesto de fórmula (II).

13. Un procedimiento de preparación de un oligorribonucleótido de longitud de cadena n, en el que n es el número de residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento la adición por etapas de residuos de nucleótido al extremo 5' terminal de una cadena de crecimiento en la que los residuos de nucleótido están protegidos en la posición 2' con un grupo protector de aminoaximetilo.

14. Un procedimiento de preparación de un oligorribonucleótido de longitud de cadena n, en el que n es el número de residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento:

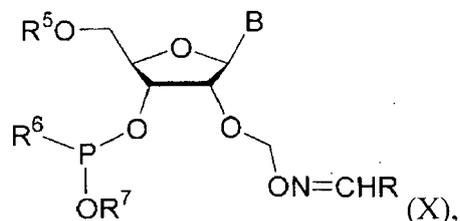
- 20 (i) proporcionar un sustrato que comprende un nucleósido protegido en la función 2'-hidroxilo con un grupo protector derivado de aminoaximetilo y un soporte sólido unido de forma covalente a su función 3'-hidroxilo, teniendo dicho sustrato la fórmula (IX):



- 25 en la que B es una nucleobase opcionalmente protegida; R se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, haloalquilo, cianoalquilo, alcoxialquilo, ariloxialquilo, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, cianohaloalquilo, alcoxihaloalquilo, ariloxihaloalquilo, alquiltiohaloalquilo, ariltiohaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo, arilsulfonilhaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo y arilsulfonilhaloalquilo;

y SS es un soporte sólido;

(ii) proporcionar una fosforamidita de nucleósido 5'-OH-protégido de fórmula (X):



5 en la que R<sup>5</sup> es un grupo protector de hidroxilo; R<sup>6</sup> es un grupo N,N-dialquilamino o un grupo heterocíclico saturado que tiene al menos un átomo de nitrógeno, opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O y S; y OR<sup>7</sup> es un grupo protector de fósforo;

(iii) acoplar el derivado de fórmula (X) con el sustrato de fórmula (IX) para obtener un producto que comprende el sustrato acoplado al derivado de fórmula (X);

(iv) terminar en 5' cualquier sustrato sin reaccionar de fórmula (IX) de la etapa (iii);

10 (v) oxidar la función fosfito triéster presente en el producto de la etapa (iii) para obtener un sustrato que tiene una función fosfato triéster protegida;

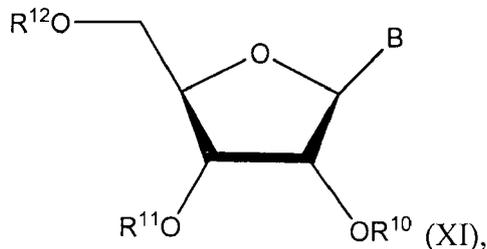
(vi) desproteger el grupo 5'-hidroxi del producto de la etapa (v);

(vii) repetir las etapas (iii)-(vi) n - 1 veces para construir una cadena de oligonucleótido protegida que contiene "n" residuos de nucleótido sobre el soporte sólido;

15 (viii) retirar la nucleobase y grupos protectores de fosfato y escindir el oligonucleótido del soporte sólido; y (ix) opcionalmente desproteger el grupo 2'-OH.

15. Un procedimiento de preparación de un oligorribonucleótido de longitud de cadena n, en el que n es el número de residuos de nucleótido en el oligorribonucleótido, comprendiendo el procedimiento:

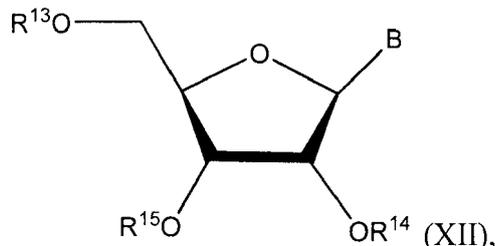
20 (i) proporcionar un sustrato que comprende un nucleósido protegido en una de función 2'-, 3'- o 5'- hidroxil con un grupo protector derivado de aminooximetilo y un soporte sólido unido de forma covalente a una de las funciones hidroxil restantes, teniendo dicho sustrato la fórmula (XI):



25 en la que B es una nucleobase opcionalmente protegida;

en el que al menos uno de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> es un grupo protector derivado de aminooximetilo y el otro de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> es un soporte sólido, opcionalmente unido a través de un grupo carbonilo (>C=O); y R<sup>12</sup> es H;

(ii) proporcionar una fosforamidita de nucleósido 5'-OH-protégido de fórmula (XII):



en la que:

30 R<sup>13</sup> es un grupo protector de hidroxilo; R<sup>14</sup> es un grupo protector derivado de aminooximetilo de fórmula -CH<sub>2</sub>-O-N=CHR<sup>16</sup> y R<sup>15</sup> es un grupo fosforamidita, si R<sup>10</sup> del sustrato de fórmula (XI) es un grupo protector derivado de aminooximetilo y R<sup>11</sup> es un soporte sólido, opcionalmente unido a través de un grupo carbonilo (>C=O); o R<sup>15</sup> es un grupo protector derivado de aminooximetilo de fórmula -CH<sub>2</sub>-O-N=CHR<sup>16</sup> y R<sup>14</sup> es un grupo fosforamidita, si R<sup>11</sup> del sustrato de fórmula (XI) es un grupo protector derivado de aminooximetilo y R<sup>10</sup> es

- un soporte sólido, opcionalmente unido a través de un grupo carbonilo (>C=O);  
 en la que R<sup>16</sup> se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, haloalquilo, cianoalquilo, alcoxialquilo, ariloxialquilo, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfinilalquilo, arilsulfinilalquilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, cianohaloalquilo, alcoxihaloalquilo, ariloxihaloalquilo, alquiltiohaloalquilo, ariltiohaloalquilo, alquilsulfinilhaloalquilo, arilsulfinilhaloalquilo, alquilsulfonilhaloalquilo y arilsulfonilhaloalquilo;  
 en la que el grupo fosforamidita es de fórmula: -P(R<sup>17</sup>)(OR<sup>18</sup>), en la que R<sup>17</sup> es un grupo N,N-dialquilamino dialquilamino o un grupo heterocíclico saturado que tiene al menos un átomo de nitrógeno, opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O y S; y OR<sup>18</sup> es un grupo protector de fósforo;
- (iii) acoplar el derivado de fórmula (XII) con el sustrato de fórmula (XI) para obtener un producto que comprende el sustrato acoplado al derivado de fórmula (XII);  
 (iv) terminar en 5' el sustrato sin reaccionar de fórmula (XI) de la etapa (iii);  
 (v) oxidar la función fosfito triéster presente en el producto de la etapa (iii) para obtener un producto que tiene una función fosfato triéster protegida;
- (vi) desproteger el grupo 5'-hidroxi del producto de la etapa (v);  
 (vii) repetir las etapas (iii) - (vi) n - 1 veces para construir una cadena de oligonucleótido protegida que contiene "n" residuos de nucleótido sobre el soporte sólido;  
 (viii) retirar la nucleobase y grupos protectores de fosfato y escindir el oligonucleótido del soporte sólido; y  
 (ix) opcionalmente desproteger el grupo 2'-OH o el grupo 3'-OH.

20

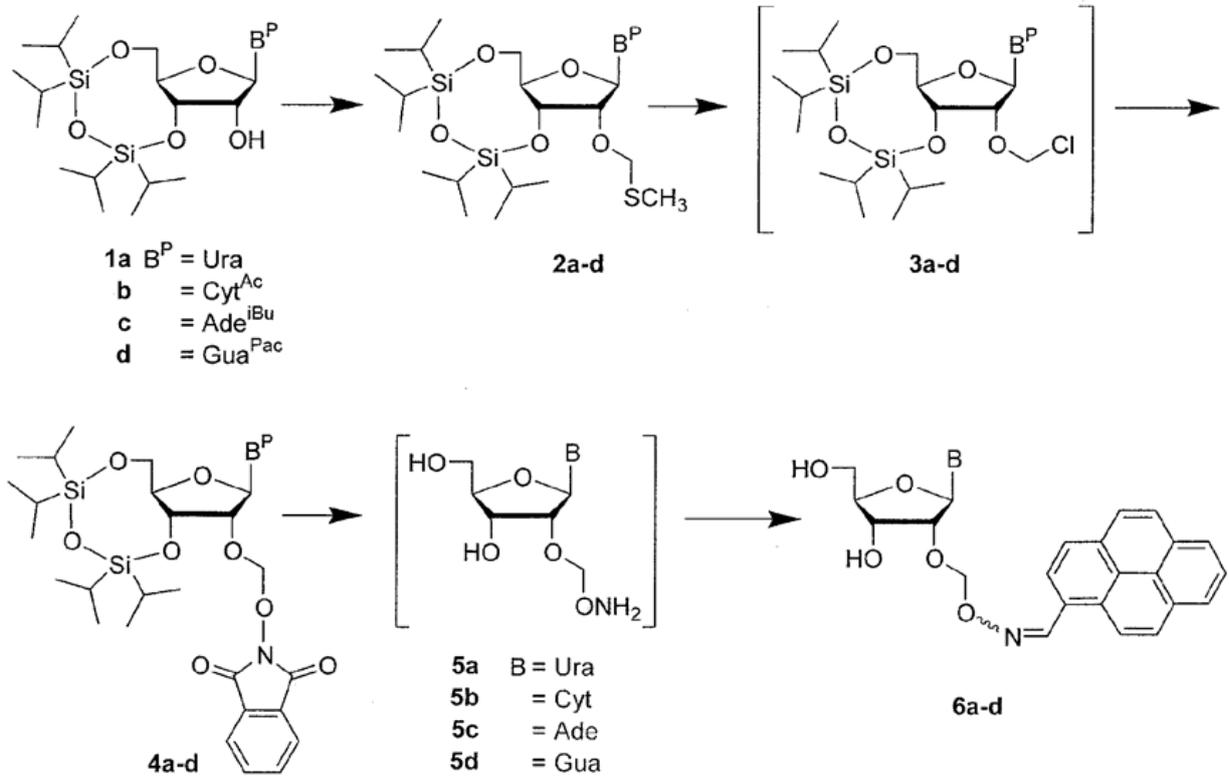


FIG. 1

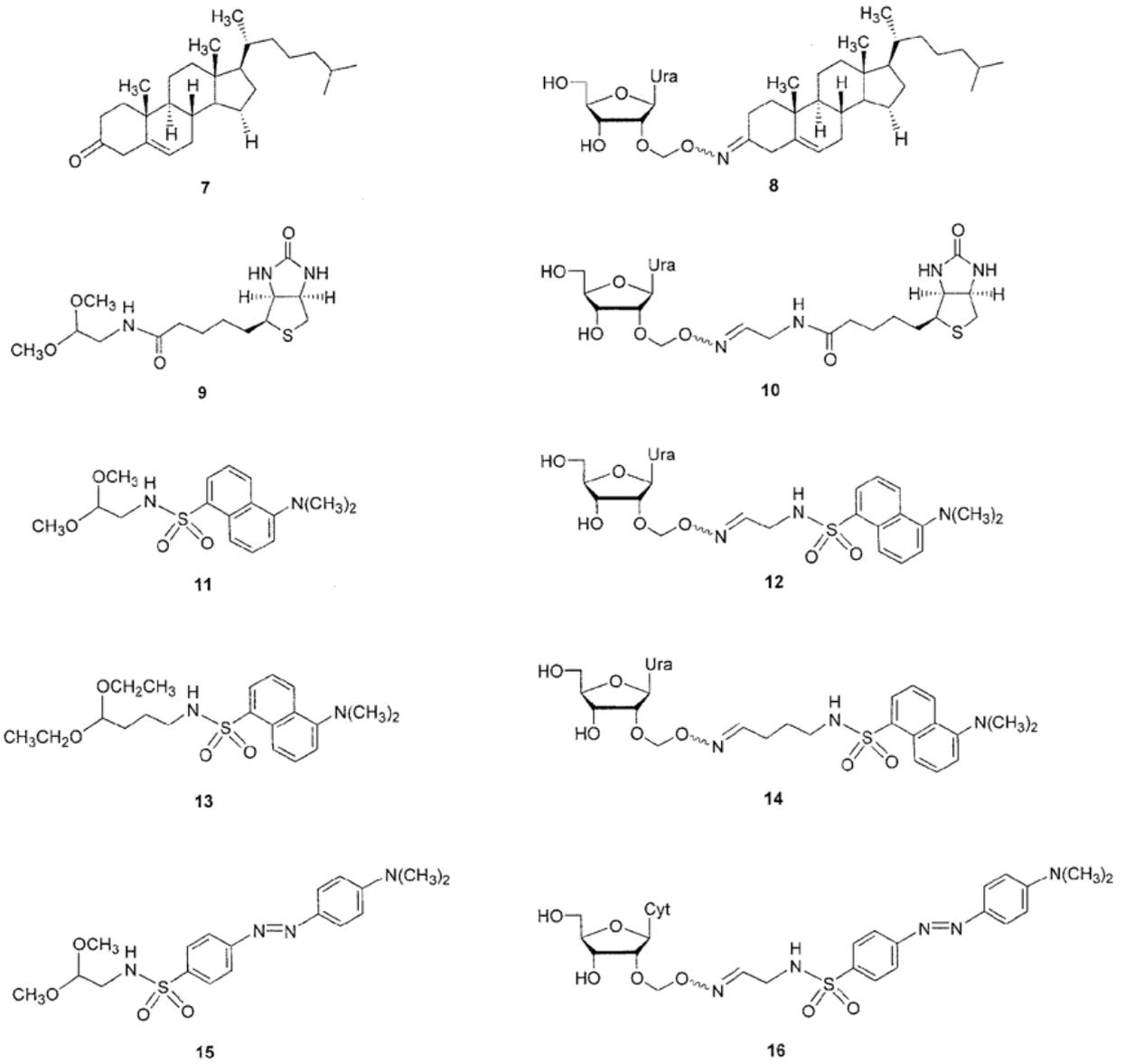


FIG. 2

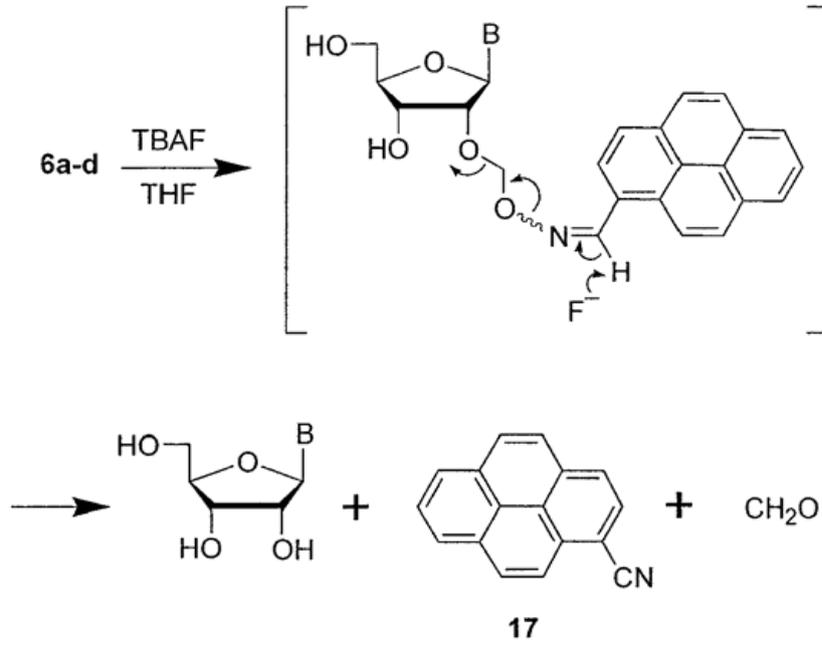


FIG. 3

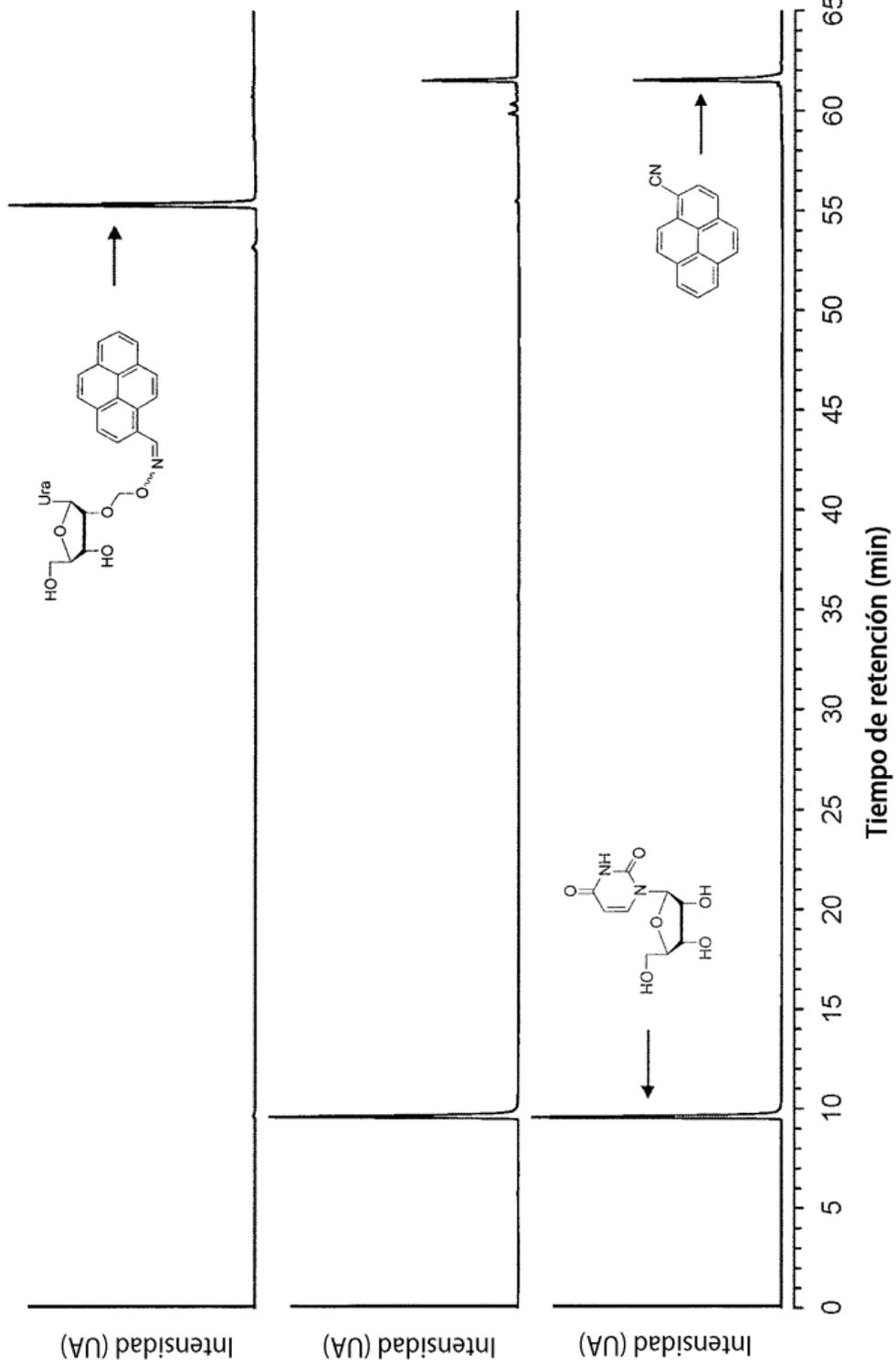


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

FIG. 5A

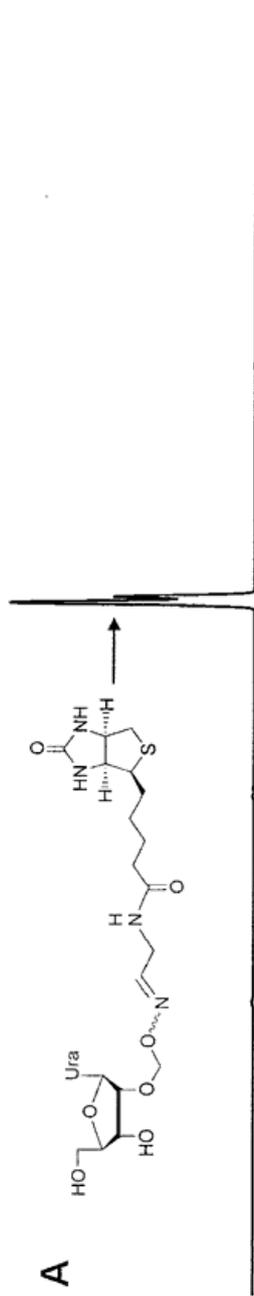
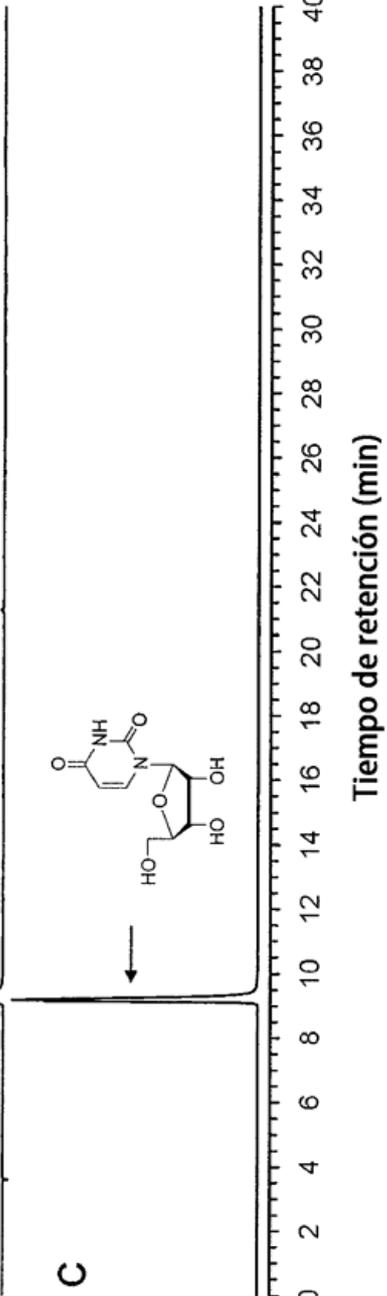


FIG. 5B



FIG. 5C



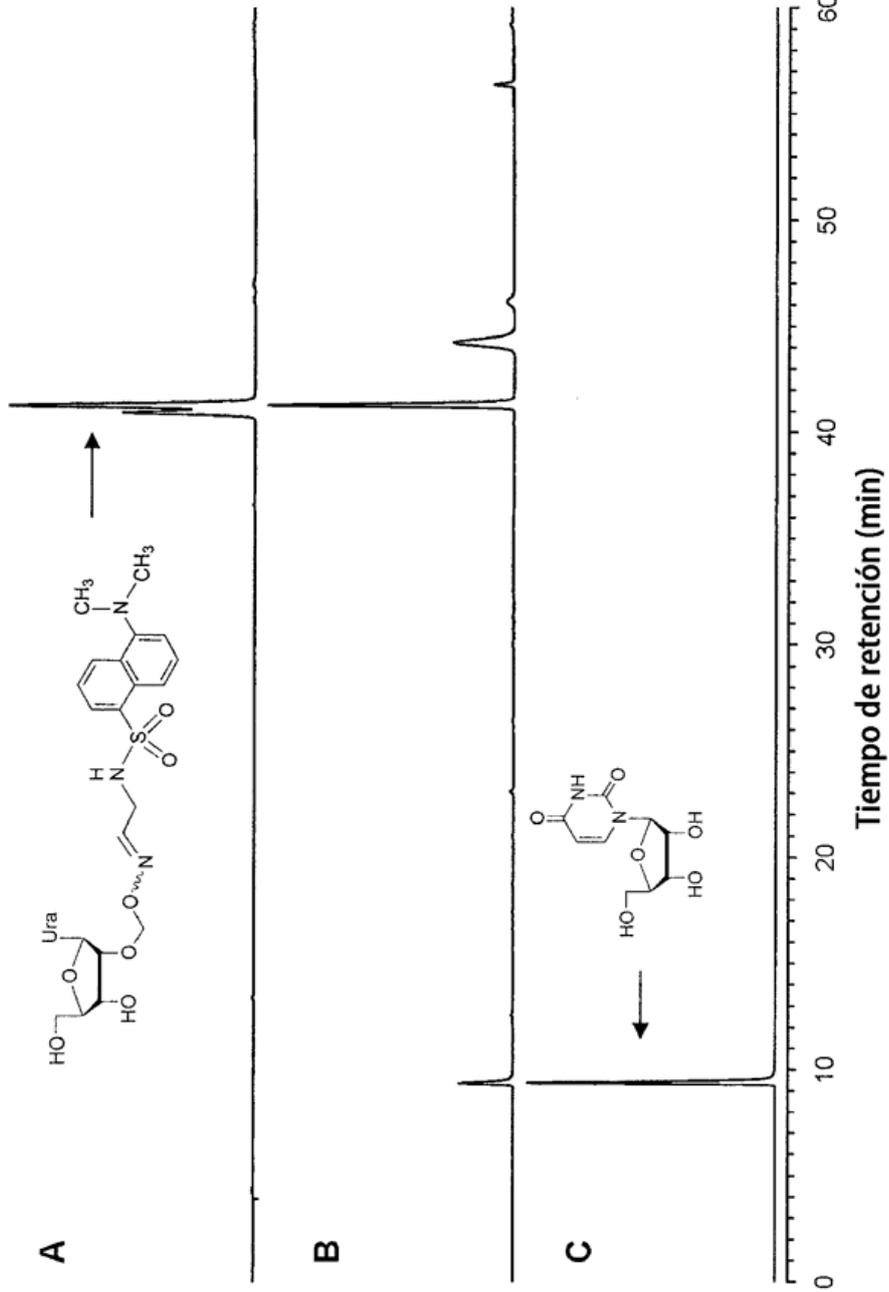


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

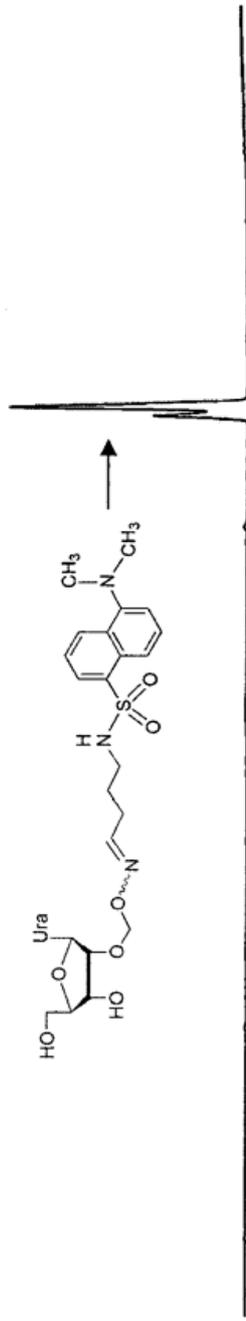


FIG. 7A



FIG. 7B

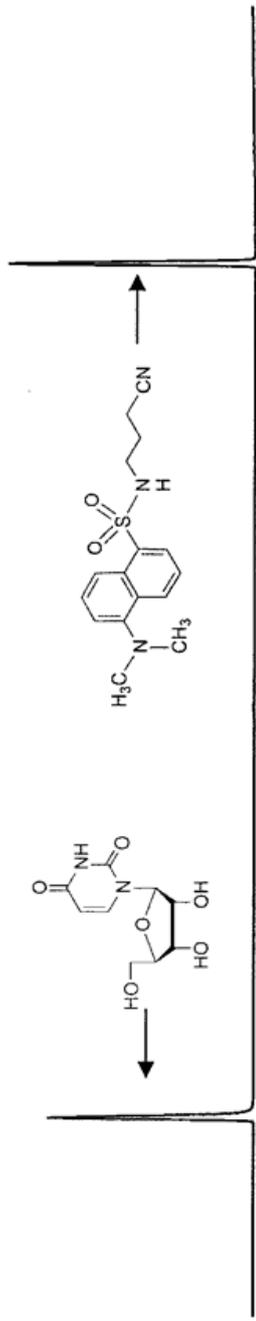
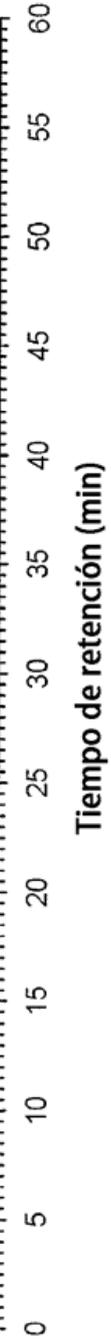


FIG. 7C



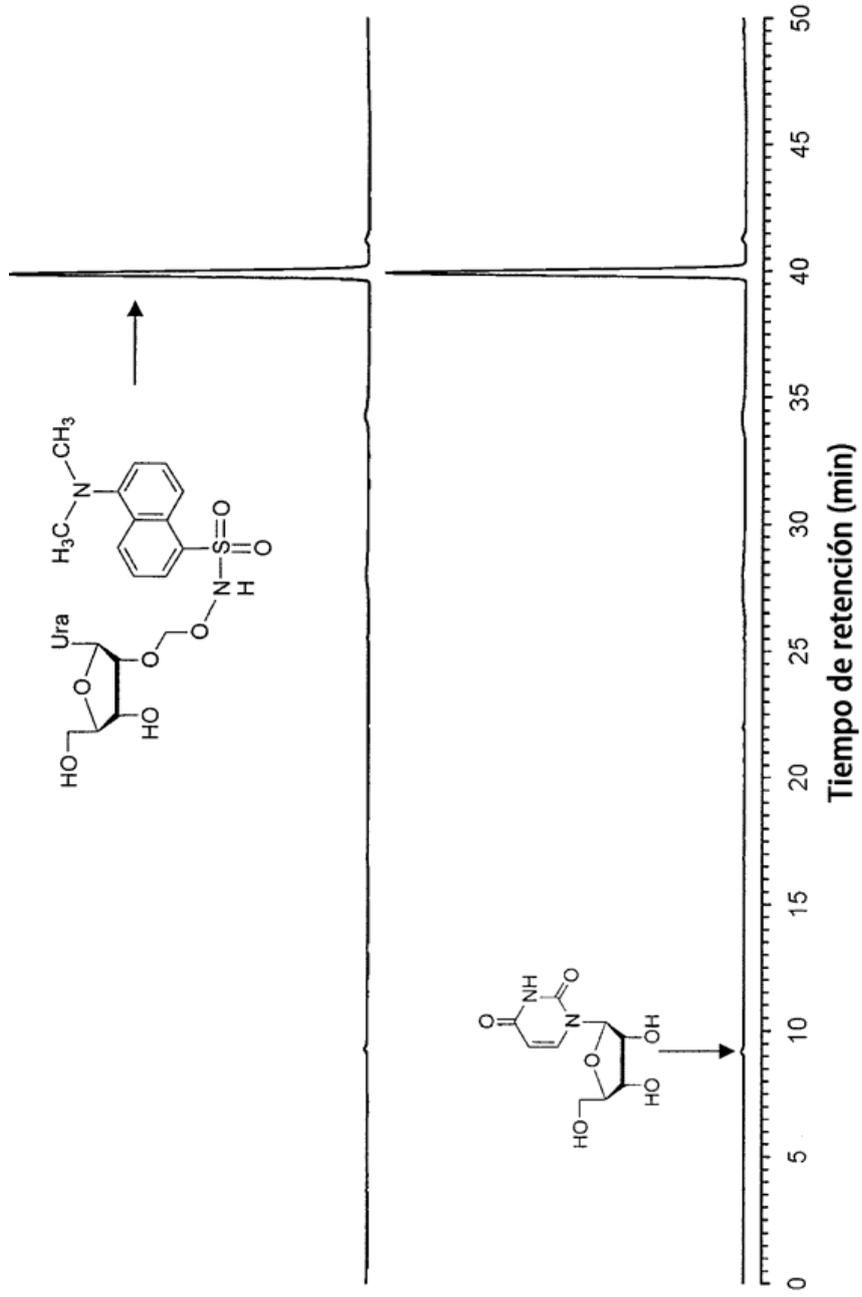


FIG. 8A

FIG. 8B

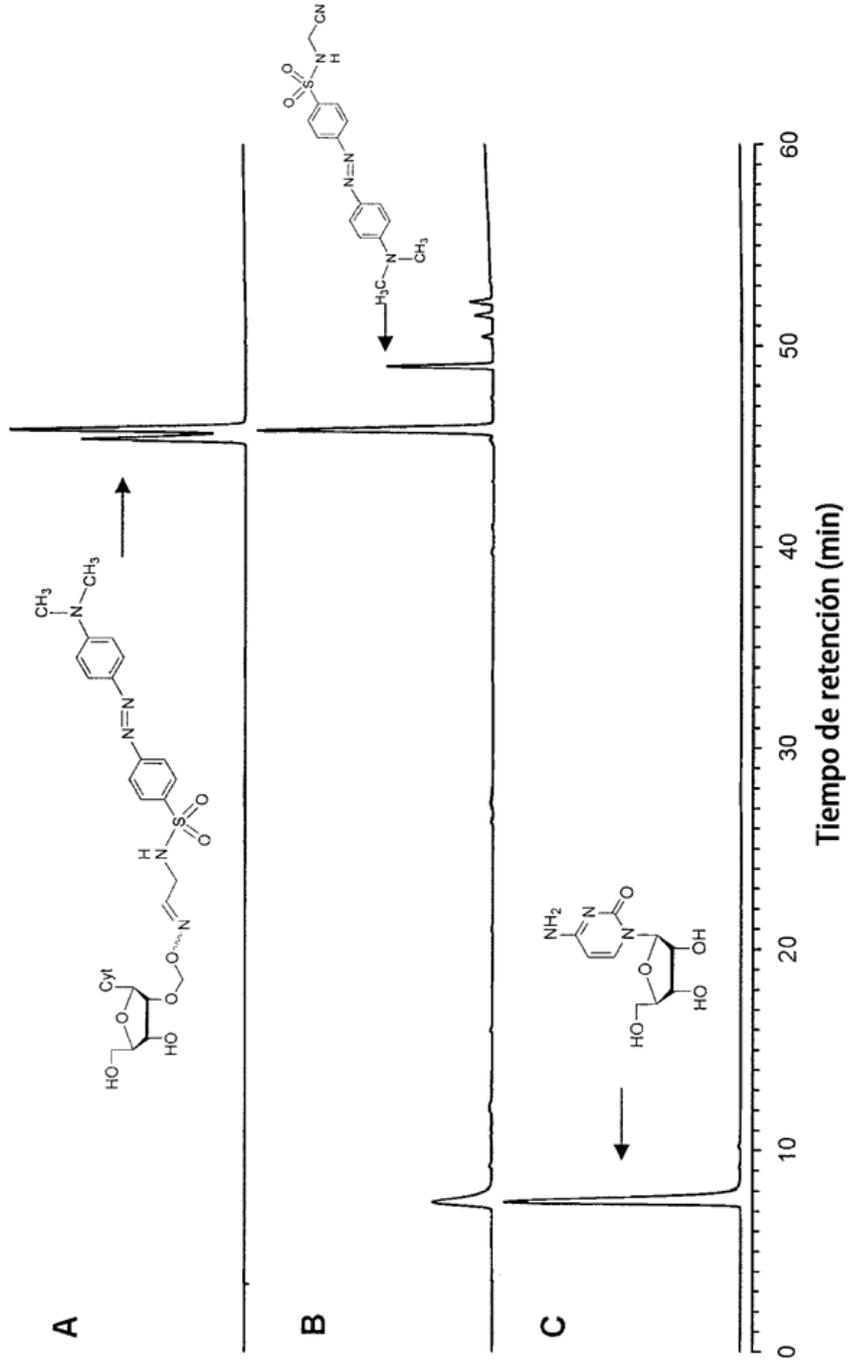


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C

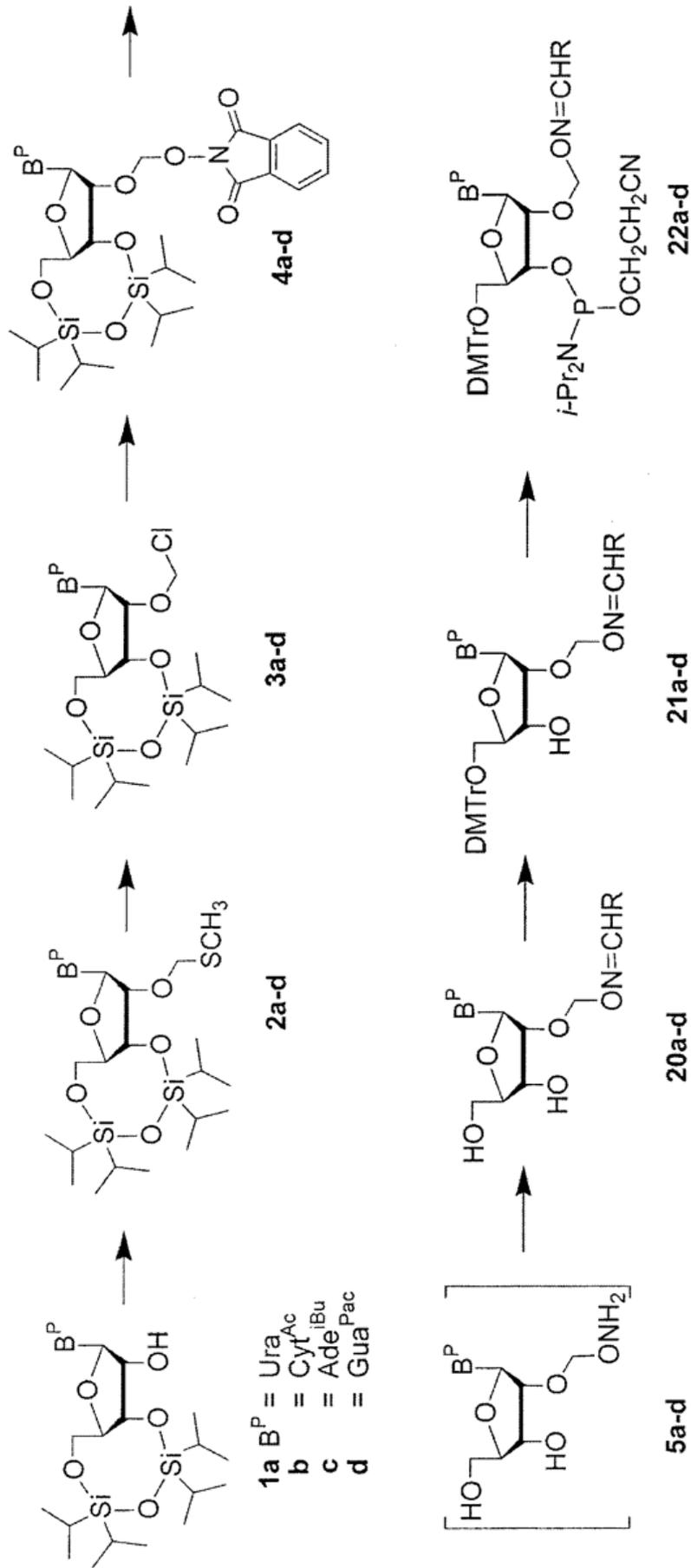


FIG. 10

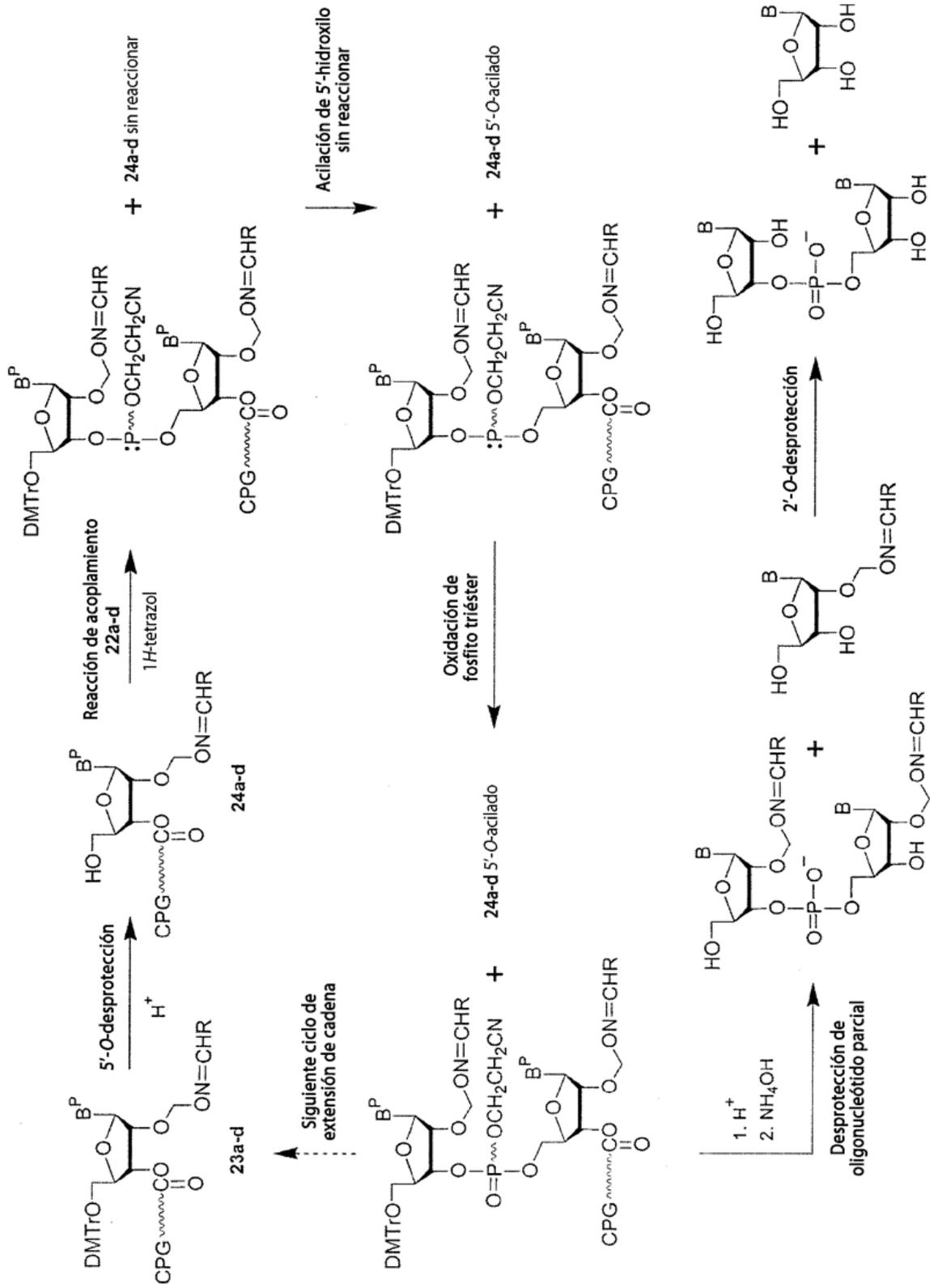


FIG. 11

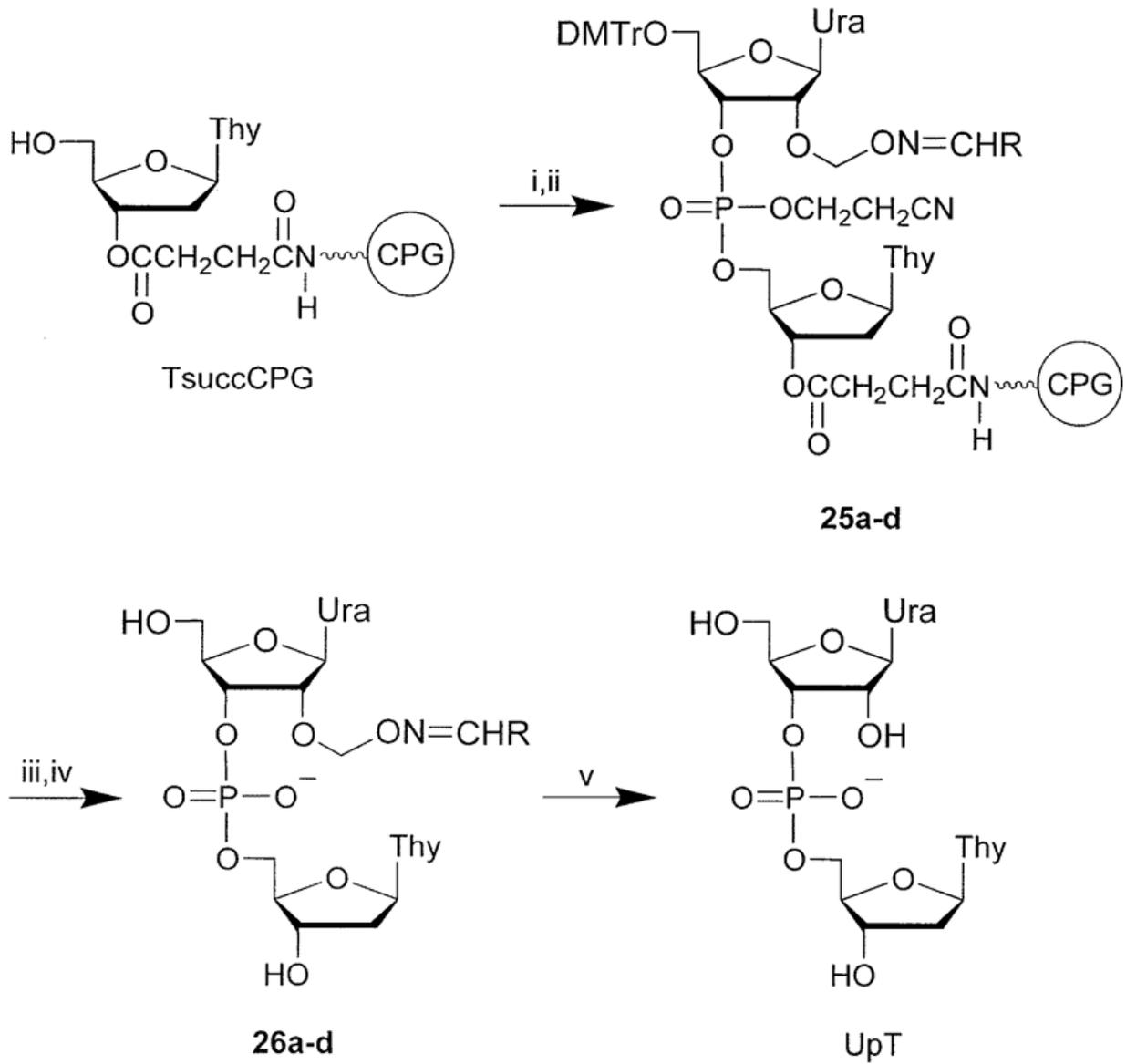
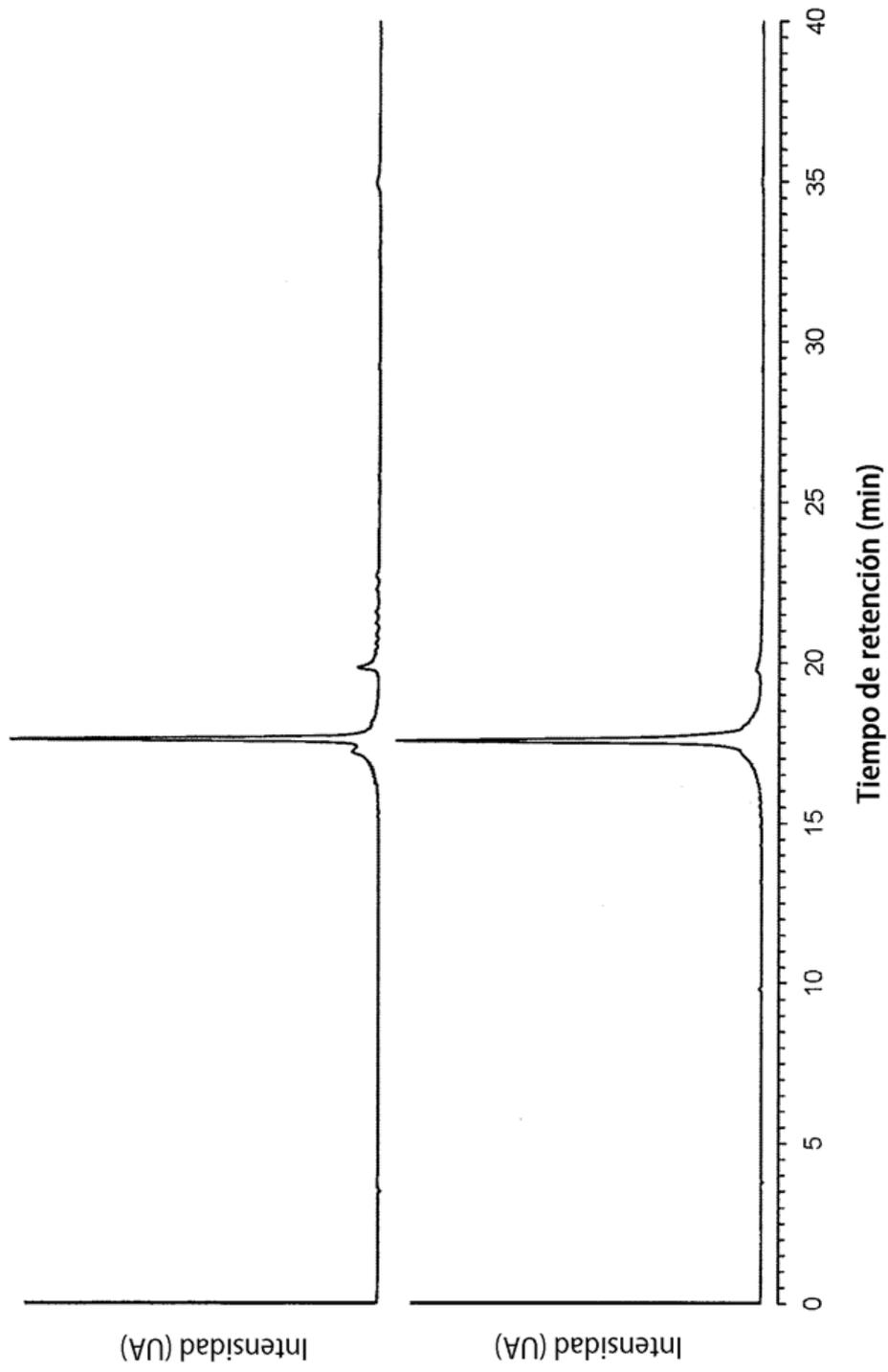


FIG. 12



**FIG. 13A**

**FIG. 13B**