

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 051**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/00** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2009 PCT/IB2009/007923**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO2010064146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09808955 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2370451**

54 Título: **Método para la síntesis de ácidos nucleicos modificados en el átomo de fósforo**

30 Prioridad:

**02.12.2008 US 119245 P**

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

**09.06.2017**

73 Titular/es:

**WAVE LIFE SCIENCES JAPAN, INC. (100.0%)  
2438 Miyanoura-cho, Kagoshima-shi  
Kagoshima 891-1394, JP**

72 Inventor/es:

**WADA, TAKESHI y  
SHIMIZU, MAMORU**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 616 051 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

Método para la síntesis de ácidos nucleicos modificados en el átomo de fósforo

5 **Campo de la invención**

En el presente documento se describen métodos de síntesis de ácidos nucleicos modificados en el átomo de fósforo que comprenden restos de X-fosfonato quirales. Los métodos descritos en el presente documento proporcionan ácidos nucleicos modificados en el esqueleto con una alta pureza diaestereomérica mediante una reacción asimétrica de una molécula aquiral que comprende un resto de H-fosfonato químicamente estable con un nucleósido/nucleótido.

**Antecedentes de la invención**

15 Los oligonucleótidos son útiles en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, de investigación y nuevas aplicaciones y en nanomateriales. El uso de secuencias naturales de ADN o ARN está limitado por su estabilidad a las nucleasas. Adicionalmente, estudios *in vitro* han mostrado que las propiedades de nucleótidos antisentido tales como afinidad de unión, unión específica de secuencia al ARN complementario, estabilidad a nucleasas, están afectados por las configuraciones de los átomos de fósforo. Por tanto, hay una necesidad en el campo de métodos de producción de oligonucleótidos que sean estereocontrolados en el fósforo y presenten estabilidad deseada a la degradación, mientras que retienen la afinidad por secuencias de ADN/ARN complementario exógeno o endógeno. Existe la necesidad de que estos compuestos sean fácilmente sintetizados sobre soporte sólido o en solución, y de permitir un amplio intervalo de modificaciones sintéticas en los azúcares o nucleobases del oligonucleótido.

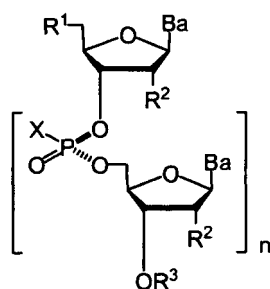
25 En el presente documento se describen síntesis estereocontroladas de ácidos nucleicos poliméricos y oligoméricos modificados en el átomo de fósforo, que en algunas realizaciones, se realiza sobre soporte sólido.

**Sumario de la invención**

30 Se describe un método para una síntesis de un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral, que comprende hacer reaccionar una molécula que comprende un resto de H-fosfonato aquiral y un nucleósido que comprende un resto 5'-OH para formar un producto intermedio condensado; y convertir el producto intermedio condensado en el ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral.

35 En algunas realizaciones, el método en el que la etapa de hacer reaccionar la molécula que comprende un resto de H-fosfonato aquiral y el nucleósido que comprende un resto 5'-OH para formar un producto intermedio condensado es una reacción de una sola etapa.

40 En algunas realizaciones, el método proporciona un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1.



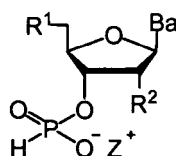
Fórmula 1

45 En algunas realizaciones del compuesto de fórmula 1, R<sup>1</sup> es -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>. Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se. R<sup>a</sup> es un resto de bloqueo. R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo. Cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>). Cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>2</sup>-, alquenil-Y<sup>2</sup>-, alquinil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-, o un catión que es Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>. Y<sup>2</sup> es O, NR<sup>d</sup> o S. Cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en el que R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo. Cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada. Cada caso de X es independientemente alquilo, alcoxilo, arilo, alquiltio, acilo, -NR<sup>f</sup>R<sup>f</sup>, alquenilo, alquinilo, alquenilo, alquiltio, alquiltio, -S-Z<sup>+</sup>, -Se-Z<sup>+</sup> o -BH<sub>3</sub>Z<sup>+</sup>. Cada caso de R<sup>f</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo. Z<sup>+</sup> es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico,

cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o Z es un ión metálico monovalente. R<sup>3</sup> es hidrógeno, un grupo de bloqueo, un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico; y n es un número entero de 1 a aproximadamente 200.

5 En algunas realizaciones del método, cada resto de X-fosfonato del compuesto de fórmula 1 tiene más del 98 % de pureza diaestereomérica como se ha determinado por espectroscopía de RMN <sup>31</sup>P o HPLC de fase inversa. En algunas realizaciones del método, cada resto de X-fosfonato tiene una configuración R<sub>P</sub>. En otras realizaciones del método, cada resto de X-fosfonato tiene independientemente una configuración R<sub>P</sub> o una configuración S<sub>P</sub>.

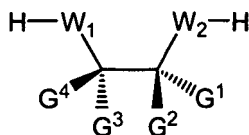
10 En realizaciones adicionales del método, la molécula que comprende un resto de H-fosfonato aquiral es un compuesto de fórmula 2.



15 **Fórmula 2**

En la fórmula 2, R<sup>1</sup> es -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alqueno-Y<sup>1</sup>-, alquino-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>. Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se. R<sup>a</sup> es un grupo de bloqueo. R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo. Cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>). Cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente alquilo, arilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>2</sup>-, alqueno-Y<sup>2</sup>-, alquino-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-. Y<sup>2</sup> es O, NR<sup>d</sup> o S. R<sup>2</sup> es hidrógeno, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alqueno-Y<sup>1</sup>-, alquino-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en el que R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo. Ba es una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada. Z<sup>+</sup> es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o un ión metálico monovalente.

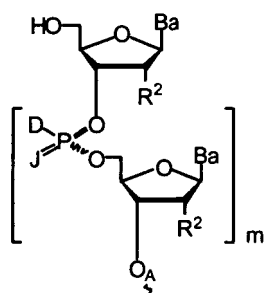
En algunas realizaciones del método, el método comprende además un reactivo quiral. En aún otras realizaciones del método, el reactivo quiral es un compuesto de fórmula 3.



30 **Fórmula 3**

W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son independientemente -NG<sup>5</sup>-, -O- o -S-. G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, hetarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup> que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en el que no más de cuatro de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup>.

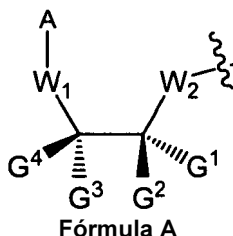
40 En algunas realizaciones del método, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un compuesto de fórmula 4.



45 **Fórmula 4**

Cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alqueno-Y<sup>1</sup>-, alquino-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en el que R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo. Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o

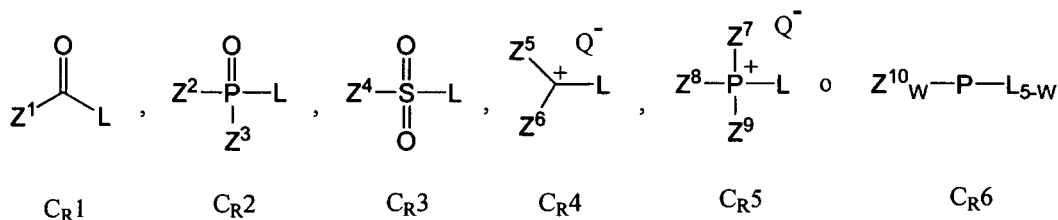
5 Se. R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo. Cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>). Cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente alquilo, arilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>2-</sup>, alquenoil-Y<sup>2-</sup>, alquinoil-Y<sup>2-</sup>, aril-Y<sup>2-</sup> o heteroaril-Y<sup>2-</sup>. Y<sup>2</sup> es O, NR<sup>d</sup> o S. Cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada. m es un número entero de 0 a n-1. n es un número entero de 1 a aproximadamente 200. O<sub>A</sub> está conectado a un resto de trilito, un resto de sililo, un resto de acetilo, un resto de acilo, un resto de arilacilo, un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico. J es O y D es H, o J es S, Se o BH<sub>3</sub> y D es un ligando quiral C<sub>i</sub> o un resto de fórmula A.



15 En la fórmula A, W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son independientemente NHG<sup>5</sup>, OH o SH. A es hidrógeno, acilo, arilo, alquilo, aralquilo, o un resto de sililo. G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocíclico, heteroarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup> que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en el que no más de cuatro de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup>.

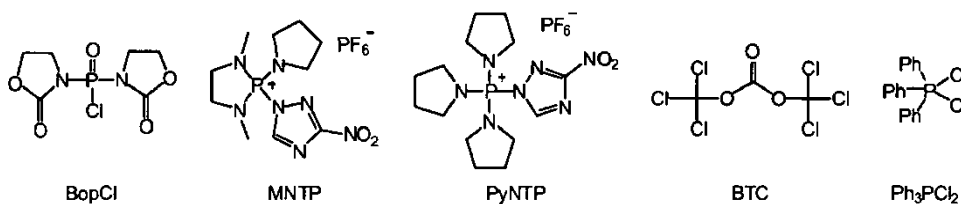
20 En aún otras realizaciones del método, el método comprende además proporcionar un reactivo de condensación C<sub>R</sub> por el que la molécula que comprende un resto de H-fosfonato aquiral se activa para reaccionar con el reactivo quiral para formar un producto intermedio quiral.

25 En realizaciones adicionales del método, el reactivo de condensación C<sub>R</sub> es Ar<sub>3</sub>PL<sub>2</sub>, (ArO)<sub>3</sub>PL<sub>2</sub>,

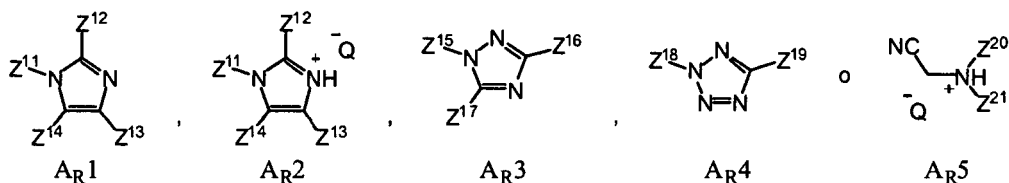


30 Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, Z<sup>3</sup>, Z<sup>4</sup>, Z<sup>5</sup>, Z<sup>6</sup>, Z<sup>7</sup>, Z<sup>8</sup>, Z<sup>9</sup> y Z<sup>10</sup> son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, arilo, heteroarilo, o en los que cualquiera de Z<sup>2</sup> y Z<sup>3</sup>, Z<sup>5</sup> y Z<sup>6</sup>, Z<sup>7</sup> y Z<sup>8</sup>, Z<sup>8</sup> y Z<sup>9</sup>, Z<sup>9</sup> y Z<sup>7</sup>, o Z<sup>7</sup> y Z<sup>8</sup> y Z<sup>9</sup>, se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 20 miembros. Q<sup>-</sup> es un contraión, L es un grupo saliente y w es un número entero de 0 a 3. Ar es arilo, heteroarilo, y/o uno del grupo Ar está unido al soporte de polímero. En algunas realizaciones del método, el contraión del reactivo de condensación C<sub>R</sub> es Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, TfO<sup>-</sup>, Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>, AsF<sub>6</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> o SbF<sub>6</sub><sup>-</sup>, en el Tf es CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>. En otras realizaciones del método, el grupo saliente del reactivo de condensación C<sub>R</sub> es F, Cl, Br, I, 3-nitro-1,2,4-triazol, imidazol, alquiltriazol, tetrazol, pentafluorobenceno o 1-hidroxibenzotriazol.

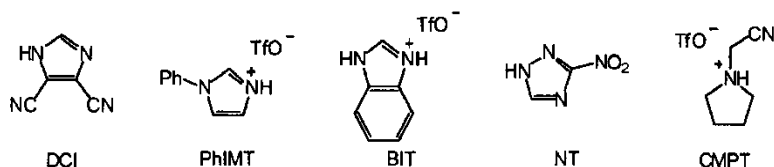
40 En algunas realizaciones del método, el reactivo de condensación es fosgeno, cloroformiato de triclorometilo, bis(triclorometil)carbonato (BTC), cloruro de oxalilo, Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>, (PhO)<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>, cloruro N,N'-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl), hexafluorofosfato de 1,3-dimetil-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-il)-2-pirrolidin-1-il-1,3,2-diazafosfolidinio (MNTP) o hexafluorofosfato de 3-nitro-1,2,4-triazol-1-il-tris(pirrolidin-1-il)fosfonio (PyNTP).



45 En otra realización del método, el método comprende además proporcionar un reactivo de activación A<sub>R</sub>. En una realización, el reactivo de activación A<sub>R</sub> es

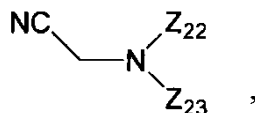


en el que Z<sup>11</sup>, Z<sup>12</sup>, Z<sup>13</sup>, Z<sup>14</sup>, Z<sup>15</sup>, Z<sup>16</sup>, Z<sup>17</sup>, Z<sup>18</sup>, Z<sup>19</sup>, Z<sup>20</sup> y Z<sup>21</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, arilo, alquilo, arilo o heteroarilo, o en el que cualquiera de Z<sup>11</sup> y Z<sup>12</sup>, Z<sup>11</sup> y Z<sup>13</sup>, Z<sup>11</sup> y Z<sup>14</sup>, Z<sup>12</sup> y Z<sup>13</sup>, Z<sup>12</sup> y Z<sup>14</sup>, Z<sup>13</sup> y Z<sup>14</sup>, Z<sup>15</sup> y Z<sup>16</sup>, Z<sup>15</sup> y Z<sup>17</sup>, Z<sup>16</sup> y Z<sup>17</sup>, Z<sup>18</sup> y Z<sup>19</sup>, o Z<sup>20</sup> y Z<sup>21</sup>, se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 20 miembros, o para formar un anillo aromático de 5 o 20 miembros; y Q<sup>-</sup> es un contraión. En una realización, el contraión del reactivo de activación A<sub>R</sub> es Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, TfO<sup>-</sup>, Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>, AsF<sub>6</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> o SbF<sub>6</sub><sup>-</sup>, en el que Tf es CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>. En una realización, el reactivo de activación A<sub>R</sub> es imidazol, 4,5-dicianoimidazol (DCI), 4,5-dicloroimidazol, triflato de 1-fenilimidazolio (PhIMT), triflato de bencimidazolio (BIT), benzotriazol, 3-nitro-1,2,4-triazol (NT), tetrazol, 5-etiltiotetrazol, 5-(4-nitrofenil)tetrazol, triflato de N-cianometilpirrolidinio (CMPT), triflato de N-cianometilpiperidinio, triflato de N-cianometildimetilamonio. En otra realización, el reactivo de activación A<sub>R</sub> es 4,5-dicianoimidazol (DCI), triflato de 1-fenilimidazolio (PhIMT), triflato de bencimidazolio (BIT), 3-nitro-1,2,4-triazol (NT), tetrazol o triflato de N-cianometilpirrolidinio (CMPT).



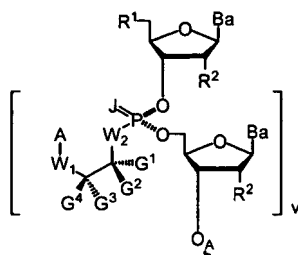
En una realización, el reactivo de activación A<sub>R</sub> es triflato de N-cianometilpirrolidinio (CMPT).

En algunas realizaciones del método, la reacción se realiza en un disolvente orgánico aprótico. En otras realizaciones del método, el disolvente es acetonitrilo, piridina, tetrahidrofurano o diclorometano. En otras realizaciones del método, cuando el disolvente orgánico aprótico no es básico, está presente una base en la etapa de reacción. En algunas realizaciones del método, la base es piridina, quinolina o N,N-dimetilanilina. En algunas realizaciones del método, la base es



en la que Z<sup>22</sup> y Z<sup>23</sup> son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, arilo, alquilo, arilo o heteroarilo, o en la que cualquiera de Z<sup>22</sup> y Z<sup>23</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 10 miembros. En algunas realizaciones del método, la base es N-cianometilpirrolidina. En algunas realizaciones del método, el disolvente orgánico aprótico es anhidro. En otras realizaciones del método, el disolvente orgánico aprótico anhidro se acaba de destilar. En aún otras realizaciones del método, el disolvente orgánico aprótico anhidro que se acaba de destilar es piridina. En otra realización del método, el disolvente orgánico aprótico anhidro que se acaba de destilar es acetonitrilo.

En algunas realizaciones del método, la etapa de convertir el producto intermedio condensado en un compuesto de fórmula 1 comprende: modificar el producto intermedio condensado para producir un compuesto de fórmula 5.

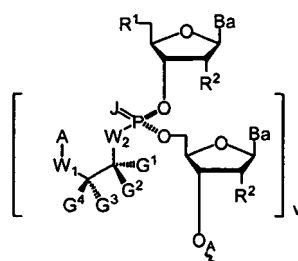


Fórmula 5

En la fórmula 5, R<sup>1</sup> es -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquilo-Y<sup>1</sup>-, alqueno-Y<sup>1</sup>-, alquino-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>. Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se. R<sup>a</sup> es un resto de bloqueo. R<sup>c</sup>

es un grupo de bloqueo. Cada caso de  $R^d$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato,  $-P(O)(R^e)_2$  o  $-HP(O)(R^e)$ . Cada caso de  $R^e$  es independientemente alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^2$ -, alquenil- $Y^2$ -, alquinil- $Y^2$ -, aril- $Y^2$ - o heteroaril- $Y^2$ -.  $Y^2$  es O,  $NR^d$  o S. Cada caso de  $R^2$  es independientemente hidrógeno,  $-NR^dR^d$ ,  $N_3$ , halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$ -,  $-OR^b$  o  $-SR^c$ , en el que  $R^b$  es un resto de bloqueo. Cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo, o nucleobase modificada. Cada caso de J es S, Se o  $BH_3$ . v es un número entero de 1.  $O_A$  está conectado a un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico. A es un resto de acilo, arilo, alquilo, aralquilo o de sililo.  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heteroarilo o arilo, o dos de  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$  que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en el que no más de cuatro de  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$ .

En algunas realizaciones del método, la etapa de convertir el producto intermedio condensado en un compuesto de fórmula 1 comprende: terminar el producto intermedio condensado y modificar el producto intermedio condensado terminado para producir un compuesto de fórmula 5.



Fórmula 5

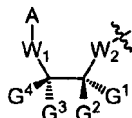
En la fórmula 5,  $R^1$  es  $-NR^dR^d$ ,  $-N_3$ , halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$ -,  $-P(O)(R^e)_2$ ,  $-HP(O)(R^e)$ ,  $-OR^a$  o  $-SR^c$ .  $Y^1$  es O,  $NR^d$ , S o Se.  $R^a$  es un resto de bloqueo.  $R^c$  es un grupo de bloqueo. Cada caso de  $R^d$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato,  $-P(O)(R^e)_2$  o  $-HP(O)(R^e)$ . Cada caso de  $R^e$  es independientemente alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^2$ -, alquenil- $Y^2$ -, alquinil- $Y^2$ -, aril- $Y^2$ - o heteroaril- $Y^2$ -.  $Y^2$  es O,  $NR^d$  o S. Cada caso de  $R^2$  es independientemente hidrógeno,  $-NR^dR^d$ ,  $N_3$ , halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$ -,  $-OR^b$  o  $-SR^c$ , en el que  $R^b$  es un resto de bloqueo. Cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada. Cada caso de J es S, Se o  $BH_3$ . v es un número entero de 2 a n-1.  $O_A$  está conectado a un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico. A es un resto de acilo, arilo, alquilo, aralquilo o de sililo.  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heteroarilo o arilo, o dos de  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$  que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en el que no más de cuatro de  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$ .

En algunas realizaciones del método, el método comprende además las etapas de: (a) desbloquear  $R^1$  del compuesto de fórmula 5 para producir un compuesto de fórmula 4 en la que m es al menos 1, J es S, Se o  $BH_3$  y D es un resto de fórmula A; (b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula 4 usando el método de la reivindicación 10 en la que la etapa de convertir el producto intermedio condensado comprende terminar el producto intermedio condensado y modificar el producto intermedio condensado terminado para producir un compuesto de fórmula 5 en la que v es mayor de 2 y menor de aproximadamente 200; y (c) opcionalmente repetir las etapas (a) y (b) para formar un compuesto de fórmula 5 en la que v es mayor de 3 y menor de aproximadamente 200.

En otras realizaciones del método, el método comprende además la etapa de convertir el compuesto de fórmula 5 en el compuesto de fórmula 1 en la que cada resto Ba no está bloqueado.  $R^1$  es  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-NR^dR^d$ ,  $-N_3$ , halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$ -,  $-P(O)(R^e)_2$ ,  $-HP(O)(R^e)$ ,  $-OR^a$  o  $-SR^c$ .  $Y^1$  es O,  $NR^d$ , S o Se.  $R^a$  es un resto de bloqueo.  $R^c$  es un grupo de bloqueo. Cada caso de  $R^d$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato,  $-P(O)(R^e)_2$  o  $-HP(O)(R^e)$ . Cada caso de  $R^e$  es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^2$ -, alquenil- $Y^2$ -, alquinil- $Y^2$ -, aril- $Y^2$ - o heteroaril- $Y^2$ -, o un catión que es  $Na^+$ ,  $Li^+$  o  $K^+$ .  $Y^2$  es O,  $NR^d$  o S. Cada caso de  $R^2$  es independientemente hidrógeno,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-NR^dR^d$ ,  $-N_3$ , halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$ -,  $-OR^b$  o  $-SR^c$ , en el que  $R^b$  es un resto de bloqueo.  $R^3$  es H. Cada caso de X es independientemente  $-S^+Z^+$ ,  $-Se^+Z^+$  o  $-BH_3^+Z^+$ .  $Z^+$  es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o Z es un ión metálico monovalente.

En algunas realizaciones del método, la etapa de convertir el producto intermedio condensado en un compuesto de fórmula 1 comprende acidificar el producto intermedio condensado para producir un compuesto de fórmula 4, en la que m es al menos uno, J es O, y D es H. En algunas realizaciones del método, el producto intermedio condensado comprende un resto de fórmula A'.

5



Fórmula A'

10 A es hidrógeno y G<sup>1</sup> y G<sup>2</sup> son independientemente alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo o arilo y G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heteroarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup> que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en el que no más de cuatro de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup>.

15

En algunas realizaciones del método, el método comprende además: (a) hacer reaccionar el compuesto de fórmula 4 en la que m es al menos uno, J es O, y D es H, usando el método de la reivindicación 10 en el que la etapa de convertir el producto intermedio condensado en un compuesto de fórmula 1 comprende acidificar el producto intermedio condensado para producir un compuesto de fórmula 4 en la que m es al menos 2 y menor de aproximadamente 200; J es O, y D es H, y (b) opcionalmente repetir la etapa (a) para producir un compuesto de fórmula 4 en la que m es mayor de 2 y menor de aproximadamente 200.

20

En algunas realizaciones del método, la acidificación comprende añadir una cantidad de un ácido de Brønsted o de Lewis eficaz para convertir el producto intermedio condensado en el compuesto de fórmula 4 sin eliminar los restos de purina o pirimidina del producto intermedio condensado. En otras realizaciones del método, la acidificación comprende añadir 1 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico, 3 % de ácido dicloroacético en un disolvente orgánico, o 3 % de ácido tricloroacético en un disolvente orgánico. En aún otras realizaciones del método, la acidificación comprende además añadir un secuestrante de cationes. En algunas realizaciones del método, el secuestrante de cationes es trietilsilano o triisopropilsilano.

25

En algunas realizaciones del método, la etapa de convertir el producto intermedio condensado en un compuesto de fórmula 1 comprende además desbloquear R<sup>1</sup> antes de la etapa de acidificar el producto intermedio condensado.

30

En otras realizaciones del método, el método comprende además la etapa de modificar el compuesto de fórmula 4 para introducir un resto X produciendo así un compuesto de fórmula 1 en la que R<sup>3</sup> es un grupo de bloqueo o un resto de enlace conectado a un soporte sólido.

35

En aún otras realizaciones del método, el método comprende además tratar un compuesto modificado con X para producir un compuesto de fórmula 1 en la que R<sup>1</sup> es -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alqueniil-Y<sup>1</sup>-, alquiniil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>. Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se. R<sup>a</sup> es un resto de bloqueo. R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo. Cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>). Cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, alquenoilo, alquinilo, alquil-Y<sup>2</sup>-, alqueniil-Y<sup>2</sup>-, alquiniil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-, o un catión que es Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>. Y<sup>2</sup> es O, NR<sup>d</sup> o S. Cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alqueniil-Y<sup>1</sup>-, alquiniil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en el que R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo. Cada resto Ba no está bloqueado. R<sup>3</sup> es H. Cada caso de X es independientemente alquilo, alcoxi, arilo, alquiltio, acilo, -NR<sup>f</sup>R<sup>f</sup>, alqueniiloxi, alquiniiloxi, alqueniiltio, alquiniiltio, -S-Z<sup>+</sup>, -Se-Z<sup>+</sup> o -BH<sub>3</sub>-Z<sup>+</sup>. Cada caso de R<sup>f</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo o arilo. Z<sup>+</sup> es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o Z es un ión metálico monovalente. n es mayor de 1 y menor de aproximadamente 200.

40

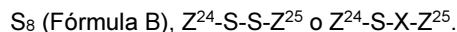
45

En algunas realizaciones del método, la etapa de modificación se realiza usando un agente de boración, un electrófilo de azufre o un electrófilo de selenio.

50

En algunas realizaciones del método, el electrófilo de azufre es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:

55



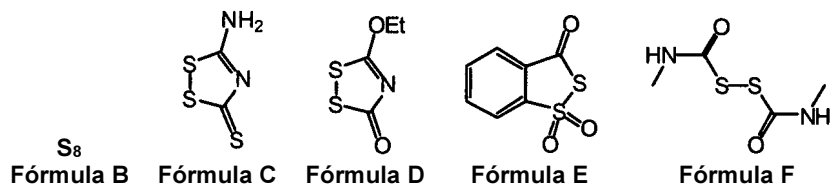
60

Z<sup>24</sup> y Z<sup>25</sup> son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o Z<sup>24</sup> y Z<sup>25</sup> se

toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir; X es SO<sub>2</sub>, O o NR<sup>f</sup>; y R<sup>f</sup> es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo o arilo.

En algunas realizaciones del método, el electrófilo de azufre es un compuesto de fórmula B, C, D, E o F:

5



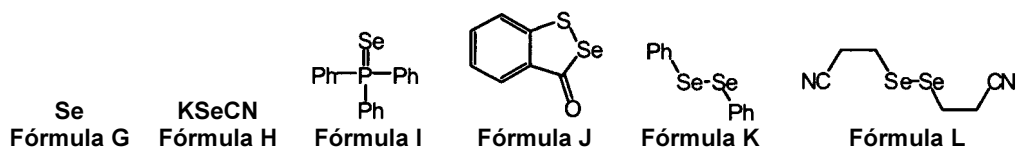
En algunas realizaciones del método, el electrófilo de selenio es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:

10      Se (Fórmula G), Z<sup>26</sup>-Se-Se-Z<sup>27</sup> o Z<sup>26</sup>-Se-X-Z<sup>27</sup>

Z<sup>26</sup> y Z<sup>27</sup> son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o Z<sup>26</sup> y Z<sup>27</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir; X es SO<sub>2</sub>, S, O o NR<sup>f</sup>; y R<sup>f</sup> es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo o arilo.

15

En algunas realizaciones del método, el electrófilo de selenio es un compuesto de fórmula G, H, I, J, K o L.



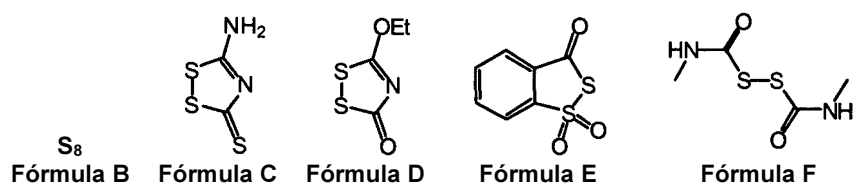
20      En algunas realizaciones del método, el agente de boración es borano-*N,N*-diisopropiletilamina (BH<sub>3</sub>·DIPEA), borano-piridina (BH<sub>3</sub>·Py) borano-2-cloropiridina (BH<sub>3</sub>·CPy), borano-anilina (BH<sub>3</sub>·An), borano-tetrahidrofurano (BH<sub>3</sub>·THF) o borano-sulfuro de dimetilo (BH<sub>3</sub>·Me<sub>2</sub>S).

25      En algunas realizaciones del método, la etapa de modificación se realiza usando un reactivo de sililación, seguido de un electrófilo de azufre, un electrófilo de selenio, un agente de boración, un agente alquilante, un aldehído o un agente acilante.

30      En algunas realizaciones del método, el reactivo de sililación es clorotrimetilsilano (TMS-Cl), cloruro de triisopropilsililo (TIPS-Cl), cloruro de *t*-butildimetilsililo (TBDMS-Cl), cloruro de *t*-butildifenilsililo (TBDPS-Cl), 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS), *N*-trimetilsilildimetilamina (TMSDMA), *N*-trimetilsilildietilamina (TMSDEA), *N*-trimetilsililacetamida (TMSA), *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) o *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).

35      En algunas realizaciones del método, el electrófilo de azufre es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas: S<sub>8</sub> (Fórmula B), Z<sup>24</sup>-S-S-Z<sup>25</sup> o Z<sup>24</sup>-S-X-Z<sup>25</sup>, en las que Z<sup>24</sup> y Z<sup>25</sup> son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o Z<sup>24</sup> y Z<sup>25</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir; X es SO<sub>2</sub>, O o NR<sup>f</sup>; y R<sup>f</sup> es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo o arilo.

40      En algunas realizaciones del método, el electrófilo de azufre es un compuesto de fórmula B, C, D, E o F:

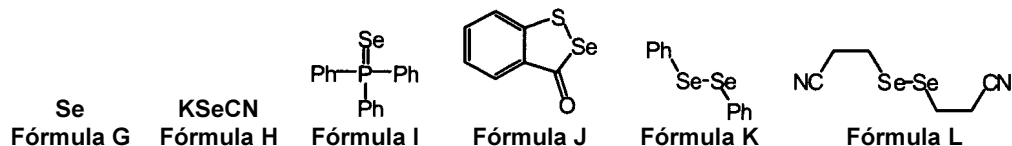


45      En algunas realizaciones del método, el electrófilo de selenio es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas: Se (Fórmula G), Z<sup>26</sup>-Se-Se-Z<sup>27</sup> o Z<sup>26</sup>-Se-X-Z<sup>27</sup>, en las que Z<sup>26</sup> y Z<sup>27</sup> son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o Z<sup>26</sup> y Z<sup>27</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir; X es SO<sub>2</sub>, S, O o NR<sup>f</sup>; y R<sup>f</sup> es hidrógeno,



alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo.

En algunas realizaciones del método, el electrófilo de selenio es un compuesto de fórmula G, H, I, J, K o L:



5 En algunas realizaciones del método, el agente de boración es borano-*N,N*-diisopropiletilamina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{DIPEA}$ ), borano-piridina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{Py}$ ), borano-2-cloropiridina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{CPy}$ ), borano-anilina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{An}$ ), borano-tetrahidrofurano ( $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ ) o borano-sulfuro de dimetilo ( $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ ).

10 En algunas realizaciones del método, el agente alquilante es un haluro de alquilo, haluro de alqueniilo, haluro de alquinilo, sulfonato de alquilo, sulfonato de alqueniilo o sulfonato de alquinilo. En otras realizaciones del método, el aldehído es (*para*)-formaldehído, alquilaldehído, alqueniilaldehído, alquinilaldehído o arilaldehído.

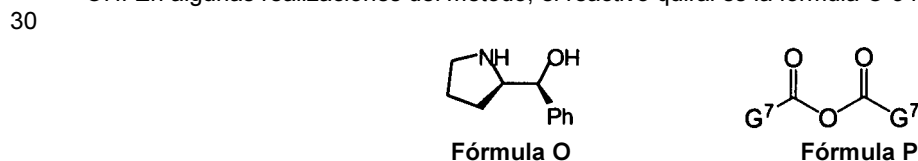
15 En algunas realizaciones del método, el agente acilante es un compuesto de fórmula M o N.



$G^7$  es alquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi o heteroariloxi; y M es F, Cl, Br, I, 3-nitro-1,2,4-triazol, imidazol, alquiltriazol, tetrazol, pentafluorobenceno o 1-hidroxibenzotriazol.

20 En algunas realizaciones del método, la etapa de modificación se realiza haciendo reaccionar con un reactivo de halogenación, seguido de hacer reaccionar con un nucleófilo. En algunas realizaciones del método, el reactivo de halogenación es  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{I}_2$ , cloruro de sulfurilo ( $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ), fosgeno, bis(triclorometil)carbonato (BTC), monocloruro de azufre, dicloruro de azufre, cloramina,  $\text{CuCl}_2$ , *N*-clorosuccinimida (NCS),  $\text{Cl}_4$ , *N*-bromosuccinimida (NBS) o *N*-yodosuccinimida (NIS). En otras realizaciones del método, el nucleófilo es  $\text{NR}^f\text{R}^f\text{H}$ ,  $\text{R}^f\text{OH}$  o  $\text{R}^f\text{SH}$ , en el que  $\text{R}^f$  es hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo, y al menos uno de  $\text{R}^f$  de  $\text{NR}^f\text{R}^f\text{H}$  no es hidrógeno.

25 En algunas realizaciones del método, el reactivo quiral es el compuesto de fórmula 3 en la que  $W_1$  es  $\text{NHG}^5$  y  $W_2$  es OH. En algunas realizaciones del método, el reactivo quiral es la fórmula O o la fórmula P.



30 En algunas realizaciones del método, el reactivo quiral es la fórmula Q o la fórmula R.



35 En algunas realizaciones del método,  $\text{R}^a$  es tritilo sustituido o sin sustituir o sililo sustituido. En otras realizaciones del método, en las que  $\text{R}^a$  es tritilo sustituido o sin sustituir o sililo sustituido. En otras realizaciones del método,  $\text{R}^b$  es tritilo sustituido o sin sustituir, sililo sustituido, acetilo, acilo o éter metílico sustituido.

40 En algunas realizaciones del método,  $\text{R}^3$  es un grupo de bloqueo que es tritilo sustituido, acilo, sililo sustituido o bencilo sustituido. En otras realizaciones del método,  $\text{R}^3$  es un resto de enlace conectado a un soporte sólido.

45 En algunas realizaciones del método, el grupo de bloqueo del resto Ba es un resto de bencilo, acilo, formilo, dialquilformamidinilo, isobutirilo, fenoxiacetilo o tritilo, cualquiera de los cuales puede estar sin sustituir o sustituido. En algunas realizaciones del método,  $\text{R}^1$  es  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{NR}^d\text{R}^d$ , alquiniloxi o  $-\text{OH}$ . En algunas realizaciones del método,  $\text{R}^1$  es  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{NR}^d\text{R}^d$ , alquiniloxi o  $-\text{OH}$ . En otras realizaciones del método,  $\text{R}^2$  es  $-\text{NR}^d\text{R}^d$ , alquilo, alqueniilo, alquinilo, alquil- $\text{Y}^1$ -, alqueniil- $\text{Y}^1$ -, alquinil- $\text{Y}^1$ -, aril- $\text{Y}^1$ - o heteroaril- $\text{Y}^1$ -, y está sustituido con restos fluorescentes o de unión a

biomolécula. En aún otras realizaciones del método,  $R^2$  es -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenoil-Y<sup>1</sup>-, alquinoil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>- o heteroaril-Y<sup>1</sup>-, y está sustituido con restos fluorescentes o de unión a biomolécula.

5 En algunas realizaciones del método, el sustituyente en  $R^2$  es un resto fluorescente. En otras realizaciones del método, el sustituyente en  $R^2$  es biotina o avidina. En aún otras realizaciones del método, el sustituyente en  $R^2$  es un resto fluorescente. En algunas realizaciones del método, el sustituyente en  $R^2$  es biotina o avidina. En otras realizaciones del método,  $R^2$  es -OH, -N<sub>3</sub>, hidrógeno, halógeno, alcoxi o alquiloxi. En aún otras realizaciones del método,  $R^2$  es -OH, -N<sub>3</sub>, hidrógeno, halógeno, alcoxi o alquiloxi.

10 En algunas realizaciones del método, Ba es 5-bromouracilo, 5-yodouracilo o 2, 6-diaminopurina. En otras realizaciones del método, Ba se modifica por sustitución con un resto fluorescente o de unión a biomolécula. En aún otras realizaciones del método, Ba se modifica por sustitución con un resto fluorescente o de unión a biomolécula. En algunas realizaciones del método, el sustituyente en Ba es un resto fluorescente. En otras realizaciones del método, el sustituyente en Ba es biotina o avidina. En aún otras realizaciones del método, el sustituyente en Ba es un resto fluorescente. En algunas realizaciones del método, el sustituyente en Ba es biotina o avidina.

15 En algunas realizaciones del método, Z es ión piridinio, ión trietilamonio, ión *N,N*-diisopropiletilamonio, ión 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio, ión sodio o ión potasio. En otras realizaciones del método, Z es ión piridinio, ión trietilamonio, ión *N,N*-diisopropiletilamonio, ión 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio, ión sodio o ión potasio. En algunas realizaciones del método, X es alquilo, alcoxi, -NR<sup>f</sup>R<sup>f</sup>, -S<sup>-</sup>Z<sup>+</sup> o -BH<sub>3</sub>Z<sup>+</sup>. En otras realizaciones del método, X es alquilo, alcoxi, -NR<sup>f</sup>R<sup>f</sup>, -S<sup>-</sup>Z<sup>+</sup> o -BH<sub>3</sub>Z<sup>+</sup>.

20 En una realización del método, el electrófilo de azufre es la fórmula F, fórmula E o fórmula B. En algunas realizaciones del método, el electrófilo de azufre es la fórmula F, fórmula E o fórmula B. En otras realizaciones del método, el electrófilo de selenio es la fórmula G o fórmula L. En aún otras realizaciones del método, el electrófilo de selenio es la fórmula G o la fórmula L. En algunas realizaciones del método, el agente de boración es borano-*N,N*-diisopropiletilamina (BH<sub>3</sub>·DIPEA), borano-2-cloropiridina (BH<sub>3</sub>·CPy), borano-tetrahidrofurano (BH<sub>3</sub>·THF) o borano-sulfuro de dimetilo (BH<sub>3</sub>·Me<sub>2</sub>S). En otras realizaciones del método, el agente de halogenación es CCl<sub>4</sub>, CBr<sub>4</sub>, Cl<sub>2</sub>, cloruro de sulfurilo (SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) o *N*-clorosuccinimida (NCS). En aún otras realizaciones del método, el reactivo de condensación es bis(triclorometil)carbonato (BTC), Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> o cloruro de *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl).

25 En otro aspecto se describe un método de identificación o detección de una molécula diana en una muestra, comprendiendo el método: poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene una molécula diana con una molécula sensora de ácido nucleico de fórmula 1, sintetizada según los métodos de la invención, en el que un cambio en una señal generada por una unidad generadora de señales indica la presencia de dicha diana en dicha muestra. La molécula sensora de ácido nucleico se une específicamente con la molécula diana. En algunas realizaciones hay una pluralidad de moléculas sensoras de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la pluralidad de moléculas sensoras de ácido nucleico comprende moléculas sensoras de ácido nucleico que se unen específicamente a diferentes moléculas diana. En algunos casos, el método comprende además cuantificar el cambio en la señal generada por la unidad generadora de señales para cuantificar la cantidad de molécula diana en la muestra. La unidad generadora de señales detecta cualquier tipo de señal, que incluye, pero no se limita a, fluorescencia, resonancia de plasmones superficiales, extinción de fluorescencia, quimioluminiscencia, interferometría o detección del índice de refracción.

35 La muestra que va a detectarse es una muestra ambiental, material de riesgo biológico, muestra orgánica, fármaco, toxina, aroma, fragancia o muestra biológica. La muestra biológica es una célula, extracto de células, lisado celular, tejido, extracto de tejido, fluido corporal, suero, sangre o hemoderivado. En algunas realizaciones del método, la presencia de la molécula diana indica la presencia de una afección patológica. En algunas realizaciones del método, la presencia de la molécula diana indica la presencia de una molécula deseable.

40 En otro aspecto se describe un método de amplificación de regiones deseadas de ácido nucleico de un molde de ácido nucleico que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de primeros cebadores de PCR que tienen una región de secuencia de nucleótidos fija complementaria a una secuencia consenso de interés; (b) proporcionar una pluralidad de segundos cebadores de PCR, (c) amplificar el molde de ácido nucleico mediante PCR usando la pluralidad de primeros cebadores de PCR y la pluralidad de segundos cebadores de PCR en condiciones en las que un subconjunto de la pluralidad de primeros cebadores se une a la secuencia consenso de interés sustancialmente donde quiera que se produzca en el molde, y un subconjunto de la pluralidad de segundos cebadores se une al molde en localizaciones eliminadas de los primeros cebadores de forma que las regiones de ácido nucleico flanqueadas por el primer cebador y el segundo cebador se amplifiquen específicamente, y en el que la pluralidad de primeros cebadores de PCR y/o la pluralidad de segundos cebadores de PCT son moléculas de ácidos nucleicos de fórmula 1 que se producen según los métodos de la invención.

45 En algunas realizaciones, el molde es ADN genómico. En algunas realizaciones, el molde es ADN genómico eucariota. En algunas realizaciones, el molde es ADN genómico humano. En algunas realizaciones, el molde es ADN procariota. En algunas realizaciones, el molde es ADN que es un ADN genómico clonado, una región de ADN

subgenómica, un cromosoma o una región subcromosómica. En algunas realizaciones, el molde es ARN.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 Las novedosas características de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que los principios de la invención se utilizan, y dibujos adjuntos de los que:
- 10 Figura 1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de ( $S_P$ )-4tt ( $\text{CDCl}_3$ )  
 Figura 2. Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  de ( $S_P$ )-4tt ( $\text{CDCl}_3$ )  
 Figura 3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de ( $R_P$ )-4tt ( $\text{CDCl}_3$ )  
 Figura 4. Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  de ( $R_P$ )-4tt ( $\text{CDCl}_3$ )  
 Figura 5A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5tt  
 15 Figura 5B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5tt usando BTC en lugar de Ph3PCl2  
 Figura 6A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5tt  
 Figura 6B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5tt usando BTC en lugar de PH3PCL2  
 Figura 7A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5tt  
 Figura 7B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5tt  
 20 Figura 8. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5tt  
 Figura 9A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5ct  
 Figura 9B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5ct  
 Figura 10A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5ct  
 Figura 10B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5ct  
 25 Figura 11. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5at  
 Figura 12. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5at  
 Figura 13. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5gt  
 Figura 14. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5gt  
 Figura 15A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5tt  
 30 Figura 15B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5tt  
 Figura 16A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5tt  
 Figura 16B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5tt  
 Figura 17A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5tt  
 Figura 17B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5tt  
 35 Figura 18. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5ct  
 Figura 19. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5ct  
 Figura 20A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5at  
 Figura 20B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5at  
 Figura 21. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5at  
 40 Figura 22A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5at  
 Figura 22B. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5at  
 Figura 23. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-5gt  
 Figura 24. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-5gt  
 Figura 25. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-7tt  
 45 Figura 26. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-7tt  
 Figura 27. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-8tt  
 Figura 28. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-8tt  
 Figura 29A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de All-( $S_P$ )-[TPS]<sub>3</sub>T  
 Figura 29B. Espectro de EM-MALDI TOF de All-( $S_P$ )-[TPS]<sub>3</sub>T  
 50 Figura 30A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ ,  $R_P$ ,  $S_P$ )-[TPS]<sub>3</sub>T  
 Figura 30B. Espectro de EM-MALDI TOF de ( $S_P$ ,  $R_P$ ,  $S_P$ )-[TPS]<sub>3</sub>T  
 Figura 31A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ ,  $S_P$ ,  $R_P$ )-[TPS]<sub>3</sub>T  
 Figura 31B. Espectro de EM-MALDI TOF de ( $R_P$ ,  $S_P$ ,  $R_P$ )-[TPS]<sub>3</sub>T  
 Figura 32A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de All-( $R_P$ )-[TPS]<sub>3</sub>T  
 55 Figura 32B. Espectro de EM-MALDI TOF de All-( $R_P$ )-[TPS]<sub>3</sub>T  
 Figura 33A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-9uMu  
 Figura 33B. Espectro de EM-MALDI TOF de ( $S_P$ )-9uMu  
 Figura 34A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-9uMu  
 Figura 34B. Espectro de EM-MALDI TOF de ( $R_P$ )-9uMu  
 60 Figura 35A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-10uFu  
 Figura 35B. Espectro de EM-MALDI TOF de ( $S_P$ )-10uFu  
 Figura 36A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-10uFu  
 Figura 36B. Espectro de EM-MALDI TOF de ( $R_P$ )-10uFu  
 Figura 37A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $S_P$ )-11nt  
 65 Figura 37B. Espectro de EM-MALDI TOF de ( $S_P$ )-11nt  
 Figura 38A. Perfil de UPLC<sup>®</sup> en bruto de ( $R_P$ )-11nt

Figura 38B. Espectro de EM-MALDI TOF de (R<sub>P</sub>)-11nt**Descripción detallada de la invención****5 Definiciones.**

A menos que se establezca de otro modo, los siguientes términos usados en la presente solicitud, que incluyen la memoria descriptiva y reivindicaciones, tienen las definiciones dadas a continuación. Debe observarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. A menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología. En la presente solicitud, el uso de "o" o "y" significa "y/o", a menos que se establezca de otro modo. Además, el uso del término "que incluye", además de otras formas, tales como "incluyen", "incluye" e "incluido", no es limitante.

15 El término "ácido nucleico" engloba poli- u oligorribonucleótidos (ARN) y poli- u oligodesoxirribonucleótidos (ADN); ARN o ADN derivados de N-glucósidos o C-glucósidos de nucleobases y/o nucleobases modificadas; ácidos nucleicos derivados de azúcares y/o azúcares modificados; y ácidos nucleicos derivados de puentes de fosfato y/o puentes de átomos de fósforo modificados. El término engloba ácidos nucleicos que contienen cualquier combinación de nucleobases, nucleobases modificadas, azúcares, azúcares modificados, puentes de fosfato o puentes de átomos de fósforo modificados. Ejemplos incluyen, y no se limitan a, ácidos nucleicos que contienen restos de ribosa, los ácidos nucleicos que contienen restos de desoxirribosa, ácidos nucleicos que contienen tanto restos de ribosa como de desoxirribosa, ácidos nucleicos que contienen restos de ribosa y ribosa modificada. El prefijo poli- se refiere a un ácido nucleico que contiene aproximadamente 1 a aproximadamente 10.000 unidades de monómeros de nucleótidos y en el que el prefijo oligo- se refiere a un ácido nucleico que contiene aproximadamente 1 a aproximadamente 200 unidades de monómeros de nucleótidos.

20 El término "nucleobase" se refiere a las partes de ácidos nucleicos que participan en el enlace de hidrógeno que une una hebra de ácido nucleico a otra hebra complementaria en un modo específico de secuencia. Las nucleobases que existen de forma natural más comunes son adenina (A), guanina (G), uracilo (U), citosina (C) y timina (T).

25 El término "nucleobase modificada" se refiere a un resto que puede sustituir a una nucleobase. La nucleobase modificada imita la disposición espacial, propiedades electrónicas, o alguna otra propiedad fisicoquímica de la nucleobase y retiene la propiedad de enlace de hidrógeno que une una hebra de ácido nucleico a otra en un modo específico de secuencia. Una nucleobase modificada puede emparejarse con las cinco bases que existen de forma natural (uracilo, timina, adenina, citosina o guanina) sin afectar sustancialmente el comportamiento de fusión, reconocimiento por enzimas intracelulares o actividad del dúplex de oligonucleótido.

30 El término "nucleósido" se refiere a un resto en el que una nucleobase o una nucleobase modificada está unida covalentemente a un azúcar o azúcar modificado.

35 El término "azúcar" se refiere a un monosacárido en forma cerrada y/o abierta. Los azúcares incluyen, pero no se limitan a, restos de ribosa, desoxirribosa, pentofurano, pentopirano y hexopirano.

40 El término "azúcar modificado" se refiere a un resto que puede sustituir a un azúcar. El azúcar modificado imita la disposición espacial, propiedades electrónicas, o alguna otra propiedad fisicoquímica de un azúcar.

45 El término "nucleótido" se refiere a un resto en el que una nucleobase o una nucleobase modificada está unida covalentemente a un azúcar o azúcar modificado, y el azúcar o azúcar modificado está unido covalentemente a un grupo fosfato o un resto de átomo de fósforo modificado.

50 El término "reactivo quiral" se refiere a un compuesto que es quiral o enantiopuro y puede usarse para inducción asimétrica en la síntesis de ácidos nucleicos.

55 El término "ligando quiral" o "auxiliar quiral" se refiere a un resto que es quiral o enantiopuro y controla el resultado estereoquímico de una reacción.

60 En una reacción de condensación, el término "reactivo de condensación" se refiere a un reactivo que activa un sitio menos reactivo y lo hace más susceptible al ataque por un nucleófilo.

65 El término "resto de bloqueo" se refiere a un grupo que enmascara transitoriamente la reactividad de un grupo funcional. El grupo funcional puede desenmascarse posteriormente por la eliminación del resto de bloqueo.

Los términos "agentes de boración", "electrófilos de azufre", "electrófilos de selenio" se refieren a compuestos que son útiles en la etapa de modificación usada para introducir grupos BH<sub>3</sub>, S y Se, respectivamente, para modificación en el átomo de fósforo.

El término "resto" se refiere a un segmento específico o grupo funcional de una molécula. Los restos químicos son entidades químicas frecuentemente reconocidas incorporadas en o añadidas a una molécula.

5 El término "soporte sólido" se refiere a cualquier soporte que permita la producción en masa sintética de ácidos nucleicos y puede ser reutilizado si se necesita. Como se usa en el presente documento, el término se refiere a un polímero que es insoluble en los medios empleados en las etapas de reacción realizadas para sintetizar los ácidos nucleicos, y se derivatiza para comprender grupos reactivos.

10 El término "resto de enlace" se refiere a cualquier resto opcionalmente ubicado entre el nucleósido terminal y el soporte sólido o entre el nucleósido terminal y otro nucleósido, nucleótido o ácido nucleico.

15 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar", o "paliar" o "mejorar", se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen, pero no se limitan a, beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se indica la erradicación o mejora del trastorno subyacente que está tratándose. Por tanto, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados al trastorno subyacente de forma que se observe una mejora en el paciente, a pesar de que el paciente pueda todavía estar afectado por el trastorno subyacente. Para el beneficio profiláctico, las composiciones pueden administrarse a un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un paciente que refiere uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, aún cuando pueda no haberse hecho un diagnóstico de esta enfermedad.

20 Un "efecto terapéutico", como se usa el término en el presente documento, engloba un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico como se ha descrito anteriormente. Un efecto profiláctico incluye retrasar o eliminar la aparición de una enfermedad o afección, retrasar o eliminar la aparición de síntomas de una enfermedad o afección, ralentizar, detener o invertir la progresión de una enfermedad o afección, o cualquier combinación de los mismos.

25 Un grupo "alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático. El resto alquilo puede ser un grupo alquilo saturado (que significa que no contiene ninguna unidad de insaturación, por ejemplo dobles enlaces carbono-carbono o triples enlaces carbono-carbono) o el resto alquilo puede ser un grupo alquilo insaturado (que significa que contiene al menos una unidad de insaturación). El resto alquilo, tanto si es saturado como insaturado, puede ser ramificado, de cadena lineal, o incluir una porción cíclica. El punto de unión de un alquilo está en un átomo de carbono que no es parte de un anillo.

30 El resto "alquilo" puede tener 1 a 10 átomos de carbono (siempre que aparezca en el presente documento, un intervalo numérico tal como "1 a 10" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "1 a 10 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 10 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquilo" donde no se designa intervalo numérico). Alquilo incluye tanto grupos alquilo de cadena ramificada como lineal. El grupo alquilo de los compuestos descritos en el presente documento puede designarse "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" o designaciones similares. A modo de ejemplo solo, "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" indica que hay uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis átomos de carbono en la cadena de alquilo, es decir, la cadena de alquilo está seleccionada del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo y *t*-butilo. Grupos alquilo típicos incluyen, pero de ninguna forma se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, alilo, ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo, ciclopentilmetilo, ciclohexilmetilo, y similares. En un aspecto, un alquilo es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

35 Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un anillo aromático en el que cada uno de los átomos que forma el anillo es un átomo de carbono. Los anillos de arilo están formados por cinco, seis, siete, ocho, nueve o más de nueve átomos de carbono. Los grupos arilo están sustituidos o sin sustituir. En un aspecto, un arilo es un fenilo o un naftalenilo. Dependiendo de la estructura, un grupo arilo puede ser un monoradical o un diradical (es decir, un grupo arileno). En un aspecto, un arilo es un arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>.

40 "Heteroarilo", o alternativamente "heteroaromático", se refiere a un radical aromático de 5 a 18 miembros (por ejemplo, heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>13</sub>) que incluye uno o más heteroátomos de anillo seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, y que puede ser un sistema de anillos monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico. Siempre que aparezca en el presente documento, un intervalo numérico tal como "5 a 18" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "5 a 18 átomos de anillo" significa que el grupo heteroarilo puede consistir en 5 átomos de anillo, 6 átomos de anillo, etc., hasta e incluyendo 18 átomos de anillo. Un resto "heteroaromático" o de "heteroarilo" que contiene N se refiere a un grupo aromático en el que al menos uno de los átomos del esqueleto del anillo es un átomo de nitrógeno. El grupo heteroarilo policíclico puede estar condensado o no condensado. El (Los) heteroátomo(s) en el radical heteroarilo están opcionalmente oxidados. Uno o más átomos de nitrógeno, si están presentes, están opcionalmente cuaternizados. El heteroarilo está unido al resto de la molécula mediante cualquier átomo del (de los) anillo(s). Ejemplos de heteroarilos incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, acridinilo, bencimidazolilo, bencindolilo, 1,3-benzodioxolilo, benzofuranilo, benzoaxazolilo, benzo[d]tiazolilo, benzotiazolilo, benzo[b][1,4]dioxepinilo, benzo[b][1,4]oxazinilo, 1,4-benzodioxanilo, benzo[*d*]furanilo, benzoxazolilo, benzodioxolilo, benzodioxinilo, benzoxazolilo, benzopiranilo, benzopiranonilo, benzofuranilo, benzofuranonilo,

benzofurazano, benzotiazolo, benzotieno (benzotiofeno), benzotieno[3,2-*d*]pirimidino, benzotriazolo, benzo[4,6]imidazo[1,2-*a*]piridinilo, carbazolilo, cinnolinilo, ciclopenta[*d*]pirimidino, 6,7-dihidro-5*H*-ciclopenta[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidino, 5,6-dihidrobenzo[*h*]quinazolinilo, 5,6-dihidrobenzo[*h*]cinnolinilo, 6,7-dihidro-5*H*-benzo[6,7]ciclohepta[1,2-*c*]piridazinilo, dibenzofurano, dibenzotiofeno, furano, furazano, furanono, furo[3,2-*c*]piridinilo, 5,6,7,8,9,10-hexahidrocicloocta[*d*]pirimidino, 5,6,7,8,9,10-hexahidrocicloocta[*d*]piridazinilo, 5,6,7,8,9,10-hexahidrocicloocta[*d*]piridinilo, isotiazolo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indazolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, isoquinolilo, indolizino, isoxazolilo, 5,8-metano-5,6,7,8-tetrahidroquinazolinilo, naftiridinilo, 1,6-naftiridinono, oxadiazolo, 2-oxoazepino, oxazolilo, oxirano, 5,6,6*a*,7,8,9,10,10*a*-octahidrobenzo[*h*]quinazolinilo, 1-fenil-1*H*-pirrolilo, fenazino, fenotiazino, fenoxazino, ftalazino, pteridino, purino, pirano, pirrolilo, pirazolilo, pirazolo[3,4-*d*]pirimidino, piridinilo, pirido[3,2-*d*]pirimidino, pirido[3,4-*d*]pirimidino, pirazino, pirimidino, piridazino, pirrolilo, quinazolinilo, quinoxalino, quinolino, isoquinolino, tetrahidroquinolino, 5,6,7,8-tetrahidroquinazolinilo, 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidino, 6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-ciclohepta[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidino, 5,6,7,8-tetrahidropirido[4,5-*c*]piridazinilo, tiazolo, tiadiazolo, tiapirano, triazolilo, tetrazolo, triazino, tieno[2,3-*d*]pirimidino, tieno[3,2-*d*]pirimidino, tieno[2,3-*c*]piridinilo y tiofeno (es decir, tienilo). A menos que se establezca de otro modo específicamente en la memoria descriptiva, un resto heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes que son independientemente: alquilo, heteroalquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, oxo, tio, trimetilsilano, -OR<sup>a</sup>, -SR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)R<sup>a</sup>, -C(O)OR<sup>a</sup>, -C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>a</sup>)C(O)OR<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>t</sub>R<sup>a</sup> (donde *t* es 1 o 2), -S(O)<sub>t</sub>OR<sup>a</sup> (donde *t* es 1 o 2) o -S(O)<sub>t</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub> (donde *t* es 1 o 2) donde cada R<sup>a</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, fluoroalquilo, carbociclo, carbociclilalquilo, arilo, aralquilo, heterociclo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo.

El término "alicíclico" se refiere a un resto todo de carbono que es tanto alifático como cíclico. Los grupos alicíclicos contienen uno o más anillos de todo carbono que pueden estar tanto saturados como insaturados, pero que no tienen carácter aromático. Los grupos alicíclicos están sustituidos o sin sustituir y pueden contener de uno a diez átomos de carbono. En un aspecto, un alicíclico es un cicloalcano monocíclico. En otro aspecto, un alicíclico es un cicloalcano bicíclico.

El término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo. Grupos aralquilo adecuados incluyen bencilo, picolilo, y similares, todos los cuales pueden estar opcionalmente sustituidos.

Un "resto de acilo" se refiere a un grupo alquil(C=O), aril(C=O) o aralquil(C=O). Un resto de acilo puede tener un resto intermedio (Y) que es oxígeno, amino, tio o seleno entre el grupo carbonilo y de hidrocarburo. Por ejemplo, un grupo acilo puede ser alquil-Y-(C=O), aril-Y-(C=O) o aralquil-Y-(C=O).

Grupos "alqueno" son grupos de hidrocarburo de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alqueno pueden estar sustituidos.

Grupos "alquino" son grupos de hidrocarburo de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos que contienen al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquino pueden estar sustituidos.

Un grupo "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo unido a oxígeno, es decir, grupo (alquil)-O-, donde alquilo es como se define en el presente documento. Ejemplos incluyen grupos metoxi (-OCH<sub>3</sub>) o etoxi (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

Un grupo "alquenoiloxi" se refiere a un grupo alqueno unido a oxígeno, es decir, grupo (alquenoil)-O-, donde alquenoil es como se define en el presente documento.

Un grupo "alquinoiloxi" se refiere a un grupo alquino unido a oxígeno, es decir, grupo (alquinoil)-O-, donde alquinoil es como se define en el presente documento.

Un grupo "ariloxi" se refiere a un grupo arilo unido a oxígeno, es decir, grupo (aril)-O-, donde el arilo es como se define en el presente documento. Un ejemplo incluye fenoxi (-OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

El término "alquilseleno" se refiere a un grupo alquilo que tiene un grupo seleno sustituido unido al mismo, es decir, grupo (alquil)-Se-, en el que alquilo se define en el presente documento.

El término "alquenoilseleno" se refiere a un grupo alqueno que tiene un grupo seleno sustituido unido al mismo, es decir, grupo (alquenoil)-Se-, en el que alquenoil se define en el presente documento.

El término "alquinoilseleno" se refiere a un grupo alquino que tiene un grupo seleno sustituido unido al mismo, es decir, grupo (alquinoil)-Se-, en el que alquenoil se define en el presente documento.

El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo unido a un átomo de azufre de enlace, es decir, grupo (alquil)-S-, en el que alquilo se define en el presente documento. Por ejemplo, un alquiltio es un metiltio y similares.

65

El término "alqueniltio" se refiere a un grupo alquenilo unido a un átomo de azufre de enlace, es decir, grupo (alquenil)-S-, en el que alquilo se define en el presente documento.

5 El término "alquiniltio" se refiere a un grupo alquinilo unido a un átomo de azufre de enlace, es decir, grupo (alquinil)-S-, en el que alquenilo se define en el presente documento.

El término "alquilamino" se refiere a un grupo amino sustituido con al menos un grupo alquilo, es decir, -NH(alquilo) o -N-(alquilo)<sub>2</sub>, en los que alquilo se define en el presente documento.

10 El término "alquenilamino" se refiere a un grupo amino sustituido con al menos un grupo alquenilo, es decir, -NH(alquenilo) o -N-(alquenilo)<sub>2</sub>, en el que alquenilo se define en el presente documento.

El término "alquinilamino" se refiere a un grupo amino sustituido con al menos un grupo alquinilo, es decir, -NH(alquinilo) o -N-(alquinilo)<sub>2</sub>, en el que alquinilo se define en el presente documento.

15 El término "halógeno" pretende incluir flúor, cloro, bromo y yodo.

Un "grupo fluorescente" se refiere a una molécula que, cuando se excita con luz que tiene una longitud de onda seleccionada, emite luz de una longitud de onda diferente. Grupos fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, grupos indol, fluoresceína, tetrametilrodamina, Texas Red, BODIPY, ácido 5-[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfónico (EDANS), cumarina y Lucifer yellow.

Un "ión amonio" es un catión poliatómico positivamente cargado de la fórmula química NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

25 Un "ión alquilamonio" es un ión amonio que tiene al menos uno de sus átomos de hidrógeno sustituido con un grupo alquilo, en el que alquilo se define en el presente documento. Ejemplos incluyen ión trietilamonio, ión *N,N*-diisopropiletilamonio.

Un "ión iminio" tiene la estructura general R<sub>2</sub>C=NR<sub>2</sub><sup>+</sup>. Los grupos R se refieren a grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo como se define en el presente documento. Un "ión imino heteroaromático" se refiere a un ión iminio donde el nitrógeno y sus grupos R unidos forman un anillo heteroaromático. Un "ión imino heterocíclico" se refiere a un ión iminio donde el nitrógeno y sus grupos R unidos forman un anillo heterocíclico.

Los términos "amino" o "amina" se refiere a un grupo radical -N(R<sup>h</sup>)<sub>2</sub>, donde cada R<sup>h</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, fluoroalquilo, carbocicliilo, carbocicilalquilo, arilo, aralquilo, heterocicliilo, heterocicilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, a menos que se establezca de otro modo específicamente en la memoria descriptiva. Cuando un grupo -N(R<sup>f</sup>)<sub>2</sub> tiene dos R<sup>f</sup> distintos de hidrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 4, 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, se indica que -N(R<sup>f</sup>)<sub>2</sub> incluye, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Uno cualquiera o más de hidrógeno, alquilo, fluoroalquilo, carbocicliilo, carbocicilalquilo, arilo, aralquilo, heterocicliilo, heterocicilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que son independientemente alquilo, fluoroalquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, hidroxilo, halógeno, ciano, trifluorometilo, trifluorometoxi, nitro, trimetilsilanilo, -OR<sup>i</sup>, -SR<sup>i</sup>, -OC(O)R<sup>i</sup>, -N(R<sup>i</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)R<sup>i</sup>, -C(O)OR<sup>i</sup>, -OC(O)N(R<sup>i</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)N(R<sup>i</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>i</sup>)C(O)OR<sup>i</sup>, -N(R<sup>i</sup>)C(O)R<sup>i</sup>, -N(R<sup>i</sup>)C(O)N(R<sup>i</sup>)<sub>2</sub>, N(R<sup>i</sup>)C(NR<sup>i</sup>)N(R<sup>i</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>i</sup>)S(O)<sub>t</sub>R<sup>i</sup> (donde t es 1 o 2), -S(O)<sub>t</sub>OR<sup>i</sup> (donde t es 1 o 2) o -S(O)<sub>t</sub>N(R<sup>i</sup>)<sub>2</sub> (donde t es 1 o 2), donde cada R<sup>i</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, fluoroalquilo, carbocicliilo, carbocicilalquilo, arilo, aralquilo, heterocicliilo, heterocicilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo.

"Carbamato", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto unido a un grupo amino que tiene la fórmula -C(O)OR donde R es alquilo, fluoroalquilo, carbocicliilo, carbocicilalquilo, arilo, aralquilo, heterocicliilo, heterocicilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Boc (*tert*-butil-OC(O)-), CBz (bencil-OC(O)-), Teoc (Me<sub>3</sub>SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC(O)-), alloc (alil-OC(O)-) o Fmoc (9-fluorenilmetil-OC(O)-).

"Sililo sustituido", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que tiene la fórmula R<sub>3</sub>Si-. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, TBDEM (*tert*-butildimetilsililo), TBDPS (*tert*-butildifenilsililo) o TEM (trimetilsililo).

El término "tiol" se refiere a grupos -SH, e incluyen grupos tiol sustituidos, es decir, grupos -SR<sup>j</sup>, en los que R<sup>j</sup> son cada uno independientemente un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilaralquilo, heterocicliilo o heterocicilalquilo sustituido o sin sustituir como se define en el presente documento.

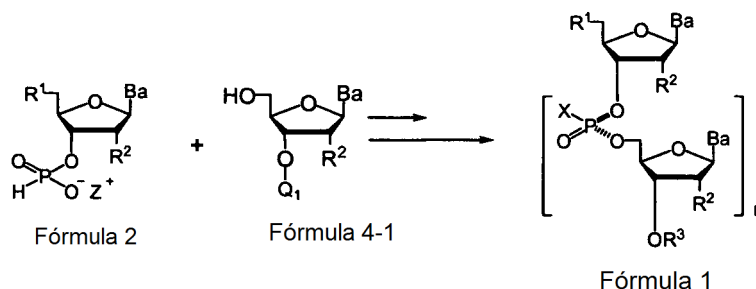
## 60 Métodos de síntesis

**Discusión general de los métodos de síntesis de un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral.**

65 El presente método proporciona una síntesis eficiente de ácidos nucleicos modificados en el átomo de fósforo en el que la configuración estereoquímica en un átomo de fósforo está controlada, produciéndose así un oligonucleótido

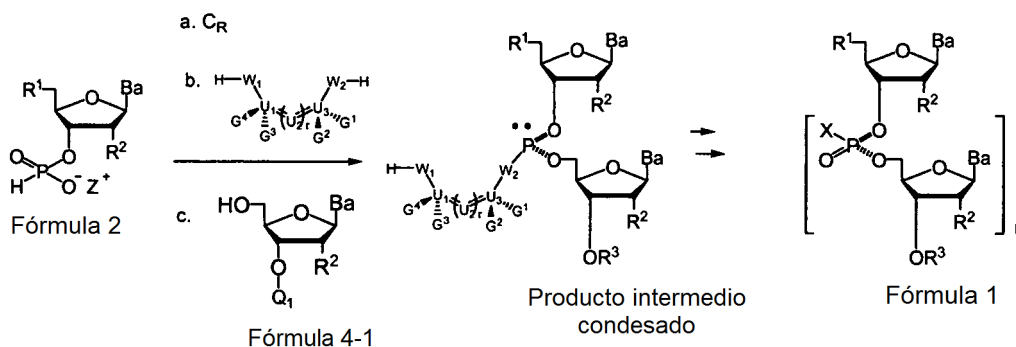
estereodefinido. El método elimina la necesidad de separaciones complejas de mezclas diaestereoméricas y permite el uso de materiales de partida aquirales baratos fácilmente disponibles. El método de síntesis desvelado en el presente documento comprende una reacción asimétrica de un resto de *H*-fosfonato aquiral (fórmula 2) con un nucleósido que comprende un resto nucleófilo, tal como un grupo hidroxilo (fórmula 4-1, donde Q<sub>1</sub> es cualquiera de un grupo de bloqueo, un resto de enlace a un soporte o a una cadena de nucleótido) para proporcionar un ácido nucleico modificado en el átomo de fósforo que comprende un resto de *X*-fosfonato quiral, que es un compuesto de fórmula 1, como se muestra en el Esquema 1. De tal manera se produce un polímero u oligómero de nucleótido que tiene alta pureza diaestereomérica. En algunas realizaciones, el ácido nucleico contiene modificaciones en las nucleobases, resto de azúcar y/o grupos protectores.

Esquema 1. Síntesis de un ácido nucleico que comprende un resto de *X*-fosfonato quiral de fórmula 1.



La reacción de una molécula que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral de fórmula 2 con un nucleósido que comprende un resto nucleófilo de fórmula 4-1 produce la formación de un producto intermedio condensado; que se convierte en el ácido nucleico que comprende un resto de *X*-fosfonato quiral. La síntesis del producto intermedio condensado comprende las etapas de (a) activación del compuesto de fórmula 2 con un agente de condensación, (b) reacción con un reactivo quiral, seguido de (c) reacción con el compuesto de fórmula 4-1. El esquema general se muestra en el Esquema 2. El reactivo quiral llega a unirse al producto intermedio condensado como un grupo de auxiliar quiral. En el proceso proporcionado en el presente documento, las etapas (a)-(c) que conducen al producto intermedio condensado pueden realizarse sin aislar ningún producto intermedio, es decir, en el mismo recipiente o en un solo recipiente. Así, el proceso obvia la necesidad del aislamiento de productos intermedios discretos. El proceso desvelado en el presente documento puede realizarse en solución o sobre soporte sólido. Dependiendo de las condiciones de reacción, la adición de un reactivo de activación puede ser útil para la etapa de condensación. Por ejemplo, el reactivo de activación puede añadirse a la reacción después de haberse completado las etapas (a)-(c) o puede añadirse a la reacción al mismo tiempo que las etapas (a)-(c).

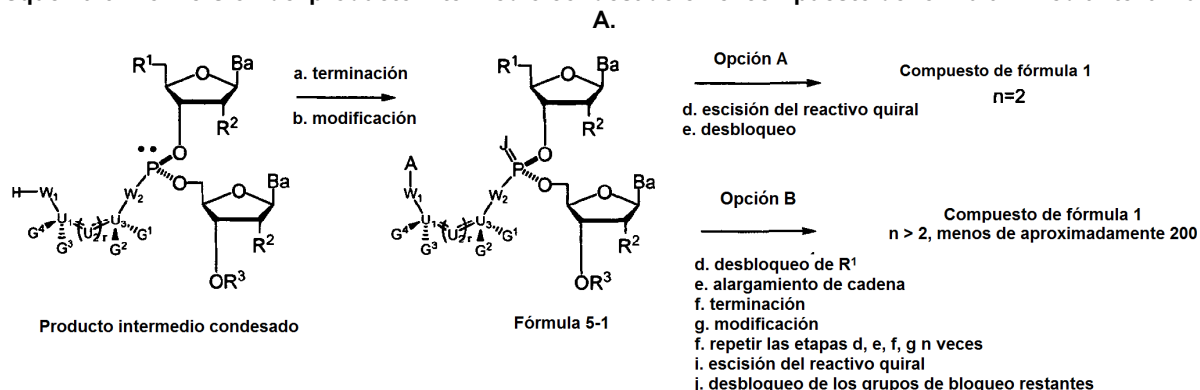
Esquema 2. Etapas de reacción que conducen a la formación de un producto intermedio condensado.



En una realización, el producto intermedio condensado se convierte en un ácido nucleico que comprende un resto de *X*-fosfonato quiral de fórmula 1 por terminación del auxiliar quiral sobre el producto intermedio condensado con un resto A, que es un resto de acilo, arilo, alquilo, aralquilo o de sililo, y modificando el fósforo para introducir J, que es S, Se o BH<sub>3</sub>, produciendo un compuesto de fórmula 5-1. En una realización (Opción A, Esquema 3), el compuesto de fórmula 5-1 se convierte en el compuesto de fórmula 1, donde X es S, Se o BH<sub>3</sub>, y n es 1 (dímero), escindiendo el auxiliar quiral, y desbloqueando los grupos de bloqueo y escindiendo del soporte sólido, si se desea. Cuando se forma el dímero, la etapa de terminación en el Esquema 3 es opcional. Alternativamente (Opción B, Esquema 3), el compuesto de fórmula 5-1 se somete a alargamiento de cadena repitiendo las etapas para producir un producto intermedio condensado donde otro monómero de fórmula 2 se añade al oligonucleótido. Las etapas de terminación, modificación, desbloqueo y alargamiento de cadena se repiten hasta que se logra n deseado. En ese momento, se escinden los auxiliares quirales en cada fosfonato, se escinden los grupos de bloqueo restantes, que incluyen la escisión de un soporte sólido, si se desea, para producir el compuesto de fórmula 1, donde X es S, Se o BH<sub>3</sub>, y n es mayor de o igual a 2 y menor de aproximadamente 200.



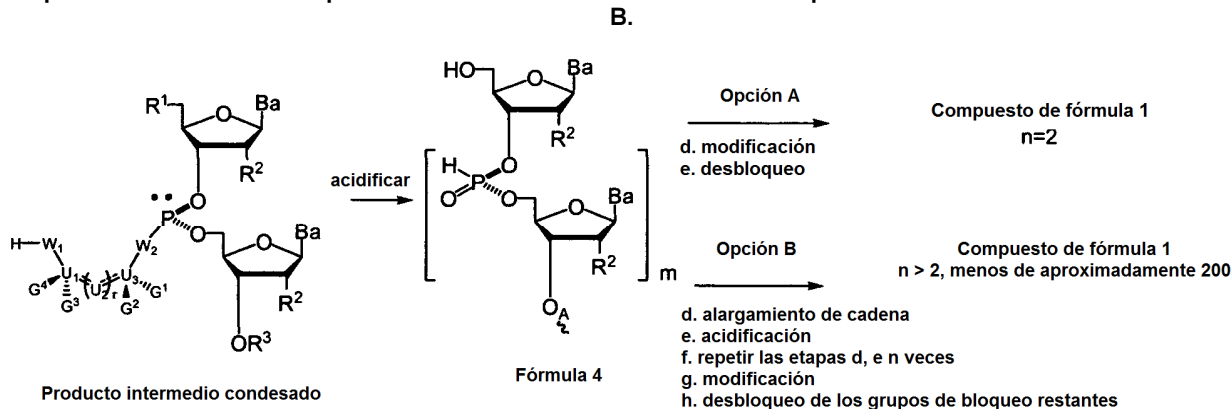
**Esquema 3. Conversión del producto intermedio condensado en el compuesto de fórmula 1 mediante la Ruta**



5 En otro método proporcionado en el presente documento, el producto intermedio condensado se convierte en un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1 acidificando el producto intermedio condensado para eliminar el grupo de bloqueo en R<sup>1</sup>, que también elimina el auxiliar quiral. En una realización (Opción A, Esquema 4), el compuesto de fórmula 4 se modifica para introducir un resto X en el fósforo, para producir un compuesto de fórmula 1, que se desbloquea para eliminar los grupos de bloqueo restantes, y eliminar de un soporte de síntesis, si se desea, para producir un compuesto de fórmula 1 en la que R<sup>3</sup> es hidrógeno y n es 1.

10 Alternativamente, el compuesto de fórmula 4 en el Esquema 4 (Opción B) se somete a la etapa de reacción de alargamiento de cadena, y entonces se acidifica para desbloquear el grupo de bloqueo R<sup>1</sup> del nucleósido recién añadido. La etapa de alargamiento de cadena y la etapa de desbloqueo de R<sup>1</sup> se realizan durante m repeticiones. En ese momento, el compuesto de fórmula 4, en la que m es igual a n-1, se modifica para introducir un resto X en cada fósforo, para producir un compuesto de fórmula 1, que se desbloquea para eliminar los grupos de bloqueo restantes, y eliminar de un soporte de síntesis, si se desea, para producir un compuesto de fórmula 1 en la que R<sup>3</sup> es hidrógeno y n es mayor de o igual a 2 y menor de aproximadamente 200.

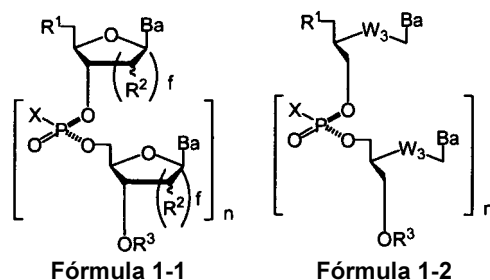
**Esquema 4. Conversión del producto intermedio condensado en el compuesto de fórmula 1 mediante la Ruta**



25 En tanto la Opción A como la Opción B del Esquema 4, X es alquilo, alcoxi, arilo, alquiltio, acilo, -NR<sup>f</sup>R<sup>f</sup>, alquenilo, alquiniilo, alqueniilo, alquiniilo, -S-Z<sup>+</sup>, -Se-Z<sup>+</sup> o -BH<sub>3</sub>-Z<sup>+</sup>, donde cada R<sup>f</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquiniilo o arilo; Z<sup>+</sup> es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o Z es un ión metálico monovalente. En otras realizaciones, Z es ión piridinio, ión trietilamonio, ión N,N-diisopropiletilamonio, ión 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio, ión sodio o ión potasio.

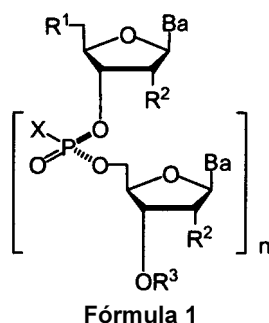
**Ácido nucleico modificado en el átomo de fósforo que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1.**

35 El proceso de la descripción proporciona un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de la siguiente fórmula general 1-1 o fórmula 1-2:



5 En las que el resto de X-fosfonato conecta restos de nucleósido naturales o restos de nucleósido no naturales en el que el anillo de ribosa natural está sustituido con un anillo que contiene oxígeno más grande o más pequeños o en el que el anillo está sustituido con una estructura no cíclica en la que W<sub>3</sub> es -S-, -O-, amino sustituido o sin sustituir, alquileo, alquenileno o alquinileno. En otras realizaciones del ácido nucleico, el resto de X-fosfonato conecta restos de nucleósido naturales con restos de nucleósido no naturales. En aún otras realizaciones del ácido nucleico, el resto de X-fosfonato conecta restos de nucleósido con restos de azúcar diferentes entre sí.

10 El proceso de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral es un compuesto de fórmula 1:



15 En la fórmula 1, R<sup>1</sup> es -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>.

Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se.

20 R<sup>a</sup> es un resto de bloqueo.

R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo.

25 Cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>).

Cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>2</sup>-, alquenil-Y<sup>2</sup>-, alquinil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-, o un catión que es Na<sup>+1</sup>, Li<sup>+1</sup> o K<sup>+1</sup>.

30 Y<sup>2</sup> es O, NR<sup>d</sup> o S.

Cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en el que R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo.

35 Cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada.

Cada caso de X es independientemente alquilo, alcoxi, arilo, alquiltio, acilo, -NR<sup>f</sup>R<sup>f</sup>, alqueniloxi, alquiniloxi, alqueniltio, alquiniltio, -SZ<sup>+</sup>, -SeZ<sup>+</sup> o -BH<sub>3</sub>Z<sup>+</sup>.

40 Cada caso de R<sup>f</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

Z<sup>+</sup> es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o Z es un ión metálico monovalente.

45

$R^3$  es hidrógeno, un grupo de bloqueo, un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico; y  $n$  es un número entero de 1 a aproximadamente 200.

5 En una realización, cualquiera de los grupos  $R^2$  está sustituido con, por ejemplo, un resto fluorescente, un resto de biotina o un resto de avidina.

10 En una realización, el ácido nucleico descrito en el presente documento se prepara a partir de todos los monómeros de ribonucleótido. En otra realización, se prepara a partir de todos los monómeros de desoxirribonucleótido. En otra realización más, el ácido nucleico se prepara a partir de una mezcla de monómeros de ribonucleótido o de desoxirribonucleótido. En una realización, el ácido nucleico es una mezcla de restos de ARN y de ADN. En otra realización, el ácido nucleico comprende un sustituyente en  $R^2$  que no se encuentra en ácidos nucleicos de ARN o ADN.

15 Ba representa una nucleobase, que es una nucleobase natural o modificada. Cada caso de la nucleobase está independientemente bloqueada o no bloqueada.

20 Cada caso de X es independientemente alquilo, alcoxi, arilo, alquiltio, acilo,  $-NR^fR^f$ , alquenilo, alquinoxio, alquinoxio, alquinoxio, alquinoxio,  $-S-Z^+$ ,  $-Se-Z^+$  o  $-BH_3Z^+$ , en el que cada caso de  $R^f$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alqueno o arilo;  $Z^+$  es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o Z es un ión metálico monovalente. En algunas realizaciones, X es alquilo, alcoxi,  $-NR^fR^f$ ,  $-S-Z^+$  o  $-BH_3Z^+$ . En otras realizaciones, Z es ión piridinio, ión trietilamonio, ión *N,N*-diisopropilamonio, ión 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio, ión sodio o ión potasio.

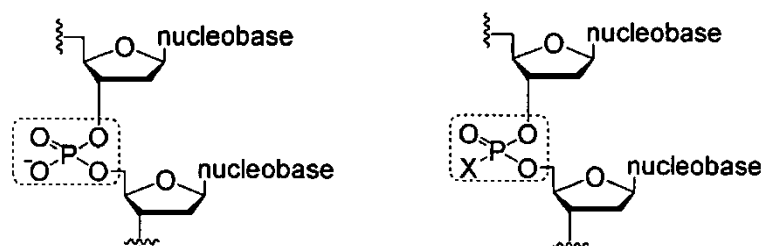
25  $R^3$  es hidrógeno, un grupo de bloqueo, un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico, que se preparan usando métodos en el presente documento o conocidos en la técnica. El ácido nucleico unido a  $R^3$  que se prepara usando cualquier método conocido comprende átomos de fósforo que están modificados, no modificados, o mezclas de fósforo modificado y sin modificar y comprenden cualquier configuración en el átomo de fósforo. En una realización,  $R^3$  es un resto de enlace unido a otro nucleósido o nucleótido.

30

#### Resto de X-fosfonato

35 Como se usa en el presente documento, resto de X-fosfonato se refiere al átomo de fósforo del enlace del esqueleto internucleosídico que se modifica para unirse covalentemente a un resto X, donde X puede ser, pero no se limita a, azufre, selenio, alquilo, boro, acilo, amino, tiol o alcoxi. El resto X modifica el átomo de fósforo por sustitución de uno de los átomos de oxígeno en el esqueleto internucleosídico. Los enlaces del esqueleto internucleosídico se muestran a continuación (dentro de los recuadros rectangulares discontinuos) para dos fragmentos de ácido nucleico como ejemplos no limitantes. La estructura de la izquierda a continuación muestra el grupo fosfato encontrado en los enlaces del esqueleto internucleosídico natural. La estructura de la derecha a continuación muestra un resto de X-fosfonato como enlace del esqueleto internucleosídico.

40



45 Un resto fosforotioato comprende un resto de azufre como resto X. Un resto fosforoselenoato comprende un resto de selenio como resto X. Un resto alquilfosfonato (por ejemplo, metilfosfonato) comprende un grupo alquilo (por ejemplo, grupo metilo) como resto X. Un resto boronofosfonato comprende un grupo borano como resto X.

50 En una realización, el ácido nucleico comprende grupos fosforotioato en los enlaces del esqueleto. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende grupos fosforoselenoato en los enlaces del esqueleto. En otras realizaciones, el ácido nucleico comprende grupos alquilfosfonato (por ejemplo, metilfosfonato) en los enlaces del esqueleto. En aún otras realizaciones, el ácido nucleico comprende grupos boronofosfonato en los enlaces del esqueleto.

55 Cada resto X puede ser independientemente elegido de los diversos restos X descritos en el presente documento. Esto permite que múltiples restos X estén presentes dentro de un ácido nucleico. En una realización, el mismo resto X se usa en todo el ácido nucleico. En otras realizaciones, se usan diferentes restos X en todo el ácido nucleico. Por ejemplo, dentro de un ácido nucleico, algunos de los X-fosfonatos son restos fosforotioato mientras que otros X-fosfonatos dentro del mismo ácido nucleico son restos alquilfosfonato. Será evidente para un experto en la materia

que son posibles otras variaciones y alternancias de modificaciones de fósforo y dependen del uso y las aplicaciones de estos ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la elección del resto X depende de las propiedades bioquímicas del ácido nucleico y sus interacciones con muestras biológicas.

## 5 Configuración de resto de X-fosfonato.

Los métodos descritos en el presente documento son útiles para controlar la configuración de cada átomo de fósforo en el enlace del esqueleto internucleosídico. El reactivo quiral permite el control específico de la quiralidad en el X-fosfonato. Así, puede seleccionarse tanto una configuración  $R_P$  como  $S_P$  en cada ciclo de síntesis, permitiendo el control de la estructura tridimensional global del producto de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la selección de las configuraciones  $R_P$  y  $S_P$  se hace para conferir una superestructura tridimensional específica a la cadena de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, cada resto de X-fosfonato puede tener una configuración  $R_P$ . En otras realizaciones, cada resto de X-fosfonato puede tener una configuración  $S_P$ . En otra realización, cada resto de X-fosfonato puede tener independientemente una configuración  $R_P$  o una configuración  $S_P$ . En realizaciones específicas, los restos de X-fosfonato alternan entre  $R_P$  y  $S_P$  tal como  $R_P, S_P, R_P$  o  $S_P, R_P, S_P$  en todo el ácido nucleico. En otras realizaciones específicas, los restos de X-fosfonato contienen configuraciones repetidas de  $R_P, R_P, S_P, S_P$  en todo el ácido nucleico. En aún otras realizaciones, el ácido nucleico comprende todas las configuraciones  $R_P$ . En realizaciones adicionales, el ácido nucleico comprende todos los restos  $S_P$ . En algunas realizaciones, los enlaces del esqueleto internucleosídico del extremo 5' y 3' son de la configuración  $S_P$  y los enlaces del esqueleto internucleosídico internos son todos de la configuración  $R_P$ . Las realizaciones descritas en el presente documento sirven de ejemplos de cómo la configuración puede controlarse usando estos métodos. El ácido nucleico descrito en el presente documento no se limita a estos patrones de configuración. Será evidente para un experto en la materia que son posibles otras variaciones y alternancias en las configuraciones  $R_P$  y  $S_P$  y dependen del uso y aplicaciones del ácido nucleico.

## Determinación de la pureza de configuraciones de X-fosfonato.

La pureza de la configuración en cada resto de X-fosfonato en el ácido nucleico se determina usando métodos analíticos convencionales tales como, pero no se limitan a, espectroscopía de RMN  $^{31}P$  o HPLC de fase inversa. Usando los métodos descritos en el presente documento, en una realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más del 80 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más del 60 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más del 70 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más del 85 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más del 90 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más del 95 % de pureza diaestereomérica. En otra realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más del 98 % de pureza diaestereomérica. En otra realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más del 99 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato del compuesto puede tener más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 83 %, más de aproximadamente el 84 %, más de aproximadamente el 85 %, más de aproximadamente el 86 %, más de aproximadamente el 87 %, más de aproximadamente el 88 %, más de aproximadamente el 89 %, más de aproximadamente el 90 %, más de aproximadamente el 91 %, más de aproximadamente el 92 %, más de aproximadamente el 93 %, más de aproximadamente el 94 %, más de aproximadamente el 95 %, más de aproximadamente el 96 %, más de aproximadamente el 97 %, más de aproximadamente el 98 %, o más de aproximadamente el 99 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 99,9 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 99 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 95 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 95 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 99 % de pureza diaestereomérica. En una realización, cada resto de X-fosfonato puede tener de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 99,9 % de pureza diaestereomérica.

La cantidad de una configuración particular con respecto a otra configuración afecta la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, además de su estabilidad. Por consiguiente, diferentes configuraciones afectan las propiedades biológicas, químicas y físicas de los ácidos nucleicos. En una realización, el ácido nucleico comprende un mayor porcentaje de configuración  $S_P$  que configuración  $R_P$ . En otra realización, el ácido nucleico comprende un mayor porcentaje de configuración  $R_P$  que configuración  $S_P$ . En otra realización, el ácido nucleico comprende el mismo

porcentaje de configuración  $R_P$  que configuración  $S_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 0-20 % de configuración  $R_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 20-40 % de configuración  $R_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 40-60 % de configuración  $R_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 60-80 % de configuración  $R_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 80-100 % de configuración  $R_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 0-20 % de configuración  $S_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 20-40 % configuración de  $S_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 40-60 % de configuración  $S_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 60-80 % de configuración  $S_P$ . En una realización, el ácido nucleico puede comprender 80-100 % de configuración  $S_P$ .

#### Longitud del ácido nucleico modificado en el átomo de fósforo.

El ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1 comprende de aproximadamente 1 nucleósido a aproximadamente 200 nucleósidos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1 se combina además en oligómeros o polímeros. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 es un dímero. En otras realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende hasta aproximadamente 100 nucleósidos. En otras realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende hasta aproximadamente 150 nucleósidos. En otras realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende hasta aproximadamente 200 nucleósidos. En otras realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende hasta aproximadamente 300 nucleósidos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende de 1 a aproximadamente 200 nucleósidos. En otras realizaciones, el ácido nucleico comprende de 1 a aproximadamente 150 nucleósidos. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico contiene de 1 a aproximadamente 10 nucleósidos. En otras realizaciones, el ácido nucleico contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleósidos. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleósidos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende de 1 a aproximadamente 5 nucleósidos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 nucleósidos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 15 nucleósidos, o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 nucleósidos, o aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleósidos, o aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleósidos, o aproximadamente 25 a aproximadamente 35 nucleósidos, o aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nucleósidos. En algunas realizaciones de fórmula 1,  $n$  es un número entero de 1 a aproximadamente 200. En algunas realizaciones de fórmula 1,  $n$  es un número entero de 1 a aproximadamente 150. En algunas realizaciones de fórmula 1,  $n$  es un número entero de 1 a aproximadamente 10. En algunas realizaciones de fórmula 1,  $n$  es un número entero de 10 a aproximadamente 50. En algunas realizaciones de fórmula 1,  $n$  es un número entero de 10 a aproximadamente 100. En algunas realizaciones de fórmula 1,  $n$  es un número entero de 1 a aproximadamente 5, o aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o aproximadamente 10 a aproximadamente 20, o aproximadamente 15 a aproximadamente 25, o aproximadamente 20 a aproximadamente 30, o aproximadamente 25 a aproximadamente 35, o aproximadamente 30 a aproximadamente 40.

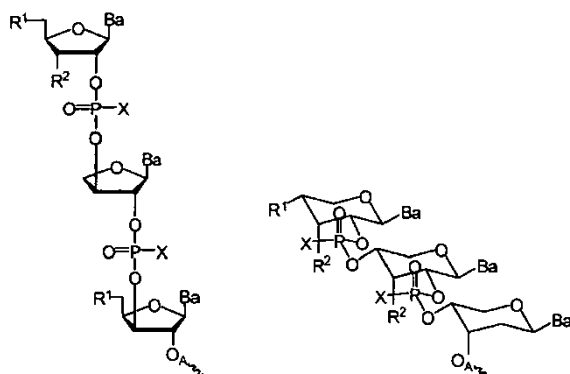
#### Variaciones adicionales del ácido nucleico modificado en el átomo de fósforo.

El ácido nucleico de fórmula 1 puede ser monocatenario. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 se hibrida con una hebra complementaria para formar un ácido nucleico bicatenario.

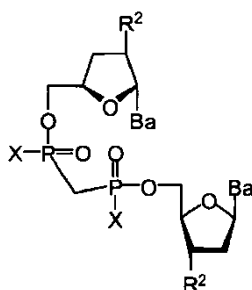
En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 puede comprender una estructura lineal abierta. En otras realizaciones, los extremos respectivos del ácido nucleico de fórmula 1 se unen para formar una estructura circular.

Dentro de un ácido nucleico, el componente de azúcar de cada unidad comprende los mismos azúcares o diferentes. En algunas realizaciones, los azúcares son azúcares modificados o azúcares que están sustituidos. En algunas realizaciones, los azúcares son todos restos de azúcar ribosa. En algunas realizaciones, los azúcares son todos restos de azúcar desoxirribosa. En otras realizaciones, los azúcares son todos restos pentofuranosa, pentopiranososa o hexopiranososa. En realizaciones adicionales, el componente de azúcar comprende estructuras de anillo cerradas o estructuras abiertas.

Dentro de la estructura del ácido nucleico, se denomina comúnmente que los puentes de átomos de fósforo están formando el esqueleto internucleosídico de los ácidos nucleicos. Los enlaces del esqueleto internucleosídico en los ácidos nucleicos incluyen, y no se limitan a, puentes de átomos de fósforo 2' a 5', puentes de átomos de fósforo 3' a 5', puentes de átomos de fósforo 5' a 3' y los puentes de átomos de fósforo 3' a 2' y los puentes 4' a 2' descritos en la patente de EE.UU. N.º 6.608.186 y Joyce, G.F. Nature, 2002, 418, 214-220. Ejemplos no limitantes de estas variaciones en los enlaces del esqueleto internucleosídico se muestran a continuación:



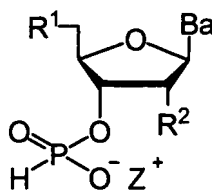
5 Dependiendo del componente de azúcar o de azúcar modificado, también se contemplan otros tipos de puentes de átomos de fósforo que incluyen, y no se limitan a, los puentes de bisfosfonato de metileno mostrados a continuación y descritos en Xu, L. et al, J. Med. Chem., 2005, 48,4177-4181.



10 El ácido nucleico de fórmula 1 puede comprender las mismas nucleobases o diferentes. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende todas las nucleobases iguales. En otras realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende todas las nucleobases diferentes. En otras realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende las nucleobases que existen de forma natural. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende nucleobases modificadas. En aún otras realizaciones, el ácido nucleico contiene nucleobases que imitan la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico encontrado en la naturaleza. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende una mezcla de nucleobases que existen de forma natural y nucleobases modificadas.

**Moléculas que comprenden un resto de H-fosfonato aquiral.**

20 La molécula que comprende un resto de H-fosfonato aquiral es un compuesto de fórmula 2:



Fórmula 2

25 En la fórmula 2, R<sup>1</sup> es -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenoil-Y<sup>1</sup>-, alquinoil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>.

Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se.

30 R<sup>a</sup> es un resto de bloqueo.

R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo.

35 Cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>).

Cada caso de  $R^e$  es independientemente alquilo, arilo, alquenoilo, alquinilo, alquil- $Y^2$ -, alquenoil- $Y^2$ -, alquinil- $Y^2$ -, aril- $Y^2$ - o heteroaril- $Y^2$ -.

$Y^2$  es O,  $NR^d$  o S.

$R^2$  es hidrógeno,  $-NR^dR^d$ ,  $N_3$ , halógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenoil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$ -,  $-OR^b$  o  $-SR^c$ , en el que  $R^b$  es un resto de bloqueo.

Ba es una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada.

$Z^+$  es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o un ión metálico monovalente.

En algunas realizaciones, Z es ión piridinio, ión trietilamonio, ión *N,N*-diisopropiletilamonio, ión 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio, ión sodio o ión potasio.

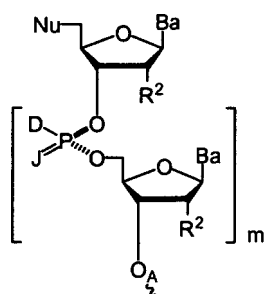
En algunas realizaciones, el azúcar es un anillo de ribosa. En otras realizaciones, el azúcar es restos desoxirribosa, pentofuranosa, pentopiranososa o hexopiranososa. En otras realizaciones, el azúcar es un azúcar modificado. En algunas realizaciones, el azúcar es un análogo de glicerol o un azúcar con sustituciones.

Los monómeros de nucleósidos de *H*-fosfonato se preparan fácilmente y son estables. Se han descrito métodos de su preparación (véase, por ejemplo, Froehler, B.C. *Methods in Molecular Biology*. En *Protocols for Oligonucleotides and Analogs*; Agrawal, S., Ed.; Humana: Totowa, 1993; vol 20, p 63-80).

En algunas realizaciones, el monómero de nucleósidos comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral unido al nucleósido en la posición 3'. En aún realizaciones adicionales, el monómero de nucleósidos comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral unido al resto de nucleósido en la posición 3' mediante un resto de enlace intermedio. En realizaciones específicas, el resto de enlace intermedio es un grupo metileno (véase, por ejemplo, el documento WO/2001/02415). En algunas realizaciones, el resto de *H*-fosfonato está unido en la posición 2' del monómero de nucleósidos. En otras realizaciones, el monómero de nucleósidos comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral unido al nucleósido en la posición 5'.

#### Compuestos con un resto nucleófilo libre.

El compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un compuesto de fórmula 4-1 y reacciona en el centro de fósforo del producto intermedio quiral. La dirección de ataque en el fósforo por el grupo o resto nucleófilo depende de los sustituyentes del auxiliar quiral en el producto intermedio quiral (producto intermedio condensado). En una realización, la adición de un reactivo de activación puede ser útil para ayudar al compuesto que comprende un resto nucleófilo libre a reaccionar en el centro de fósforo del producto intermedio quiral.

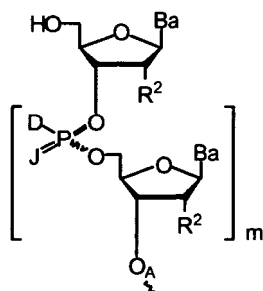


Fórmula 4-1

En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un ácido nucleico previamente preparado usando métodos descritos en el presente documento o se prepara usando otros métodos conocidos de la síntesis de ácidos nucleicos. En una realización, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre comprende un único monómero de nucleósidos. En otra realización, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre comprende más de una unidad de nucleósidos. En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un producto de una etapa de alargamiento de cadena. En aún otras realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un oligómero. En realizaciones adicionales, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un polímero. En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre comprende un grupo hidroxilo como resto nucleófilo libre. En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre comprende un grupo amino como resto nucleófilo libre. En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre comprende un grupo tiol como resto nucleófilo libre.

5 En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre comprende un resto nucleófilo en cualquier posición del azúcar de nucleósido. En algunas realizaciones, el resto nucleófilo está localizado en la posición 5' del azúcar. En algunas realizaciones, el resto nucleófilo está localizado en la posición 4' del azúcar. En otras realizaciones, el resto nucleófilo está localizado en la posición 3' del azúcar. En otras realizaciones, el resto nucleófilo está localizado en la posición 2' del azúcar.

En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula 4-1 es un nucleósido que comprende un resto 5'-OH y es un compuesto de fórmula 4:



Fórmula 4

10 En la fórmula 4, cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en el que R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo.

Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se.

R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo.

Cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>).

Cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente alquilo, arilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>2</sup>-, alquenil-Y<sup>2</sup>-, alquinil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-.

Y<sup>2</sup> es O, NR<sup>d</sup> o S.

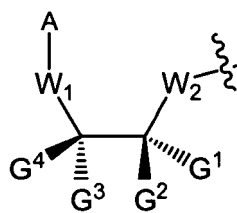
Cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada.

m es un número entero de 0 a n-1.

n es un número entero de 1 a aproximadamente 200.

O<sub>A</sub> está conectado a un resto de tritilo, un resto de sililo, un resto de acetilo, un resto de acilo, un resto de arilacilo, un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico.

J es O y D es H, o J es S, Se o BH<sub>3</sub> y D es un ligando quiral C<sub>i</sub> o un resto de fórmula A:



Fórmula A

en la que W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son independientemente NHG<sup>5</sup>, OH o SH.

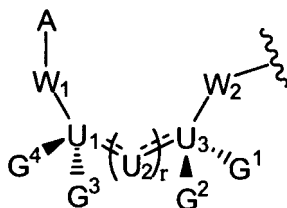
A es hidrógeno, resto de acilo, arilo, alquilo, aralquilo o sililo.

G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup> que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta



aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en el que no más de cuatro de  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$ .

En otras realizaciones, donde J es S, Se o  $BH_3$  y D es un resto de fórmula A-I:



Fórmula A-I

en la que  $U_1$ ,  $U_3$ ,  $U_2$ ,  $r$ ,  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $W_1$ ,  $W_2$ , A son como se definen en el presente documento para la fórmula 3-I. En una realización de la fórmula A-I, A es hidrógeno.

En algunas realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH de fórmula 4 es un producto intermedio de un ciclo de alargamiento de cadena previo como se describe en el presente documento. En aún otras realizaciones, el compuesto de fórmula 4 es un producto intermedio de otro método sintético de ácido nucleico conocido. En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula 4 está unido a un soporte sólido. En otras realizaciones, el compuesto de fórmula 4 no está unido a soporte sólido y está libre en el disolvente o solución.

En una realización, m es 0 y el compuesto de fórmula 4 es una única unidad de nucleósidos y se considera el primer nucleósido del ácido nucleico. En alguna realización, m es 0 y el compuesto de fórmula 4 es una unidad de nucleósidos unida a otro ácido nucleico mediante el oxígeno de 3'. En otras realizaciones, m es mayor de 0 y el compuesto de fórmula 4 es un ácido nucleico polimérico u oligomérico que comprende un resto 5'-OH. En otras realizaciones, m es mayor de 0 y el compuesto de fórmula 4 es el producto final de un ciclo de alargamiento de cadena previo. En algunas realizaciones, donde m es mayor de 0, el compuesto de fórmula 4 es un nucleósido que se une además a un nucleótido, mediante un enlace tanto en la posición 3' como en otra posición en el nucleósido.

Donde el compuesto de fórmula 4 está unido a otro nucleótido o ácido nucleico, el enlace del esqueleto internucleosídico de fosfato incluye, y no se limitan a, puentes de átomos de fósforo 2' a 5', puentes de átomos de fósforo 3' a 5', puentes de átomos de fósforo 5' a 3' y los puentes de átomos de fósforo 3' a 2' y puentes 4' a 2'. El enlace del esqueleto internucleosídico de fosfato incluye otros tipos de puentes de átomos de fósforo, también se contempla que incluyen, pero no se limitan a, puentes de metilénbifosfonato.

El ácido nucleico de fórmula 1 comprende las mismas nucleobases o diferentes. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende todas las nucleobases iguales. En otras realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende nucleobases diferentes. En otras realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende las nucleobases que existen de forma natural. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende nucleobases modificadas. En aún otras realizaciones, el ácido nucleico contiene nucleobases que imitan la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico encontrado en la naturaleza. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de fórmula 1 comprende una mezcla de nucleobases que existen de forma natural y nucleobases modificadas.

El compuesto que comprende un resto nucleófilo libre está libre en solución. En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre no está unido a un soporte sólido. Esto permite sintetizar los ácidos nucleicos en solución (síntesis en fase líquida o síntesis en fase de solución). Alternativamente, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre se une previamente a otro resto tal como un soporte sólido. En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un nucleósido unido a un soporte sólido en el hidroxilo 3' del nucleósido. La unión del ácido nucleico a un soporte sólido permite la síntesis usando síntesis en fase sólida. Durante la síntesis de ácidos nucleicos, el compuesto unido a un soporte sólido se trata con diversos reactivos en un ciclo de alargamiento de cadena o ciclos de alargamiento de cadena repetidos para lograr el alargamiento escalonado de una cadena de ácido nucleico en crecimiento con unidades de ácido nucleico individuales. Las etapas de purificación normalmente no se llevan a cabo hasta que se sintetiza la secuencia de ácidos nucleicos completamente ensamblada. Se conocen diversos tipos de materiales de soporte sólido y se usan en la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y oligosacáridos. En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre se une a un soporte sólido mediante un resto de enlace. En otras realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre se une a un soporte sólido sin un resto de enlace.

El compuesto que comprende un resto nucleófilo libre comprende un azúcar, azúcar sustituido o azúcar modificado. En algunas realizaciones, el azúcar es un azúcar ribosa. En algunas realizaciones, el azúcar es un azúcar desoxirribosa. En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre comprende una mezcla de un azúcar ribosa y un azúcar desoxirribosa. En otras realizaciones, el azúcar es restos de pentofuranosa,

pentopiranosas, hexopiranosas o mezclas de los mismos. En realizaciones adicionales, el azúcar comprende una estructura de anillo cerrada, una estructura abierta, o mezclas de las mismas.

El reactante de nucleósido que comprende un resto OH sin proteger puede contener el grupo OH sin proteger en cualquier posición en el núcleo de azúcar. En una realización, un resto de *H*-fosfonato acquiral se condensa con un nucleósido que comprende un resto 5'-OH para formar el producto intermedio condensado. En otra realización, un resto de *H*-fosfonato acquiral se condensa con un nucleósido que comprende un resto 4'-OH para formar el producto intermedio condensado. En otra realización, un resto de *H*-fosfonato acquiral se condensa con un nucleósido que comprende un resto 3'-OH para formar el producto intermedio condensado. En otra realización más, un resto de *H*-fosfonato acquiral se condensa con un nucleósido que comprende un resto 2'-OH para formar el producto intermedio condensado.

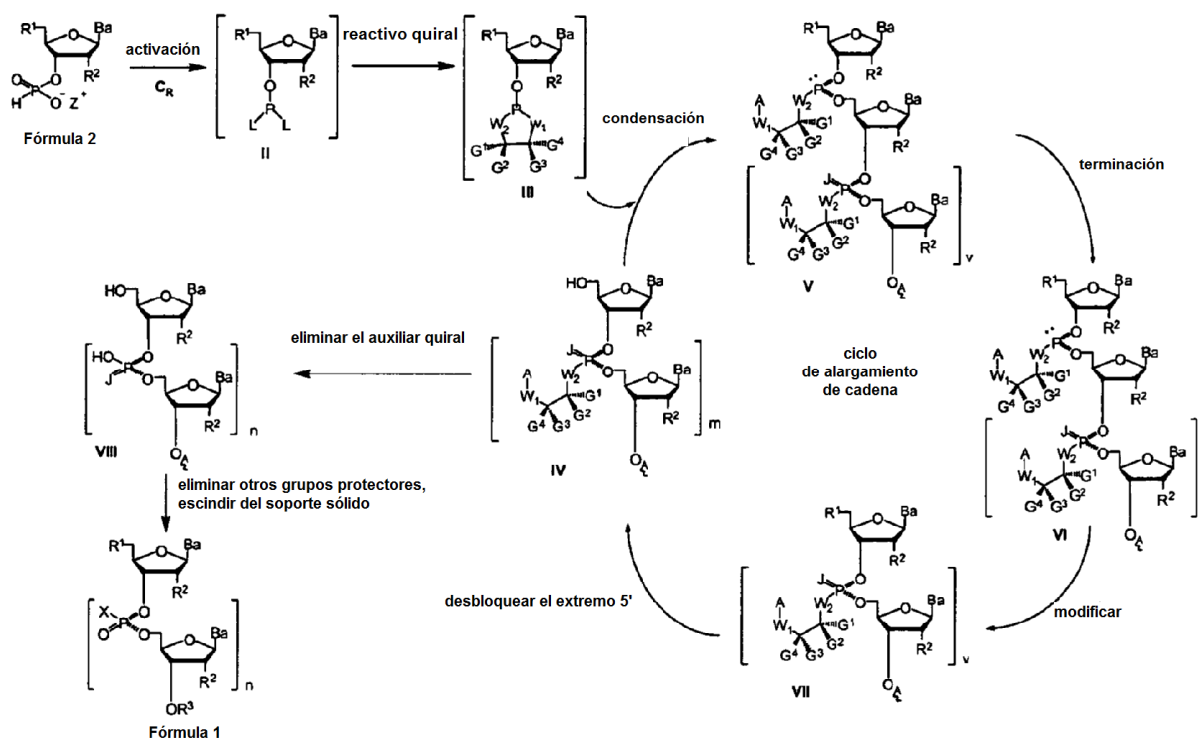
En algunas realizaciones, acidificar el producto intermedio condensado produce un compuesto de fórmula 4 en la que *m* es al menos uno. En otras realizaciones, el producto intermedio condensado comprende un resto de fórmula A', que es equivalente a un resto de fórmula A en la que A es hidrógeno y en la que G<sup>1</sup> y G<sup>2</sup> son independientemente alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo o arilo y G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heteroarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup> que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en el que no más de cuatro de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup>.

#### Discusión detallada de los métodos de síntesis.

La extensión de la cadena de ácido nucleico puede realizarse en la dirección 3' a 5'. En una realización, el ácido nucleico se sintetiza a partir del hidroxilo libre en el extremo 5' en ciclos repetitivos de reacciones químicas. Alternativamente, la extensión de la cadena de ácido nucleico puede realizarse en la dirección 5' a 3'. En una realización, el ácido nucleico se sintetiza a partir del hidroxilo libre en el extremo 3' en ciclos repetitivos de reacciones químicas.

Una realización del método de síntesis del ácido nucleico se muestra en el esquema 5 (Vía A). Se entiende que los métodos en el presente documento no se limitan al esquema, su secuencia de acontecimientos o sus productos intermedios como se ilustran. En una realización descrita en el Esquema 5, un *H*-fosfonato acquiral de fórmula 2 se trata con un reactivo de condensación para formar un producto intermedio de estructura II. En una realización, un reactivo de activación se añade a la mezcla de reacción durante la etapa de condensación. El uso de un reactivo de activación depende de las condiciones de reacción tales como los disolventes que se usan para la reacción. El producto intermedio de estructura II no se aísla y se trata en el mismo recipiente con un reactivo quiral para formar un producto intermedio quiral de estructura III. El producto intermedio de estructura III no se aísla y se somete a una reacción en el mismo recipiente con un nucleósido o nucleósido modificado de estructura IV para proporcionar un compuesto de fosfito quiral de estructura V. En algunas realizaciones, la estructura V se extrae en un disolvente para separarla de productos secundarios, impurezas y/o reactivos. En otras realizaciones, cuando el método se realiza mediante síntesis en fase sólida, el soporte sólido que comprende el compuesto de estructura V se filtra de los productos secundarios, impurezas y/o reactivos. Si el ácido nucleico final es más grande que un dímero, el auxiliar quiral en el compuesto de estructura V se termina con un grupo de bloqueo para proporcionar un compuesto de estructura VI. Si el ácido nucleico final es un dímero, entonces no es necesaria la etapa de terminación. El compuesto de estructura VI se modifica mediante reacción con un electrófilo para proporcionar un compuesto de estructura VII. El producto intermedio condensado modificado y terminado de estructura VII se desbloquea para eliminar el grupo de bloqueo en el extremo 5' de la cadena de ácido nucleico en crecimiento para proporcionar un compuesto de estructura IV. Se permite opcionalmente que el compuesto de estructura IV vuelva a entrar en el ciclo de alargamiento de cadena para formar un producto intermedio condensado, un producto intermedio condensado terminado, un producto intermedio condensado terminado modificado y un producto intermedio condensado desprotegido en 5'. Siguiendo al menos una ronda del ciclo de alargamiento de cadena, el producto intermedio terminado modificado desprotegido en 5' se desbloquea adicionalmente por eliminación del ligando del auxiliar quiral y otros grupos protectores, por ejemplo, grupos protectores de nucleobase, nucleobase modificada, azúcar y azúcar modificado, para proporcionar un ácido nucleico de fórmula 1. En otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio de un ciclo de alargamiento de cadena previo como se describe en el presente documento. En aún otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio obtenido de otro método sintético de ácidos nucleicos conocido. Después de un ciclo de síntesis con el primer nucleósido, los nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos que contienen un resto -OH no protegido pueden usarse para ciclos de alargamiento posteriores. En realizaciones donde se usa un soporte sólido, el ácido nucleico modificado en el átomo de fósforo se escinde entonces del soporte sólido. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos se dejan unidos sobre el soporte sólido para fines de purificación y luego se escinden del soporte sólido tras la purificación. En una realización, la síntesis descrita en el Esquema 5 (Vía A) es útil cuando las posiciones G<sup>1</sup> y G<sup>2</sup> del ligando del auxiliar quiral de fórmula A son hidrógeno. En aún otras realizaciones, los compuestos de estructura III-VII comprenden un resto de fórmula A-I en lugar de un resto de fórmula A.

Esquema 5. Síntesis de un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1 mediante la Ruta A.



5

En otra realización, descrita en el Esquema 6 (Ruta B), un *H*-fosfonato aquiral de fórmula 2 se trata con un reactivo de condensación para formar un producto intermedio de estructura II. En una realización, un reactivo de activación se añade a la mezcla de reacción durante la etapa de condensación. El uso de un reactivo de activación depende de las condiciones de reacción tales como los disolventes que se usan para la reacción. El producto intermedio de estructura II no se aísla y se trata en el mismo recipiente con un reactivo quiral para formar un producto intermedio quiral de estructura III. El producto intermedio de estructura III no se aísla y se somete a una reacción en el mismo recipiente con un nucleósido o nucleósido modificado de estructura IX para proporcionar un compuesto de fosfito quiral de estructura X. En algunas realizaciones, la estructura X se extrae en un disolvente para separarla de productos secundarios, impurezas y/o reactivos. En otras realizaciones, cuando el método se realiza mediante síntesis en fase sólida, el soporte sólido que comprende el compuesto de estructura X se filtra de los productos secundarios, impurezas y/o reactivos. El compuesto de estructura X se trata con un ácido para eliminar el grupo de bloqueo en el extremo 5' de la cadena de ácido nucleico en crecimiento (estructura XI). La etapa de acidificación también elimina el ligando de auxiliar quiral para proporcionar un compuesto de estructura IX. Se permite opcionalmente que el producto intermedio desbloqueado en 5' vuelva a entrar en la ciclo de alargamiento de cadena para formar un producto intermedio condensado que contiene un extremo 5' bloqueado, que entonces se acidifica hasta eliminar el grupo de bloqueo del extremo 5' y el ligando de auxiliar quiral. Siguiendo al menos una ronda de ciclo de alargamiento de cadena, el producto intermedio desprotegido en 5' se somete a una etapa de modificación para introducir un resto X unido a cada uno de los átomos de fósforo para proporcionar un compuesto de estructura XII. El producto intermedio modificado se desbloquea por la eliminación de los grupos protectores restantes, por ejemplo, se eliminan los grupos protectores de nucleobase, nucleobase modificada, azúcar o azúcar modificado, para proporcionar un ácido nucleico de fórmula 1. En otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio de un ciclo de alargamiento de cadena previo como se describe en el presente documento. En aún otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio obtenido de otro método sintético de ácidos nucleicos conocido. Después de un ciclo de síntesis con el primer nucleósido, el nucleósido, nucleótido o ácido nucleico que contiene un resto -OH no protegido puede usarse para ciclos de alargamiento posteriores. En realizaciones donde se usa un soporte sólido, el ácido nucleico modificado en el átomo de fósforo se escinde entonces del soporte sólido. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos se dejan unidos sobre el soporte sólido para fines de purificación y luego se escinden del soporte sólido tras la purificación. En una realización, la síntesis descrita en el Esquema 6 (Ruta B) es útil cuando las posiciones G<sup>1</sup> y G<sup>2</sup> del ligando de auxiliar quiral de fórmula A no son hidrógeno. En algunas realizaciones, los compuestos de estructuras III, X y XI comprenden un resto de fórmula A-1 en lugar de un resto de fórmula A.

10

15

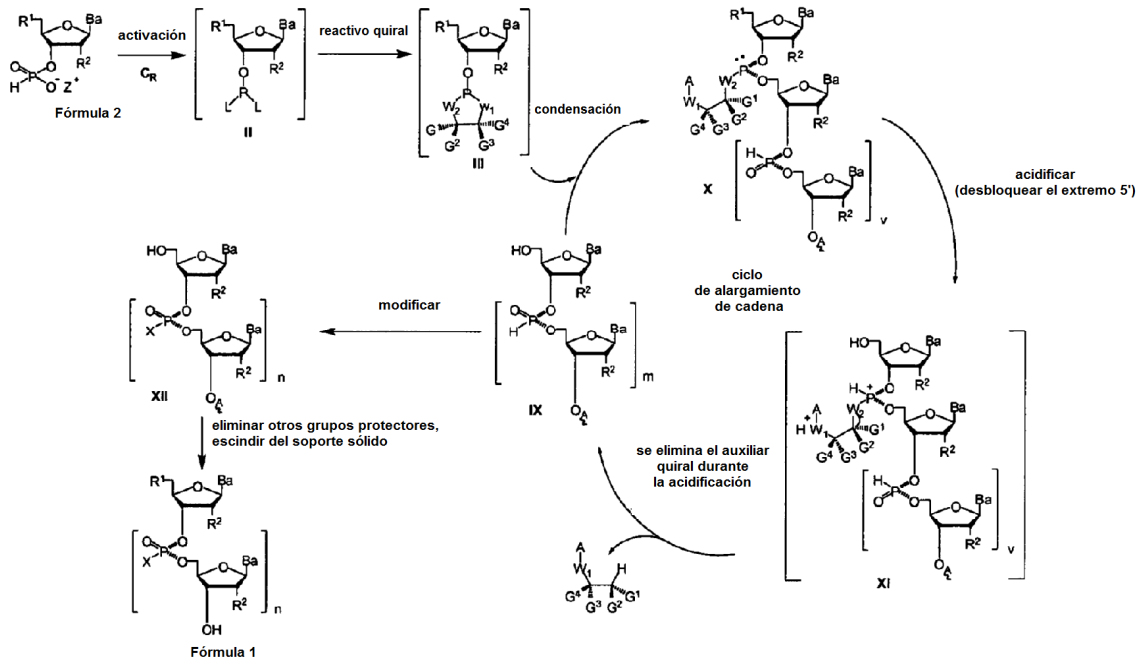
20

25

30

35

Esquema 6. Síntesis de un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1 mediante la Ruta B.



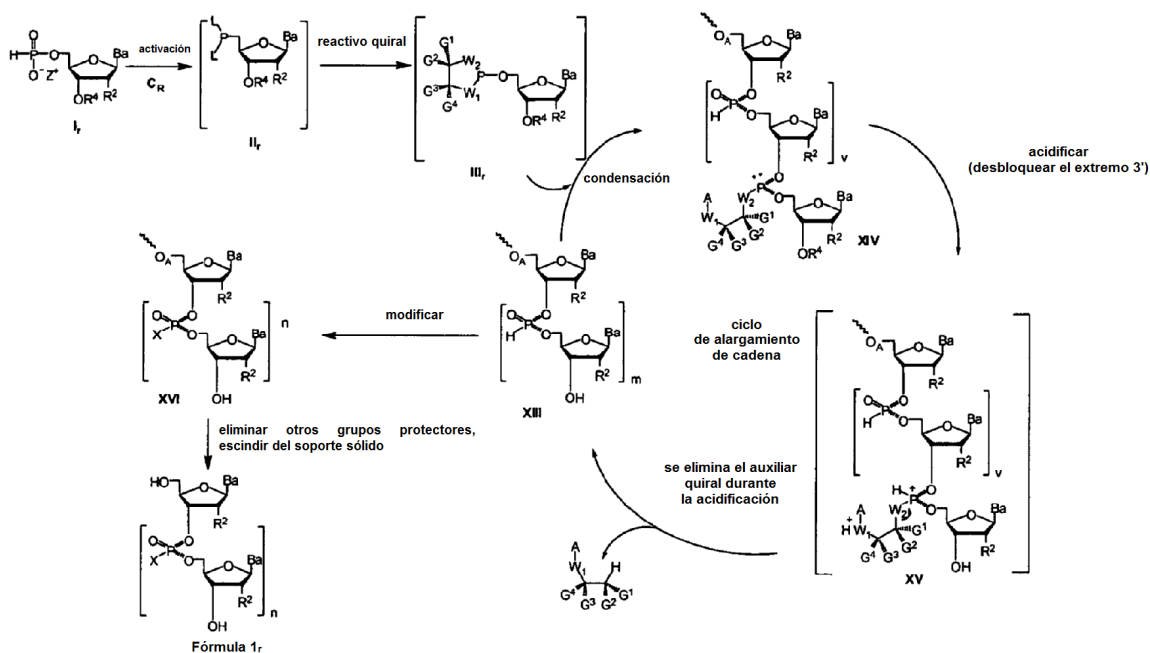
5

**Síntesis de 5' a 3' inversa de ácidos nucleicos.**

Un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1 se sintetiza alternativamente de la dirección 5' a 3'. En realizaciones donde se usa un soporte sólido, el ácido nucleico se une al soporte sólido mediante su extremo 5' del ácido nucleico en crecimiento, presentando así su grupo 3' para la reacción, que incluye reacción enzimática (por ejemplo, ligación y polimerización). En algunas realizaciones, esta orientación se manipula preparando monómeros de nucleósidos que comprenden un resto de H-fosfonato aquiral en la posición 5' y grupo hidroxilo protegido en la posición 3'. En una realización, el ácido nucleico se sintetiza según el Esquema 7. En el Esquema 7, -R<sup>4</sup> es -OR<sup>b</sup> como se ha definido anteriormente o, en el último ciclo de síntesis, es R<sup>4</sup>, que es equivalente a R<sup>1</sup> como se define en el presente documento.

15

Esquema 7. Síntesis de 5' a 3' de un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de fórmula 1.



5

En la realización descrita en el Esquema 7, se trata un *H*-fosfonato aquiral de estructura I<sub>r</sub> con un reactivo de condensación para formar un producto intermedio de estructura II<sub>r</sub>. El producto intermedio de estructura II<sub>r</sub> no se aísla y se trata en el mismo recipiente con un reactivo quiral para formar un producto intermedio de estructura III<sub>r</sub>. En una realización, un reactivo de activación se usa durante la etapa de condensación. El uso de un reactivo de activación depende de las condiciones de reacción tales como los disolventes que se usan para la reacción. El producto intermedio de estructura III<sub>r</sub> no se aísla y se somete a una reacción en el mismo recipiente con un nucleósido o nucleósido modificado de estructura XIII para proporcionar un compuesto de fosfito quiral de estructura XIV. En algunas realizaciones, la estructura XIV se extrae en un disolvente para separarla de productos secundarios, impurezas y/o reactivos. En otras realizaciones, cuando el método se realiza mediante síntesis en fase sólida, el soporte sólido que comprende el compuesto de estructura XIV se filtra de los productos secundarios, impurezas y/o reactivos. El compuesto de estructura XIV se trata con un ácido para eliminar el grupo de bloqueo en el extremo 3' de la cadena de ácido nucleico en crecimiento (estructura XV). La etapa de acidificación también elimina el ligando de auxiliar quiral para proporcionar un compuesto de estructura XIII. Se permite opcionalmente que el producto intermedio desbloqueado en 3' vuelva a entrar en la ciclo de alargamiento de cadena para formar un producto intermedio condensado que contiene un extremo 3' bloqueado, que entonces se acidifica hasta eliminar el grupo de bloqueo del extremo 3' y el ligando de auxiliar quiral. Siguiendo al menos una ronda de ciclo de alargamiento de cadena, el producto intermedio desprotegido en 3' se somete a una etapa de modificación para introducir un resto X unido a cada uno de los átomos de fósforo para proporcionar un compuesto de estructura XVI. El producto intermedio modificado se desbloquea por la eliminación de los grupos protectores restantes, por ejemplo, se eliminan grupos protectores de nucleobase, nucleobase modificada, azúcar o azúcar modificado, para proporcionar un ácido nucleico de fórmula 1. En otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 3'-OH es un producto intermedio de un ciclo de alargamiento de cadena previo como se describe en el presente documento. En aún otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 3'-OH es un producto intermedio obtenido de otro método sintético de ácidos nucleicos conocido. Después de un ciclo de síntesis con el primer nucleósido, pueden usarse nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos que contienen un resto -OH no protegido para ciclos de alargamiento posteriores. En realizaciones donde se usa un soporte sólido, el ácido nucleico modificado en el átomo de fósforo puede entonces escindirse del soporte sólido, localizado en el extremo 5'. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden opcionalmente dejarse unidos sobre el soporte sólido para fines de purificación y luego se escinden del soporte sólido tras la purificación. En un aspecto, la síntesis descrita en el Esquema 7 es útil cuando ninguna de las posiciones G<sup>1</sup> y G<sup>2</sup> del ligando de auxiliar quiral de fórmula A son hidrógeno. La síntesis de 5' a 3' inversa puede llevarse a cabo usando los mismos materiales de partida en el Esquema 7 en un mecanismo análogo a las etapas en la Ruta A. En algunas realizaciones, los compuestos de estructuras III<sub>r</sub>, XIV y XV comprenden un resto de fórmula A-I en lugar de un resto de fórmula A.

40

**Ciclo de alargamiento de cadena.**

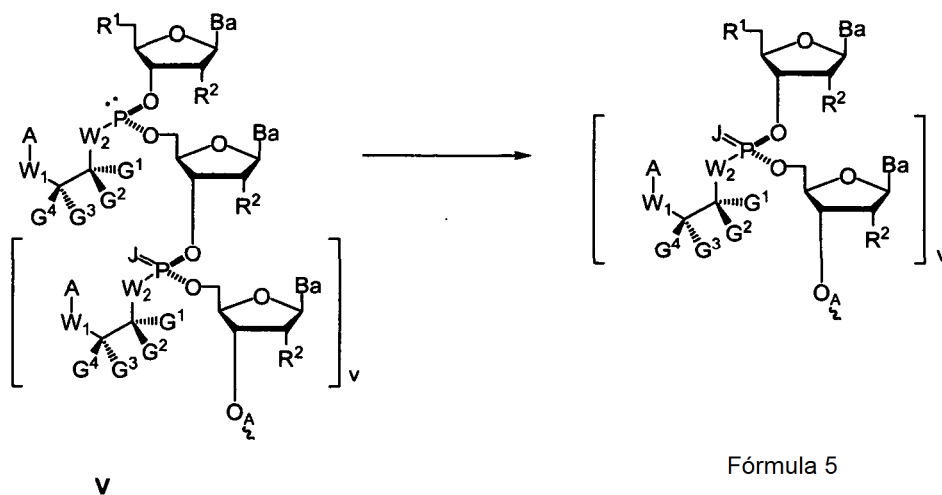
La síntesis estereoselectiva de un ácido nucleico modificado en un átomo de fósforo comprende un ciclo de alargamiento de cadena. El ciclo de alargamiento de cadena empieza con una reacción de condensación entre un compuesto que es la siguiente unidad (por ejemplo, molecular que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral) que va a añadirse al ácido nucleico y otro compuesto que comprende un resto nucleófilo libre (por ejemplo, resto hidroxilo). En algunas realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un nucleósido de monómero. En otras realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un oligómero o polímero de ácido nucleico de un ciclo de alargamiento de cadena previo como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre es un oligómero o polímero de ácido nucleico de un ciclo de alargamiento de cadena realizado usando otros métodos conocidos en la técnica.

El número de rondas de ciclos de alargamiento de cadena se determina por la longitud del ácido nucleico que se sintetiza. En algunas realizaciones, el ciclo de alargamiento de cadena se produce una vez. En otras realizaciones, el ciclo de alargamiento de cadena se repite más de una vez para lograr el alargamiento escalonado de una cadena de oligonucleótido en crecimiento con unidades de nucleótido individuales.

En una realización, se necesita una ronda del ciclo de alargamiento de cadena si un ácido nucleico es un dímero. En otra realización, se necesitan 9 rondas del ciclo de alargamiento de cadena si un ácido nucleico comprende diez unidades de nucleósido. En otra realización más, se necesitan 20 rondas del ciclo de alargamiento de cadena si van a añadirse 20 unidades de nucleósido adicionales a una cadena de ácido nucleico previamente sintetizada. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que el número de ciclos de alargamiento de cadena puede ajustarse para la longitud diana del ácido nucleico. Los ácidos nucleicos sintetizados por los métodos en el presente documento no están limitados por el número de ciclos de alargamiento de cadena como se describe en el presente documento.

Modificación del producto intermedio condensado obtenido mediante la Ruta A para introducir un resto de X-fosfonato.

**Esquema 8. Modificación del producto intermedio condensado obtenido mediante la Ruta A.**



Fórmula 5

En el compuesto de fórmula 5, R<sup>1</sup> es -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>.

Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se; R<sup>a</sup> es un resto de bloqueo.

R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo.

Cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>).

Cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>2</sup>-, alquenil-Y<sup>2</sup>-, alquinil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-.

Y<sup>2</sup> es O, NR<sup>d</sup> o S.

Cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenoil-Y<sup>1</sup>-, alquinoil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en el que R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo.

Cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo, o nucleobase modificada.

Cada caso de J es S, Se o BH<sub>3</sub>; v es un número entero de 1 a n-1.

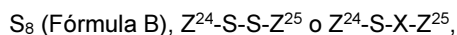
O<sub>A</sub> está conectado a un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico.

A es un resto de acilo, arilo, alquilo, aralquilo o de sililo; y G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heteroarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup> que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en el que no más de cuatro de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup>.

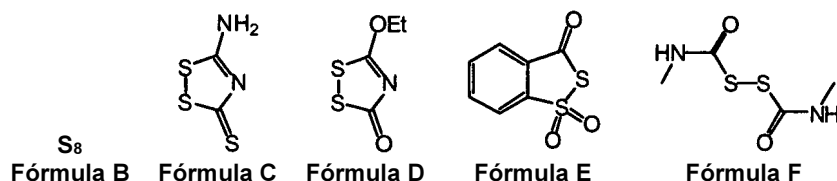
En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula 5 comprende un resto de fórmula A-I unido en el átomo de fósforo. En otras realizaciones, el compuesto de fórmula 5 comprende un resto de fórmula A unido en el átomo de fósforo. En el método ilustrado en la Ruta A, el producto intermedio condensado resultante de la adición de un nuevo nucleósido se termina para producir el compuesto de estructura V y entonces se modifica en el fósforo para introducir J, que es S, Se o BH<sub>3</sub>, produciendo un compuesto de fórmula 5, donde v es un número entero de 1 a n-1. El compuesto de fórmula 5 tanto se trata para escindir el auxiliar quiral terminado y desbloquear los grupos de bloqueo restantes como se somete a ciclos adicionales de alargamiento de cadena y modificación de fósforo. En el caso de que el ácido nucleico final sea un dímero, la terminación no es necesaria. En una realización de la estructura V, A es hidrógeno, resto de acilo, arilo, alquilo, aralquilo o de sililo. En una realización del Esquema 9, el producto intermedio condensado resultante de la adición de un nuevo nucleósido no se termina para producir un compuesto de estructura V, donde v es 0. Esta estructura V, donde v es 0, se modifica entonces en el fósforo para introducir J, que es S, Se o BH<sub>3</sub>, produciendo un compuesto de fórmula 5, donde v es un número entero de 0.

En algunas realizaciones, el agente de modificación es un electrófilo de azufre, electrófilo de selenio o agente de boración.

En algunas realizaciones, el electrófilo de azufre es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:

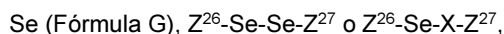


en las que Z<sup>24</sup> y Z<sup>25</sup> son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o Z<sup>24</sup> y Z<sup>25</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir; X es SO<sub>2</sub>, O o NR<sup>f</sup>; y R<sup>f</sup> es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino o arilo. En otras realizaciones, el electrófilo de azufre es un compuesto de fórmula B, C, D, E o F:



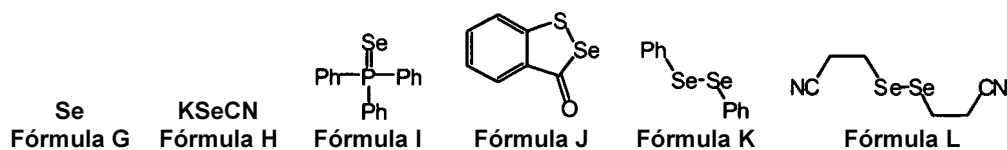
En otras realizaciones, el electrófilo de azufre es la fórmula F, fórmula E o fórmula B.

En algunas realizaciones, el electrófilo de selenio es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:



en las que Z<sup>26</sup> y Z<sup>27</sup> son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o Z<sup>26</sup> y Z<sup>27</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir; X es SO<sub>2</sub>, S, O o NR<sup>f</sup>; y R<sup>f</sup> es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino o arilo.

En otras realizaciones, el electrófilo de selenio es un compuesto de fórmula G, H, I, J, K o L.



En algunas realizaciones, el electrófilo de selenio es la fórmula G o la fórmula L.

5 En algunas realizaciones, el agente de boración es borano-*N,N*-diisopropiletilamina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{DIPEA}$ ), borano-piridina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{Py}$ ), borano-2-cloropiridina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{CPy}$ ), borano-anilina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{An}$ ), borano-tetrahidrofurano ( $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ ) o borano-sulfuro de dimetilo ( $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ ), anilina-cianoborano, trifenilfosfina-carboalcoxiboranos.

10 En otras realizaciones, el agente de boración es borano-*N,N*-diisopropiletilamina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{DIPEA}$ ), borano-2-cloropiridina ( $\text{BH}_3 \cdot \text{CPy}$ ), borano-tetrahidrofurano ( $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ ) o borano-sulfuro de dimetilo ( $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ ).

15 En realizaciones adicionales, después de la modificación del producto intermedio condensado obtenido mediante la Ruta A, el compuesto de fórmula 5 se desbloquea en la posición  $\text{R}^1$  para producir un compuesto de fórmula 4, en la que  $m$  es al menos 1,  $J$  es S, Se o  $\text{BH}_3$  y  $D$  es un resto de fórmula A. En algunas realizaciones, tras el desbloqueo de  $\text{R}^1$ , se produce un compuesto de fórmula 4 en la que  $D$  es un resto de fórmula A-I. El compuesto de fórmula 4 se hace reaccionar con un nucleósido de estructura III para producir un producto intermedio condensado. La etapa de convertir el producto intermedio condensado comprende terminar el producto intermedio condensado y modificar el producto intermedio condensado terminado para producir un compuesto de fórmula 5. En algunas realizaciones del compuesto de fórmula 5,  $v$  es mayor de 2 y menor de aproximadamente 200. Se repite opcionalmente desbloquear en la posición  $\text{R}^1$ , hacer reaccionar con un nucleósido de estructura III, terminar y modificar para formar un compuesto de fórmula 5 en la que  $v$  aumenta 1 número entero. En algunas realizaciones del compuesto de fórmula 5,  $v$  es mayor de 3 y menor de aproximadamente 200.

25 En realizaciones adicionales, el compuesto de fórmula 5 se convierte en el compuesto de fórmula 1 donde en algunas realizaciones cada resto  $\text{Ba}$  no está bloqueado. En otras realizaciones, el compuesto de fórmula 5 se convierte en el compuesto de fórmula 1 en la que no todos los restos  $\text{Ba}$  están sin bloquear.

30  $\text{R}^1$  es  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NR}^d\text{R}^d$ ,  $-\text{N}_3$ , halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $\text{Y}^1$ -, alquenil- $\text{Y}^1$ -, alquinil- $\text{Y}^1$ -, aril- $\text{Y}^1$ -, heteroaril- $\text{Y}^1$ -,  $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^e)_2$ ,  $-\text{HP}(\text{O})(\text{R}^e)$ ,  $-\text{OR}^a$  o  $-\text{SR}^c$ ; donde  $\text{Y}^1$  es O,  $\text{NR}^d$ , S o Se,  $\text{R}^a$  es un resto de bloqueo y  $\text{R}^c$  es un grupo de bloqueo. En algunas realizaciones,  $\text{R}^1$  está desbloqueado. En aún otras realizaciones,  $\text{R}^1$  sigue bloqueado.

35 Cada caso de  $\text{R}^d$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, sililo sustituido, carbamato,  $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^e)_2$  o  $-\text{HP}(\text{O})(\text{R}^e)$ , y cada caso de  $\text{R}^e$  es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $\text{Y}^2$ -, alquenil- $\text{Y}^2$ -, alquinil- $\text{Y}^2$ -, aril- $\text{Y}^2$ - o heteroaril- $\text{Y}^2$ -, o un catión que es  $\text{Na}^{+1}$ ,  $\text{Li}^{+1}$  o  $\text{K}^{+1}$ , donde  $\text{Y}^2$  es O,  $\text{NR}^d$  o S.

Cada caso de  $\text{R}^2$  es independientemente hidrógeno,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NR}^d\text{R}^d$ ,  $\text{N}_3$ , halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $\text{Y}^1$ -, alquenil- $\text{Y}^1$ -, alquinil- $\text{Y}^1$ -, aril- $\text{Y}^1$ -, heteroaril- $\text{Y}^1$ -.

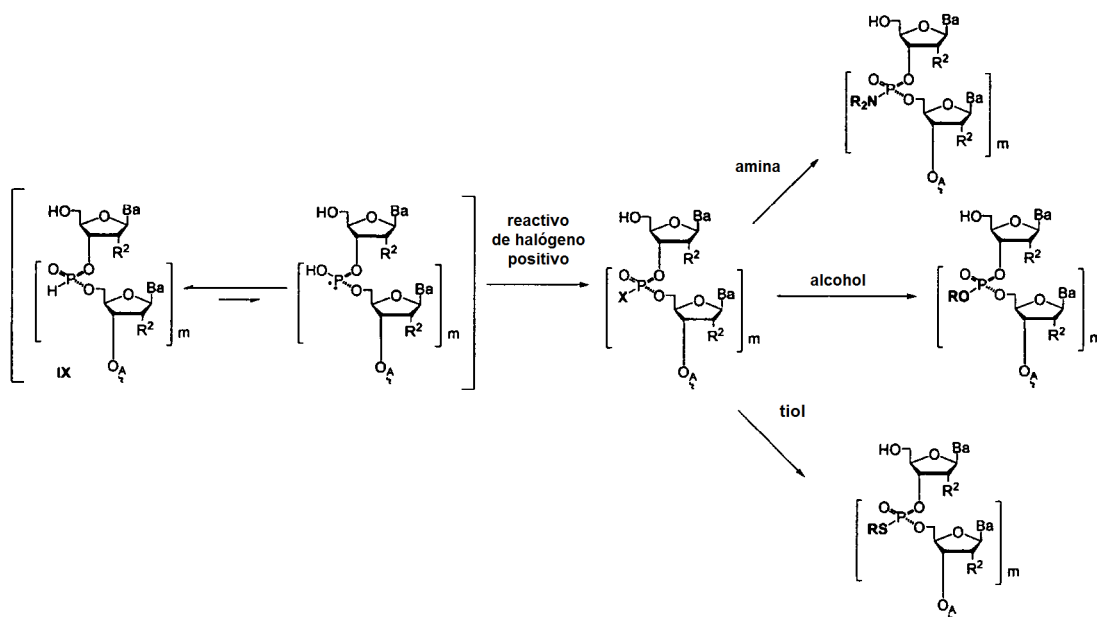
40 En algunas realizaciones,  $\text{R}^3$  es H. En otras realizaciones,  $\text{R}^3$  es un grupo de bloqueo o un resto de enlace conectado a soporte sólido, nucleósido, nucleótido o ácido nucleico. En algunas realizaciones, cada caso de  $X$  es independientemente  $-\text{S}^-\text{Z}^+$ ,  $-\text{Se}^-\text{Z}^+$  o  $-\text{BH}_3^-\text{Z}^+$ ; y  $\text{Z}^+$  es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o  $\text{Z}^+$  es un ión metálico monovalente.

45 **Modificación del compuesto de fórmula 4 obtenido mediante la Ruta B para introducir un resto de X-fosfonato.**

50 Los métodos usados para modificar el compuesto de fórmula 4 obtenido mediante la Ruta B se ilustran en los Esquemas de reacción 9a y 9b. El fosfonato y el fosfito son conocidos por tautomerizar y existir en equilibrio. El tautómero de fosfito es menos estable que el tautómero de fosfonato. El equilibrio tiende hacia el tautómero de fosfonato en condiciones neutras debido al enlace  $\text{P}=\text{O}$  muy fuerte. En condiciones ácidas, el grupo fosforilo del fosfonato llega a protonarse reversiblemente. La escisión del enlace  $\text{P}-\text{H}$  en el producto intermedio se produce lentamente para producir el producto intermedio de fosfito. La estructura IX se modifica entonces para formar la estructura XII, usando los reactivos mostrados en los Esquemas de reacción 9a y 9b.

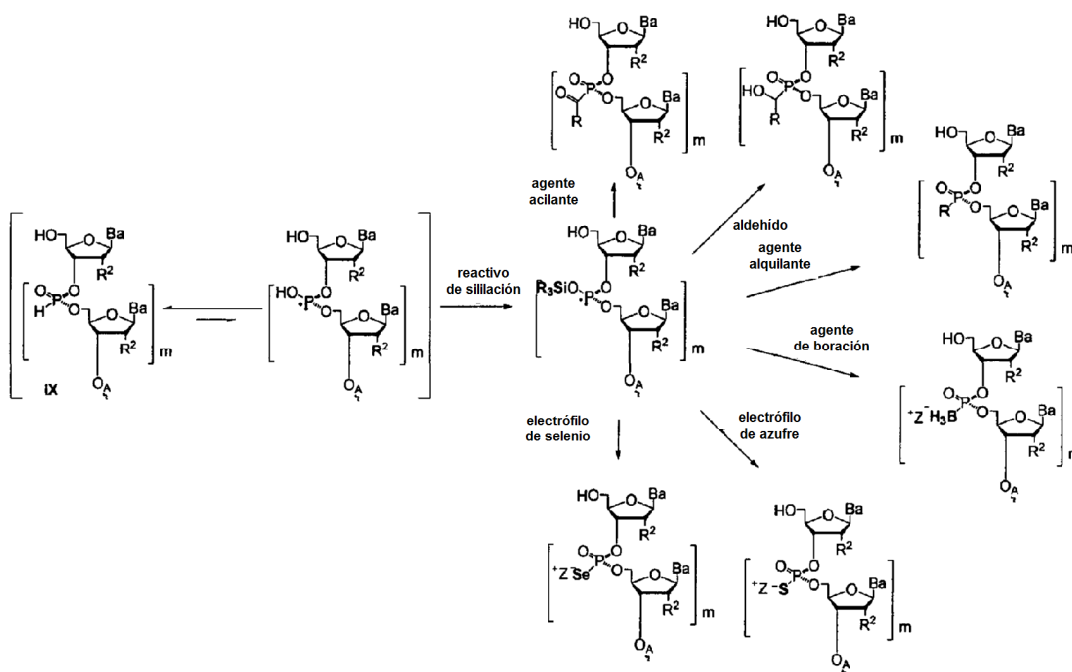


Esquema de reacción 9a. Modificación de fósforo en los productos intermedios sintetizados mediante la Ruta B, usando una halogenación inicial en el fósforo.



5

Esquema de reacción 9b. Modificación de fósforo en los productos intermedios sintetizados mediante la Ruta B, usando una siliación inicial.



10

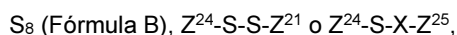
En algunas realizaciones, la etapa de modificación se realiza haciendo reaccionar la estructura IX con un reactivo de halogenación, seguido de haciendo reaccionar con un nucleófilo (Esquema 9a). En realizaciones específicas, el reactivo de halogenación es  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{Cl}_4$ ,  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{I}_2$ , cloruro de sulfurilo ( $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ), fosgeno, bis(triclorometil)carbonato (BTC), monoclorigenuro de azufre, dicloruro de azufre, cloramina,  $\text{CuCl}_2$ , *N*-clorosuccinimida (NCS), *N*-bromosuccinimida (NBS) o *N*-yodosuccinimida (NIS). En otras realizaciones específicas, el reactivo de halogenación es  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{Cl}_2$ , cloruro de sulfurilo ( $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ) o *N*-clorosuccinimida (NCS). En algunas realizaciones, el nucleófilo es aminas primarias o secundarias, alcoholes, o tioles. En otras realizaciones, el nucleófilo es  $\text{NR}^f\text{R}^f\text{H}$ ,  $\text{R}^f\text{OH}$  o  $\text{R}^f\text{SH}$ , en el que  $\text{R}^f$  es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, y al menos uno de  $\text{R}^f$  de  $\text{NR}^f\text{R}^f\text{H}$  no es hidrógeno.

20

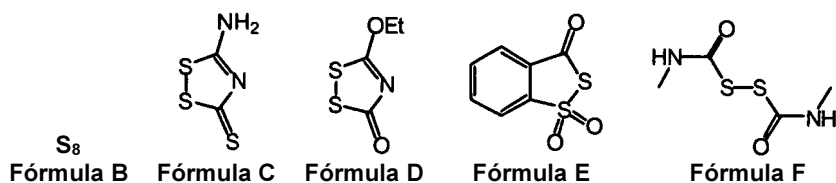
La etapa de modificación también puede realizarse haciendo reaccionar la estructura IX con un reactivo de sililación, seguido de reacción con un electrófilo de azufre, un electrófilo de selenio, un agente de boración, un agente alquilante, un aldehído o un agente acilante (Esquema 9b).

5 En realizaciones específicas, el reactivo de sililación es clorotrimetilsilano (TMS-Cl), cloruro de triisopropilsililo (TIPS-Cl), cloruro de *t*-butildimetilsililo (TBDMS-Cl), cloruro de *t*-butildifenilsililo (TBDPS-Cl), 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS), *N*-trimetilsilildimetilamina (TMSDMA), *N*-trimetilsilildietilamina (TMSDEA), *N*-trimetilsililacetamida (TMSA), *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) o *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).

10 En otras realizaciones específicas, el electrófilo de azufre es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:



15 en las que  $Z^{24}$  y  $Z^{25}$  son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o  $Z^{24}$  y  $Z^{25}$  se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir; X es  $SO_2$ , O o  $NR^f$ ; y  $R^f$  es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo. En otras realizaciones, el electrófilo de azufre es un compuesto de fórmula B, C, D, E o F:



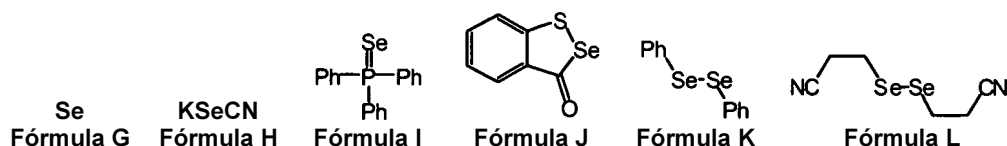
20 En otras realizaciones, el electrófilo de azufre es la fórmula F, fórmula E o fórmula B.

En algunas realizaciones, el electrófilo de selenio es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:



30 en las que  $Z^{26}$  y  $Z^{27}$  son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o  $Z^{26}$  y  $Z^{27}$  se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir; X es  $SO_2$ , S, O o  $NR^f$ ; y  $R^f$  es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

En otras realizaciones, el electrófilo de selenio es un compuesto de fórmula G, H, I, J, K o L.



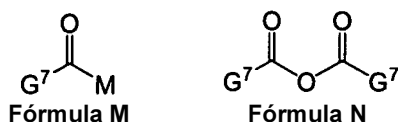
35 En algunas realizaciones, el electrófilo de selenio es la fórmula G o la fórmula L.

40 En algunas realizaciones, el agente de boración es borano-*N,N*-diisopropiletilamina ( $BH_3 \cdot DIPEA$ ), borano-piridina ( $BH_3 \cdot Py$ ), borano-2-cloropiridina ( $BH_3 \cdot CPy$ ), borano-anilina ( $BH_3 \cdot An$ ), borano-tetrahidrofurano ( $BH_3 \cdot THF$ ) o borano-sulfuro de dimetilo ( $BH_3 \cdot Me_2S$ ), anilina-cianoborano, trifenilfosfina-carboalcoxiboranos. En otras realizaciones, el agente de boración es borano-*N,N*-diisopropiletilamina ( $BH_3 \cdot DIPEA$ ), borano-2-cloropiridina ( $BH_3 \cdot CPy$ ), borano-tetrahidrofurano ( $BH_3 \cdot THF$ ) o borano-sulfuro de dimetilo ( $BH_3 \cdot Me_2S$ ).

45 En otras realizaciones, el agente alquilante es un haluro de alquilo, haluro de alquenilo, haluro de alquinilo, sulfonato de alquilo, sulfonato de alquenilo o sulfonato de alquinilo.

En otras realizaciones, el aldehído es (para)-formaldehído, alquilaldehído, alquenilaldehído, alquinilaldehído o arilaldehído.

50 En aún otras realizaciones, el agente acilante es un compuesto de fórmula M o N:



en las que G<sup>7</sup> es alquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi o heteroariloxi; y M es F, Cl, Br, I, 3-nitro-1,2,4-triazol, imidazol, alquiltriazol, tetrazol, pentafluorobenceno o 1-hidroxibenzotriazol.

5 En realizaciones adicionales, después de acidificar, el compuesto de fórmula 4, en la que m es al menos uno, J es O y D es H, se hace reaccionar con un nucleósido de estructura III para formar un producto intermedio condensado, que se convierte acidificando para producir un compuesto de fórmula 4 en la que m es al menos 2 y menos de aproximadamente 200; J es O y D es H. En otras realizaciones, el compuesto de fórmula 4 se hace reaccionar además opcionalmente con un nucleósido de estructura III para formar un producto intermedio condensado, seguido de acidificación. La reacción con el nucleósido de estructura III y la acidificación se repiten hasta que se logre un número deseado de unidades en la cadena en crecimiento. En algunas realizaciones, se produce un compuesto de fórmula 4 en la que m aumenta 1 número entero. En algunas realizaciones, se produce un compuesto de fórmula 4 en la que m es mayor de 2 y menor de aproximadamente 200. En algunas realizaciones, el producto intermedio condensado comprende un resto de fórmula A-I en lugar de un resto de fórmula A.

15 En realizaciones adicionales, el compuesto de fórmula 4 se modifica para introducir un resto X, produciendo así un compuesto de fórmula 1. En una realización del compuesto de fórmula 1, R<sup>3</sup> es un grupo de bloqueo o un resto de enlace conectado a un soporte sólido. En otras realizaciones, R<sup>1</sup> está desbloqueado. En aún otras realizaciones, el compuesto de fórmula 1 se trata de forma que R<sup>1</sup> siga bloqueado. En aún realizaciones adicionales, el compuesto de fórmula 1 se trata de forma que R<sup>1</sup> es -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquiniil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>; donde Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se, R<sup>a</sup> es un resto de bloqueo, y R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo, cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>), y cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>2</sup>-, alquenil-Y<sup>2</sup>-, alquiniil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-, o un catión que es Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>, donde Y<sup>2</sup> es O, NR<sup>d</sup> o S.

20 Cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquiniil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-. En algunas realizaciones, R<sup>2</sup> está desbloqueado. En aún otras realizaciones, R<sup>2</sup> sigue bloqueado.

30 En algunas realizaciones, cada resto Ba no está bloqueado. En otras realizaciones, no todos los restos Ba están no bloqueados. En otras realizaciones, R<sup>3</sup> es H. En algunas realizaciones, R<sup>3</sup> es un grupo de bloqueo o un resto de enlace conectado a soporte sólido, nucleósido, nucleótido o ácido nucleico. En algunas realizaciones, cada caso de X es independientemente alquilo, alcoxi, arilo, alquiltio, acilo, -NR<sup>f</sup>R<sup>f</sup>, alqueniloxi, alquiniloxi, alqueniltio, alquiniiltio, -S<sup>-</sup>Z<sup>+</sup>, -Se<sup>-</sup>Z<sup>+</sup> o -BH<sub>3</sub>Z<sup>+</sup>; cada caso de R<sup>f</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo; Z<sup>+</sup> es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o Z<sup>+</sup> es un ión metálico monovalente.

#### Condiciones de reacción y reactivos usados en los métodos de la invención

##### 40 Condiciones

Las etapas de hacer reaccionar una molécula que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral y un nucleósido que comprende un resto 5'-OH para formar un producto intermedio condensado pueden producirse sin aislar ningún producto intermedio. En algunas realizaciones, las etapas de hacer reaccionar una molécula que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral y un nucleósido que comprende un resto 5'-OH para formar un producto intermedio condensado se producen en una reacción de una sola etapa. En una realización, una molécula que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral, reactivo de condensación, reactivo quiral y compuesto que comprende un resto nucleófilo libre se añaden a la mezcla de reacción en momentos diferentes. En otra realización, una molécula que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral, reactivo de condensación y reactivo quiral están presentes en el mismo recipiente de reacción o mismo matraz. En otra realización, una molécula que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral, reactivo de condensación, reactivo quiral y compuesto que comprende un resto nucleófilo libre están presentes en el mismo recipiente de reacción o mismo matraz. Esto permite realizar la reacción sin aislamiento de productos intermedios y elimina etapas que requieren tiempo, produciendo una síntesis económica y eficiente. En realizaciones específicas, el *H*-fosfonato aquiral, reactivo de condensación, aminoalcohol quiral, nucleósido de 5'-OH están presentes al mismo tiempo en una reacción. En otra realización, la formación del producto intermedio quiral para la condensación se forma *in situ* y no se aísla antes de la reacción de condensación. En otra realización, una molécula que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral se ha activado mediante reacción con un reactivo de condensación, reactivo quiral en un recipiente de reacción diferente del que se usa cuando se hace reaccionar el producto intermedio quiral con el compuesto que comprende un resto 5'-OH libre. En una realización, un reactivo de activación se añade durante la etapa de condensación. En una realización, un reactivo de activación se añade después de que el resto de *H*-fosfonato aquiral, reactivo de condensación y reactivo quiral ya se hayan mezclado juntos. En otra realización, un reactivo de activación se añade junto con el resto de *H*-fosfonato aquiral, reactivo de condensación y reactivo quiral. Dependiendo de las condiciones de reacción, un reactivo de activación puede ser útil durante la síntesis, por ejemplo, en la etapa de condensación. Por ejemplo, si se usa piridina como base en la etapa de preactivación o condensación, no necesita estar presente un reactivo de activación tal como CMPT ya que la

piridina actúa de catalizador nucleófilo (es decir, activador). Si se usa otra base, tal como *N*-cianometilpirrolidina (CMP), que no es tan nucleófila como piridina, en la etapa de condensación, entonces el uso de un reactivo de activación, tal como CMPT, puede añadirse como reactivo de activación.

## 5 Síntesis sobre soporte sólido

En algunas realizaciones, la síntesis del ácido nucleico se realiza en solución. En otras realizaciones, la síntesis del ácido nucleico se realiza sobre fase sólida. Los grupos reactivos de un soporte sólido puede estar sin proteger o protegidos. Durante la síntesis de oligonucleótidos, un soporte sólido se trata con diversos reactivos en varios ciclos de síntesis para lograr el alargamiento escalonado de una cadena de oligonucleótidos en crecimiento con unidades de nucleótidos individuales. La unidad de nucleósidos al final de la cadena que está directamente unida al soporte sólido se llama "el primer nucleósido" como se usa en el presente documento. El primer nucleósido está unido al soporte sólido mediante un resto conector, es decir, un diradical con enlaces covalentes a tanto el polímero del soporte sólido como al nucleósido. El conector permanece intacto durante los ciclos de síntesis realizados para ensamblar la cadena de oligonucleótido y se escinde después del ensamblaje de la cadena para liberar el oligonucleótido del soporte.

Soportes sólidos para la síntesis de ácidos nucleicos en fase sólida incluyen los soportes descritos en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.659.774, 5.141.813, 4.458.066; Caruthers, patentes de EE.UU. N.º 4.415.732, 4.458.066, 4.500.707, 4.668.777, 4.973.679 y 5.132.418; Andrus et al., patentes de EE.UU. N.º 5.047.524, 5.262.530; y Koster, patentes de EE.UU. N.º 4.725.677 (reexpedida como Re34.069). En algunas realizaciones, la fase sólida es un soporte de polímero orgánico. En otras realizaciones, la fase sólida es un soporte de polímero inorgánico. En algunas realizaciones, el soporte de polímero orgánico es poliestireno, aminometilpoliestireno, un copolímero de injerto de polietilenglicol-poliestireno, poli(acrilamida), polimetacrilato, poli(alcohol vinílico), polímero altamente reticulado (HCP), u otros polímeros sintéticos, hidratos de carbono tales como celulosa y almidón, u otros hidratos de carbono poliméricos, u otros polímeros orgánicos y cualquier copolímero, material compuesto o combinación de los materiales inorgánicos u orgánicos anteriores. En otras realizaciones, el soporte de polímero inorgánico es sílice, alúmina, polividrio controlado (CPG), que es un soporte de gel de sílice, o aminopropil-CPG. Otros soportes sólidos útiles incluyen soportes sólidos fluorados (véase, por ejemplo, el documento WO/2005/070859), soportes sólidos de alquilamina de cadena larga (LCAA)-vidrio de poro controlado (CPG) (véanse, por ejemplo, S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder y G. R. Galluppi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, 661-663; G. R. Gough, M. J. Bruden y P. T. Gilham, *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, 4177-4180). Soportes de membrana y membranas poliméricas (véase por ejemplo, *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Proteins and Nucleic Acids*, ch 21 pp 157-162, 1994, Ed. Roger Epton y la patente de EE.UU. N.º 4.923.901) también son útiles para la síntesis de ácidos nucleicos. Una vez formada, una membrana puede funcionalizarse químicamente para su uso en la síntesis de ácidos nucleicos. Además de la unión de un grupo funcional a la membrana, el uso de un grupo conector o espaciador unido a la membrana puede usarse para minimizar el impedimento estérico entre la membrana y la cadena sintetizada.

Otros soportes sólidos adecuados incluyen aquellos generalmente conocidos en la técnica por ser adecuados para su uso en metodologías en fase sólida, que incluyen, por ejemplo, el vidrio comercializado como soporte Primer™ 200, vidrio de poro controlado (CPG), vidrio de poro controlado con oxalilo (véase, por ejemplo, Alul, et al., *Nucleic Acids Research*, 1991, 19, 1527), soporte TentaGel - un soporte derivatizado de aminopolietilenglicol (véase, por ejemplo, Wright, et al., *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 3373), y Poros-a copolímero de poliestireno/divinilbenceno.

Los polímeros activados en la superficie se han demostrado para su uso en la síntesis de ácidos nucleicos naturales y modificados y proteínas en varios medios de soporte sólido. El material de soporte sólido puede ser cualquier polímero adecuadamente uniforme en porosidad, tiene contenido de amina suficiente y suficientemente flexible para experimentar cualquier manipulación auxiliar sin perder integridad. Ejemplos de materiales seleccionados adecuados incluyen nailon, polipropileno, poliéster, politetrafluoroetileno, poliestireno, policarbonato y nitrocelulosa. Otros materiales pueden servir de soporte sólido, dependiendo del diseño del investigador. En vista de algunos diseños, por ejemplo, un metal recubierto, puede seleccionarse en particular oro o platino (véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N.º 20010055761). En una realización de la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, un nucleósido está anclado a un soporte sólido que está funcionalizado con restos hidroxilo o amino. Alternativamente, el soporte sólido se derivatiza para proporcionar un grupo trialcóxitrilito lábil a los ácidos, tal como un grupo trimetoxitrilito (TMT). Sin desear quedar ligado a teoría, se espera que la presencia del grupo protector de trialcóxitrilito permita la desnitrilación inicial en condiciones comúnmente usadas en sintetizadores de ADN. Para una liberación más rápida de material de oligonucleótido en solución con amoníaco acuoso, se introduce opcionalmente un conector de diglicolato sobre el soporte.

## Resto de enlace

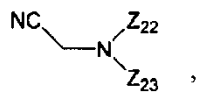
Se usa opcionalmente un resto de enlace o conector para conectar el soporte sólido con el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre. Se conocen conectores adecuados tales como moléculas cortas que sirven para conectar un soporte sólido con grupos funcionales (por ejemplo, grupos hidroxilo) de moléculas de nucleósidos iniciales en técnicas sintéticas en fase sólida. En algunas realizaciones, el resto de enlace es un conector de ácido

succinámico, o un conector de succinato (-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), o un conector de oxalilo (-CO-CO-). En otras realizaciones, el resto de enlace y el nucleósido están unidos juntos mediante un enlace éster. En otras realizaciones, el resto de enlace y el nucleósido están unidos juntos mediante un enlace amida. En realizaciones adicionales, el resto de enlace conecta el nucleósido con otro nucleótido o ácido nucleico. Conectores adecuados se desvelan en, por ejemplo, *Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach*, Ekstein, F. Ed., IRL Press, N.Y., 1991, Capítulo 1.

Se usa un resto de conector para conectar el compuesto que comprende un resto nucleófilo libre con otro nucleósido, nucleótido o ácido nucleico. En algunas realizaciones, el resto de enlace es un enlace fosfodiéster. En otras realizaciones, el resto de enlace es un resto de *H*-fosfonato. En aún otras realizaciones, el resto de enlace es un resto de *X*-fosfonato.

### Disolventes para la síntesis

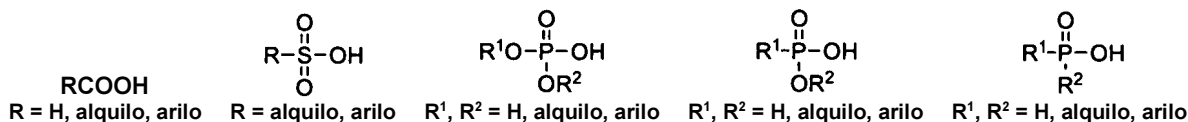
La síntesis de los ácidos nucleicos se realiza en un disolvente orgánico aprótico. En algunas realizaciones, el disolvente es acetonitrilo, piridina, tetrahidrofurano o diclorometano. En algunas realizaciones, cuando el disolvente orgánico aprótico no es básico, está presente una base en la etapa de reacción. En algunas realizaciones donde está presente una base, la base es piridina, quinolina o *N,N*-dimetilanelina o *N*-cianometilpirrolidina. Otros ejemplos de bases incluyen pirrolidina, piperidina, *N*-metilpirrolidina, piridina, quinolina, *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP), *N,N*-dimetilanelina o *N*-cianometilpirrolidina. En algunas realizaciones del método, la base es



en la que  $Z^{22}$  y  $Z^{23}$  son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, arilo o heteroarilo, o en la que cualquiera de  $Z^{22}$  y  $Z^{23}$  se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 10 miembros. En algunas realizaciones del método, la base es *N*-cianometilpirrolidina. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico aprótico es anhídrido. En otras realizaciones, el disolvente orgánico aprótico anhídrido se acaba de destilar. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico aprótico anhídrido que se acaba de destilar es piridina. En otras realizaciones el disolvente orgánico aprótico anhídrido que se acaba de destilar es tetrahidrofurano. En otras realizaciones, el disolvente orgánico aprótico anhídrido que se acaba de destilar es acetonitrilo. El disolvente puede ser una combinación de 2 o más disolventes. Dependiendo de qué disolvente se use para la síntesis, es útil la adición de un reactivo de activación.

### Condiciones de acidificación para eliminar grupos de bloqueo.

La acidificación para eliminar grupos de bloqueo se lleva a cabo por un ácido de Brønsted o ácido de Lewis. En algunas realizaciones, la acidificación se usa para eliminar grupos de bloqueo  $R^1$ . Ácidos de Brønsted útiles son ácidos carboxílicos, ácidos alquilsulfónicos, ácidos arilsulfónicos, ácido fosfórico y sus derivados, ácido fosfónico y sus derivados, ácidos alquilfosfónicos y sus derivados, ácidos arilfosfónicos y sus derivados, ácido fosfínico, ácidos dialquilfosfínicos y ácidos diarilfosfínicos que tiene un valor de pKa (25 °C en agua) de -0,6 (ácido trifluoroacético) a 4,76 (ácido acético) en un disolvente orgánico o agua (en el caso del ácido acético del 80 %). La concentración del ácido (1 al 80 %) usada en la etapa de acidificación depende de la acidez del ácido. Debe tenerse consideración a la concentración de ácido, ya que condiciones de ácido fuerte producirán despurinación/despirimidinación, en las que las bases de purinilo o pirimidinilo se escinden del anillo de ribosa.



En algunas realizaciones, la acidificación se lleva a cabo por un ácido de Lewis en un disolvente orgánico. Ácidos de Lewis útiles son  $\text{ZnX}_2$  en el que X es Cl, Br, I o  $\text{CF}_3\text{SO}_3$ .

En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir una cantidad de un ácido de Brønsted o de Lewis eficaz para convertir el producto intermedio condensado en el compuesto de fórmula 4 sin eliminar los restos de purina del producto intermedio condensado.

Ácidos que son útiles en la etapa de acidificación también incluyen, pero no se limitan a, 10 % de ácido fosfórico en un disolvente orgánico, 10 % de ácido clorhídrico en un disolvente orgánico, 1 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico, 3 % de ácido dicloroacético en un disolvente orgánico u 80 % de ácido acético en agua. La concentración de cualquier ácido de Brønsted o de Lewis usada en el proceso se selecciona de forma que la concentración del ácido no supere una concentración que produce la escisión de la nucleobase del resto de azúcar.

En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir 1 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 8 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico. En otras realizaciones, la acidificación comprende añadir 3 % de ácido dicloroacético en un disolvente orgánico. En otras realizaciones, la acidificación comprende añadir aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de ácido dicloroacético en un disolvente orgánico. En aún otras realizaciones, la acidificación comprende añadir 3 % de ácido tricloroacético en un disolvente orgánico. En aún otras realizaciones, la acidificación comprende añadir aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de ácido tricloroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir 80 % de ácido acético en agua. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 %, o aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 70 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % de ácido acético en agua. En algunas realizaciones, la acidificación comprende la adición adicional de secuestrantes de cationes al disolvente ácido. En realizaciones específicas, los secuestrantes de cationes pueden ser trietilsilano o triisopropilsilano. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> se desbloquea antes de la etapa de acidificar el producto intermedio condensado. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> se desbloquea por acidificación, que comprende añadir 1 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> se desbloquea por acidificación, que comprende añadir 3 % de ácido dicloroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> se desbloquea por acidificación, que comprende añadir 3 % de ácido tricloroacético en un disolvente orgánico.

#### Eliminación de restos o grupos de bloqueo.

Grupos funcionales tales como restos hidroxilo o amino que se localizan en nucleobases o restos de azúcar se bloquean rutinariamente con grupos (restos) de bloqueo (protectores) durante la síntesis y posteriormente se desbloquean. En general, un grupo de bloqueo convierte una funcionalidad química de una molécula inerte en condiciones de reacción específicas y puede después eliminarse de tal funcionalidad en una molécula sin dañar sustancialmente el resto de la molécula (véase, por ejemplo, Green and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1991). Por ejemplo, pueden bloquearse grupos amino con grupos de bloqueo de nitrógeno tales como ftalimido, 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), trifenilmetilsulfenilo, *t*-BOC, 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr), 4-metoxitritilo (MMTr), 9-fenilxantín-9-ilo (Pixyl), tritilo (Tr), o 9-(*p*-metoxifenil)xantín-9-ilo (MOX). Pueden protegerse grupos carboxilo como grupos acetilo. Pueden protegerse grupos hidroxilo tales como tetrahidropirano (THP), *t*-butildimetilsililo (TBDMS), 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (Ctmp), 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo (Fpmp), 1-(2-cloroetoxi)etilo, 3-metoxi-1,5-dicarbometoxipentán-3-ilo (MDP), bis(2-acetoxietoxi)metilo (ACE), triisopropilsililoximetilo (TOM), 1-(2-cianoetoxi)etilo (CEE), 2-cianoetoximetilo (CEM), [4-(*N*-dicloroacetil-*N*-metilamino)benciloxi]metilo, 2-cianoetilo (CN), pivaloiloximetilo (PivOM), levuniloximetilo (ALE). Se han descrito otros grupos de bloqueo hidroxilo representativos (véase, por ejemplo, Beauchage et al., *Tetrahedron*, 1992, 46, 2223). En algunas realizaciones, grupos de bloqueo de hidroxilo son grupos lábiles a los ácidos, tales como tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo, 9-fenilxantín-9-ilo (Pixyl) y 9-(*p*-metoxifenil)xantín-9-ilo (MOX). También pueden bloquearse grupos funcionales químicos incluyéndolos en una forma de precursor. Así, un grupo azido puede considerarse una forma bloqueada de una amina, ya que el grupo azido se convierte fácilmente en la amina. Se conocen grupos protectores representativos adicionales utilizados en la síntesis de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Agrawal et al., *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, Eds., Humana Press, New Jersey, 1994, Vol. 26, pp. 1-72).

Se conocen diversos métodos y se usan para la eliminación de grupos de bloqueo de los ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, se eliminan todos los grupos de bloqueo. En otras realizaciones, los grupos de bloqueo se eliminan parcialmente. En aún otras realizaciones, pueden ajustarse las condiciones de reacción para eliminar grupos de bloqueo en ciertos restos. En ciertas realizaciones donde R<sup>2</sup> es un grupo de bloqueo, la eliminación del grupo de bloqueo en R<sup>2</sup> es ortogonal a la eliminación del grupo de bloqueo en R<sup>1</sup>. Los grupos de bloqueo en R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> siguen intactos durante las etapas de síntesis y se eliminan conjuntamente después del ensamblaje de cadena. En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo R<sup>2</sup> se elimina simultáneamente con la escisión de los ácidos nucleicos del soporte sólido y con la eliminación de los grupos de bloqueo de nucleobases. En realizaciones específicas, se elimina el grupo de bloqueo en R<sup>1</sup>, mientras que los grupos de bloqueo en R<sup>2</sup> y las nucleobases siguen intactos. Los grupos de bloqueo en R<sup>1</sup> son escindibles sobre soportes sólidos con una base orgánica tal como una amina primaria, una amina secundaria, o una mezcla de las mismas. El desbloqueo de la posición R<sup>1</sup> se denomina comúnmente desprotección del extremo delantero.

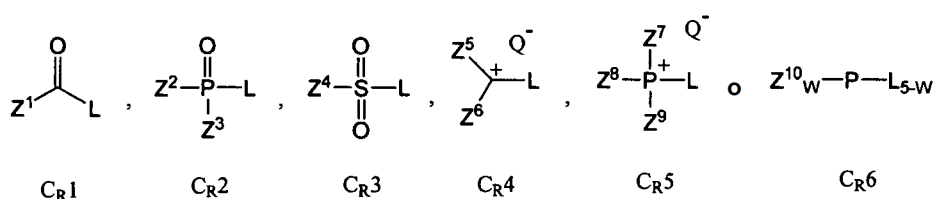
En una realización, los grupos de bloqueo de nucleobases, si están presentes, son escindibles después del ensamblaje del ácido nucleico respectivo con un reactivo ácido. En otra realización, uno o más de los grupos de bloqueo de nucleobases es escindible en condiciones ni ácidas ni básicas, por ejemplo, escindible con sales de fluoruro o complejos de ácido fluorhídrico. En otra realización más, uno o más de los grupos de bloqueo de nucleobases es escindible después del ensamblaje del ácido nucleico respectivo en presencia de base o un disolvente básico, y en la que el grupo de bloqueo de nucleobases es estable a las condiciones de la etapa de desprotección del extremo delantero con aminas.

En algunas realizaciones, no se requieren grupos de bloqueo para nucleobases. En otras realizaciones, se requieren grupos de bloqueo para nucleobases. En aún otras realizaciones, ciertas nucleobases requieren grupo de bloqueo mientras que otras nucleobases no requieren grupos de bloqueo. En realizaciones donde las nucleobases se bloquean, los grupos de bloqueo se eliminan tanto completamente como parcialmente en condiciones apropiadas para eliminar el grupo de bloqueo en el extremo delantero. Por ejemplo, R<sup>1</sup> puede indicar OR<sup>a</sup>, en el que R<sup>a</sup> es acilo, y Ba indica guanina bloqueada con un grupo acilo que incluye, pero no se limita a, isobutirilo, acetilo o 4-(*terc*-butilfenoxi)acetilo. Los grupos acilo en R<sup>1</sup> y Ba se eliminarán o eliminarán parcialmente durante la misma etapa de desbloqueo.

10 **Reactivos**

**Reactivo de condensación.**

El reactivo de condensación (CR) útil en los métodos de la invención tiene una de las siguientes fórmulas generales: Ar<sub>3</sub>PL<sub>2</sub>, y (ArO)<sub>3</sub>PL<sub>2</sub>,



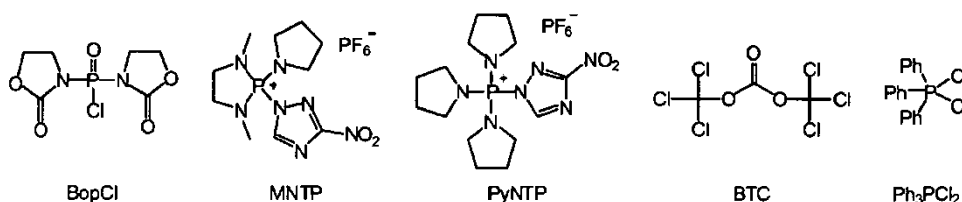
en las que Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, Z<sup>3</sup>, Z<sup>4</sup>, Z<sup>5</sup>, Z<sup>6</sup>, Z<sup>7</sup>, Z<sup>8</sup>, Z<sup>9</sup> y Z<sup>10</sup> están seleccionados independientemente de alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi o heteroariloxi, o en las que cualquiera de Z<sup>2</sup> y Z<sup>3</sup>, Z<sup>5</sup> y Z<sup>6</sup>, Z<sup>7</sup> y Z<sup>8</sup>, Z<sup>8</sup> y Z<sup>9</sup>, Z<sup>9</sup> y Z<sup>7</sup>, o Z<sup>7</sup> y Z<sup>8</sup> y Z<sup>9</sup> se toma conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 20 miembros; Q<sup>-</sup> es un contraión; w es un número entero de 0 a 3; L es un grupo saliente; y Ar es arilo, heteroarilo y/o uno del grupo Ar está unido al soporte de polímero.

En algunas realizaciones, el contraión del reactivo de condensación C<sub>R</sub> es Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, TfO<sup>-</sup>, Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>, AsF<sub>6</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> o SbF<sub>6</sub><sup>-</sup>, en el que Tf es CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, el grupo saliente del reactivo de condensación C<sub>R</sub> es F, Cl, Br, I, 3-nitro-1,2,4-triazol, imidazol, alquiltriazol, tetrazol, pentafluorobenceno o 1-hidroxibenzotriazol.

Ejemplos de agentes de condensación que pueden usarse en el proceso incluyen, y no se limitan a, cloruro de pentafluorobenzóilo, carbonildiimidazol (CDI), 1-mesitilensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT), clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI-HCl), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (PyBOP), cloruro *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl), hexafluorofosfato de 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) y hexafluorofosfato de *O*-benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU), DIPCDI; bromuro *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopBr), hexafluorofosfato de 1,3-dimetil-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-il)-2-pirrolidin-1-il-1,3,2-diazafosfolidinio (MNTP), hexafluorofosfato de 3-nitro-1,2,4-triazol-1-il-tris(pirrolidin-1-il)fosfonio (PyNTP), hexafluorofosfato de bromotripirrolidinofosfonio (PyBrOP); tetrafluoroborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (TBTU); hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio (TFFH); (PhO)<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>, y bis(triclorometil)carbonato (BTC). En ciertas realizaciones, el contraión del reactivo de condensación C<sub>R</sub> es Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, TfO<sup>-</sup>, Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>, AsF<sub>6</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, o SbF<sub>6</sub><sup>-</sup>, en el que Tf es CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>.

En otras realizaciones de la invención, el reactivo de condensación es 1-(2,4,6-triisopropilbencenosulfonyl)-5-(piridin-2-il)tetrazolida, cloruro de pivaloilo, hexafluorofosfato de bromotrispirrolidinofosfonio, cloruro *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl), (PhO)<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>, o 2-cloro-5,5-dimetil-2-oxo-1,3,2-dioxafosfinano, bis(triclorometil)carbonato (BTC) o Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>. En una realización, el reactivo de condensación es cloruro *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl). En una realización, el reactivo de condensación es bis(triclorometil)carbonato (BTC). En una realización, el reactivo de condensación es Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>. Se han descrito otros reactivos de condensación conocidos (véase, por ejemplo, el documento WO/2006/066260).

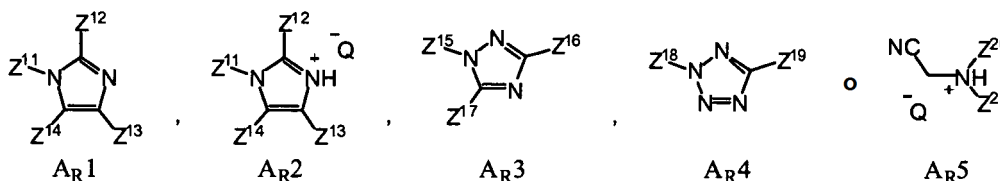
En otras realizaciones, el reactivo de condensación es hexafluorofosfato de 1,3-dimetil-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-il)-2-pirrolidin-1-il-1,3,2-diazafosfolidinio (MNTP), hexafluorofosfato de 3-nitro-1,2,4-triazol-1-il-tris(pirrolidin-1-il)fosfonio (PyNTP), bis(triclorometil)carbonato (BTC), (PhO)<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> o Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>.



**Reactivo de activación.**

El reactivo de activación útil en el presente documento debe tener una fuerte capacidad de donar protones para ser capaz de activar el producto intermedio quiral para la reacción con un compuesto que comprende un resto nucleófilo libre. En una realización, el producto intermedio quiral es la estructura III mostrada en el Esquema 5 o 6 o es la estructura III<sub>r</sub> mostrada en el Esquema 7. El reactivo de activación actúa protonando el átomo de nitrógeno de estructura III o III<sub>r</sub> cuando W1 es un nitrógeno. El uso de un reactivo de activación depende de los disolventes usados para la síntesis.

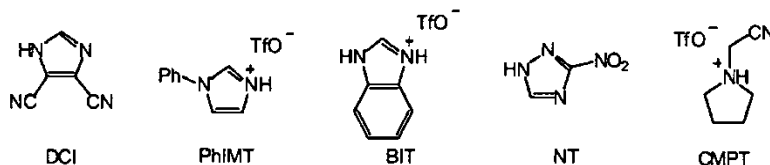
El reactivo de activación (A<sub>R</sub>) útil en el método de la invención tiene una de las siguientes fórmulas generales:



Z<sup>11</sup>, Z<sup>12</sup>, Z<sup>13</sup>, Z<sup>14</sup>, Z<sup>15</sup>, Z<sup>16</sup>, Z<sup>17</sup>, Z<sup>18</sup>, Z<sup>19</sup>, Z<sup>20</sup> y Z<sup>21</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi o heteroariloxi, o en las que cualquiera de Z<sup>11</sup> y Z<sup>12</sup>, Z<sup>11</sup> y Z<sup>13</sup>, Z<sup>11</sup> y Z<sup>14</sup>, Z<sup>12</sup> y Z<sup>13</sup>, Z<sup>12</sup> y Z<sup>14</sup>, Z<sup>13</sup> y Z<sup>14</sup>, Z<sup>15</sup> y Z<sup>16</sup>, Z<sup>15</sup> y Z<sup>17</sup>, Z<sup>16</sup> y Z<sup>17</sup>, Z<sup>18</sup> y Z<sup>19</sup>, o Z<sup>20</sup> y Z<sup>21</sup>, se toma conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 20 miembros, o para formar un anillo aromático de 5 o 20 miembros. Q<sup>-</sup> es un contraión. En algunas realizaciones del método, el contraión del reactivo de activación A<sub>R</sub> es Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, TfO<sup>-</sup>, Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>, AsF<sub>6</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> o SbF<sub>6</sub><sup>-</sup>, en el que Tf es CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>.

En algunas realizaciones del método, el reactivo de activación es imidazol, 4,5-dicianoimidazol (DCI), 4,5-dicloroimidazol, triflato de 1-fenilimidazolio (PhIMT), triflato de bencimidazolio (BIT), benzotriazol, 3-nitro-1,2,4-triazol (NT), tetrazol, 5-etiltiotetrazol, 5-(4-nitrofenil)tetrazol, triflato de N-cianometilpirrolidinio (CMPT), triflato de N-cianometilpiperidinio, triflato de N-cianometildimetilamonio.

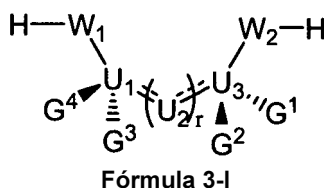
En algunas realizaciones del método, el reactivo de activación es 4,5-dicianoimidazol (DCI), triflato de 1-fenilimidazolio (PhIMT), triflato de bencimidazolio (BIT), 3-nitro-1,2,4-triazol (NT), tetrazol o triflato de N-cianometilpirrolidinio (CMPT).



En algunas realizaciones del método, el reactivo de activación es triflato de N-cianometilpirrolidinio (CMPT).

**Reactivo quiral.**

En los métodos de la presente invención, se usan reactivos quirales para conferir estereoselectividad en la producción de enlaces de X-fosfonato. Pueden usarse muchos auxiliares quirales diferentes en este proceso que son compuestos de fórmula 3-I donde W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son cualquiera de -O-, -S- o -NG<sup>5</sup>-, que son capaces de reaccionar con el material de partida de H-fosfonato, un compuesto de fórmula 2 para formar el producto intermedio quiral, como se muestra en la estructura III de los Esquemas 5 y 6.



U<sub>1</sub> y U<sub>3</sub> son átomos de carbono que están unidos a U<sub>2</sub> si está presente, o entre sí si r es 0, mediante un enlace sencillo, doble o triple. U<sub>2</sub> es -C-, -CG<sup>8</sup>-, -CG<sup>8</sup>G<sup>8</sup>-, -NG<sup>8</sup>-, -N-, -O- o -S- donde r es un número entero de 0 a 5 y no más de dos heteroátomos son adyacentes. Cuando uno cualquiera de U<sub>2</sub> es C, debe formarse un triple enlace entre un segundo caso de U<sub>2</sub>, que es C, o con uno de U<sub>1</sub> o U<sub>3</sub>. Similarmente, cuando uno cualquiera de U<sub>2</sub> es CG<sup>8</sup>, se forma un doble enlace entre un segundo caso de U<sub>2</sub> que es -CG<sup>8</sup>- o -N-, o con uno de U<sub>1</sub> o U<sub>3</sub>.

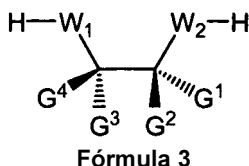


Por ejemplo, en algunas realizaciones,  $-U_1-(U_2)_r-U_3-$  es  $-CG^3G^4-CG^1G^2-$ . En algunas realizaciones,  $-U_1-(U_2)_r-U_3-$  es  $-CG^3=CG^1-$ . En algunas realizaciones,  $-U_1-(U_2)_r-U_3-$  es  $-C\equiv C-$ . En algunas realizaciones,  $-U_1-(U_2)_r-U_3-$  es  $-CG^3=CG^8-CG^1G^2-$ . En algunas realizaciones,  $-U_1-(U_2)_r-U_3-$  es  $-CG^3G^4-O-CG^1G^2-$ . En algunas realizaciones,  $-U_1-(U_2)_r-U_3-$  es  $-CG^3G^4-NG^8-CG^1G^2-$ . En algunas realizaciones,  $-U_1-(U_2)_r-U_3-$  es  $-CG^3G^4-N-CG^2-$ . En algunas realizaciones,  $-U_1-(U_2)_r-U_3-$  es  $-CG^3G^4-N=C-G^8-CG^1G^2-$ .

$G^1, G^2, G^3, G^4, G^5$  y  $G^8$  son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, hetarilo o arilo, o dos de  $G^1, G^2, G^3, G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$  tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, y está condensado o sin condensar. En algunas realizaciones, el anillo así formado está sustituido con restos oxo, tioxo, alquilo, alqueno, alquino, heteroarilo o arilo. En algunas realizaciones, cuando el anillo formado tomando dos  $G^6$  juntos está sustituido, está sustituido con un resto que es lo suficientemente voluminoso para conferir estereoselectividad durante la reacción.

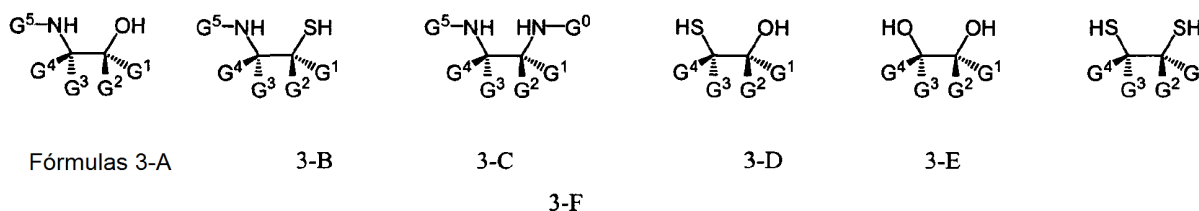
Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anillo formado tomando dos de  $G^6$  juntos es ciclopentilo, pirrolilo, ciclopropilo, ciclohexenilo, ciclopentenilo, tetrahidropiranilo o piperazinilo.

En algunas realizaciones de la invención, el reactivo quiral es un compuesto de fórmula 3.



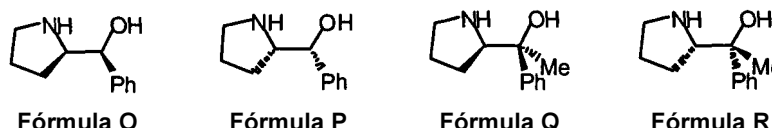
En algunas realizaciones de fórmula 3,  $W_1$  y  $W_2$  son independientemente  $-NG^5-$ ,  $-O-$  o  $-S-$ ;  $G^1, G^2, G^3, G^4$  y  $G^5$  son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, hetarilo o arilo, o dos de  $G^1, G^2, G^3, G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$  que tomados conjuntamente forman un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y no más de cuatro de  $G^1, G^2, G^3, G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$ . Similarmente a los compuestos de fórmula 3', cualquiera de  $G^1, G^2, G^3, G^4$  o  $G^5$  están sustituidos con restos oxo, tioxo, alquilo, alqueno, alquino, heteroarilo o arilo. En algunas realizaciones, tal sustitución induce la estereoselectividad en la producción de X-fosfonato.

En algunas realizaciones de la invención, el reactivo quiral tiene una de las siguientes fórmulas:



En algunas realizaciones, el reactivo quiral es un aminoalcohol. En algunas otras realizaciones, el reactivo quiral es un aminotiol. En aún otras realizaciones, el reactivo quiral es un aminofenol. En algunas realizaciones, el reactivo quiral es (S)- y (R)-2-metilamino-1-feniletanol, (1R, 2S)-efedrina o (1R, 2S)-2-metilamino-1,2-difeniletanol.

En otras realizaciones de la invención, el reactivo quiral es un compuesto de una de las siguientes fórmulas:

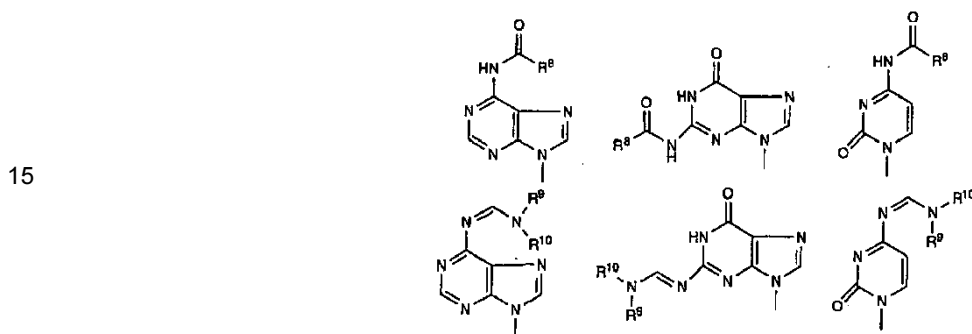


La elección del reactivo quiral, por ejemplo, el isómero representado por la fórmula O o su estereoisómero, fórmula P, permite el control específico de la quiralidad en el fósforo. Así, puede seleccionarse tanto una configuración  $R_P$  como  $S_P$  en cada ciclo de síntesis, permitiendo el control de la estructura tridimensional global del producto de ácido nucleico. En algunas realizaciones de la invención, un producto de ácido nucleico tiene todos los estereocentros  $R_P$ . En algunas realizaciones de la invención, un producto de ácido nucleico tiene todos los estereocentros  $S_P$ . En algunas realizaciones, la selección de los centros  $R_P$  y  $S_P$  se hace para conferir una superestructura tridimensional específica a la cadena de ácido nucleico.

**Nucleobases y nucleobases modificadas**

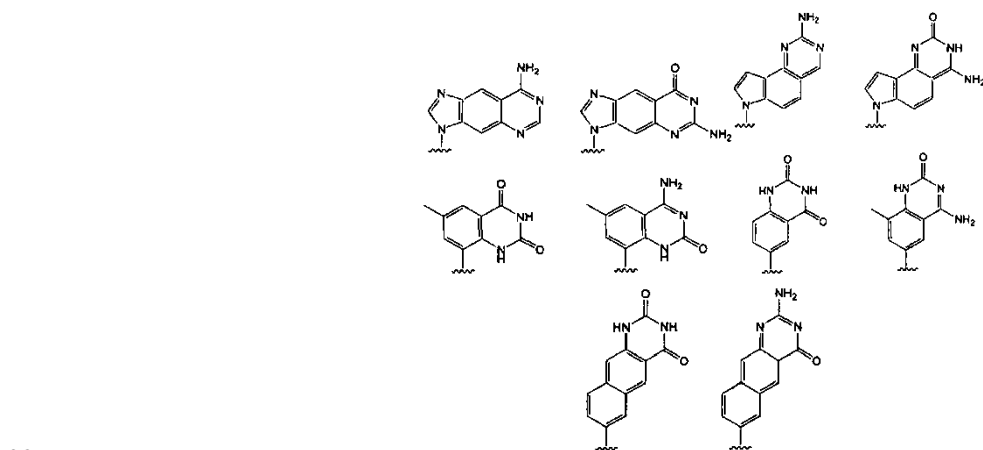
La nucleobase Ba en la fórmula 1 es una nucleobase natural o una nucleobase modificada derivada de nucleobases naturales. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, uracilo, timina, adenina, citosina y guanina que tienen sus grupos amino respectivos protegidos con grupos protectores de acilo, 2-fluorouracilo, 2-fluorocitosina, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 2,6-diaminopurina, azacitosina, análogos de pirimidina tales como pseudoisocitosina y pseudouracilo, y otras nucleobases modificadas tales como purinas sustituidas en 8, xantina o hipoxantina (siendo las dos últimas los productos de degradación naturales). Las nucleobases modificadas desveladas en Chiu y Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196 y Revankar y Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313, también se contemplan como restos de Ba de fórmula 1.

Los compuestos representados por las siguientes fórmulas generales también se contemplan como nucleobases modificadas:

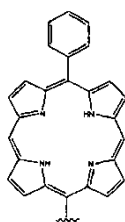


20 En las fórmulas anteriores, R<sup>8</sup> es un grupo alquilo, arilo, aralquilo o ariloxilalquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 15 átomos de carbono, que incluye, a modo de ejemplo solo, un grupo metilo, isopropilo, fenilo, bencilo o fenoximetilo; y cada uno de R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> representa un grupo alquilo lineal o ramificada que tiene 1 a 4 átomos de carbono.

25 Nucleobases modificadas también incluyen nucleobases de tamaño expandido en las que se han añadido uno o más anillos de benceno. Las sustituciones de bases nucleicas descritas en el catálogo de Glen Research ([www.glenresearch.com](http://www.glenresearch.com)); Krueger AT et al. Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A., et al., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627, se contemplan como útiles para la síntesis de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento. Algunos ejemplos de esas nucleobases de tamaño expandido se muestran a continuación:

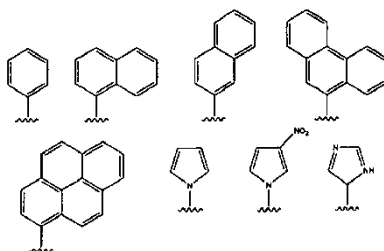


35 En el presente documento, las nucleobases modificadas también engloban estructuras que no se consideran nucleobases, sino que son otros restos tales como, pero no se limitan a, anillos derivados de corrina o porfirina. Las sustituciones de bases derivadas de porfirina se han descrito en Morales-Rojas, H y Kool, ET, Org. Lett., 2002, 4, 4377-4380. A continuación se muestra un ejemplo de un anillo derivado de porfirina que puede usarse como sustitución de base:



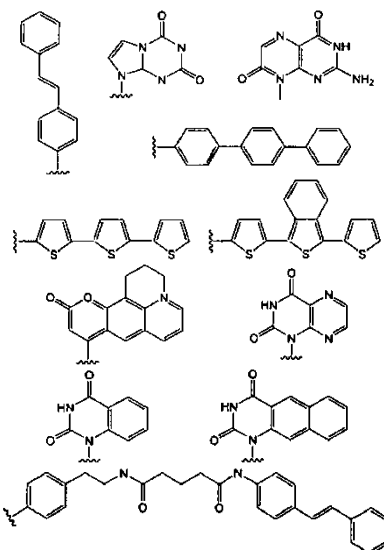
Otras nucleobases modificadas también incluyen sustituciones de bases tales como aquellas mostradas a continuación:

5



También se contemplan nucleobases modificadas que son fluorescentes. Ejemplos no limitantes de estas sustituciones de bases incluyen fenantreno, pireno, estilbeno, isoxantina, isozantopterina, terfenilo, tertiofeno, benzotertiofeno, cumarina, lumazina, estilbeno unido, benzo-uracilo y nafto-uracilo, como se muestran a continuación:

10



15

Las nucleobases modificadas pueden estar sin sustituir o contener sustituciones adicionales tales como heteroátomos, grupos alquilo, o restos de enlace conectados a restos fluorescentes, restos de biotina o avidina, u otra proteína o péptidos. Las nucleobases modificadas también incluyen ciertas 'bases universales' que no son nucleobases en el sentido más clásico, pero funcionan similarmente a las nucleobases. Un ejemplo representativo de una base universal tal es 3-nitropirrol.

25

Además de los nucleósidos de estructura IV o IX, también pueden usarse otros nucleósidos en el proceso desvelado en el presente documento e incluyen nucleósidos que incorporan nucleobases modificadas, o nucleobases covalentemente unidas a azúcares modificados. Algunos ejemplos de nucleósidos que incorporan nucleobases modificadas incluyen 4-acetilcitidina; 5-(carboxihidroxi)metiluridina; 2'-O-metilcitidina; 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina; 5-carboximetilaminometiluridina; dihidrouridina; 2'-O-metilpseudouridina; beta,D-galactosilqueosina; 2'-O-metilguanosina; N<sup>6</sup>-isopenteniladenosina; 1-metiladenosina; 1-metilpseudouridina; 1-metilguanosina; 1-metilinosina; 2,2-dimetilguanosina; 2-metiladenosina; 2-metilguanosina; N<sup>7</sup>-metilguanosina; 3-metil-citidina; 5-metilcitidina; N<sup>6</sup>-metiladenosina; 7-metilguanosina; 5-metilaminoetiluridina; 5-metoxiaminometil-2-tiouridina; beta,D-manosilqueosina; 5-metoxicarbonilmetiluridina; 5-metoxiuridina; 2-metil-N<sup>6</sup>-isopenteniladenosina; N-((9-beta,D-ribofuranosil-2-metilpurina-6-il)carbamoil)treonina; N-((9-beta,D-ribofuranosilpurina-6-il)-N-metilcarbamoil)treonina; éster metílico de ácido uridin-5-oxiacético; ácido uridin-5-oxiacético (v); pseudouridina; queosina; 2-tiocitidina; 5-metil-2-tiouridina;

30

35

2-thiouridina; 4-thiouridina; 5-metiluridina; 2'-O-metil-5-metiluridina; y 2'-O-metiluridina.

En algunas realizaciones, los nucleósidos incluyen análogos de nucleósidos bicíclicos modificados en 6' que tienen tanto quiralidad (R) como (S) en la posición 6' e incluyen los análogos descritos en la patente de EE.UU. N.º 7.399.845. En otras realizaciones, los nucleósidos incluyen análogos de nucleósidos bicíclicos modificados en 5' que tienen tanto quiralidad (R) como (S) en la posición 5' e incluyen los análogos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20070287831.

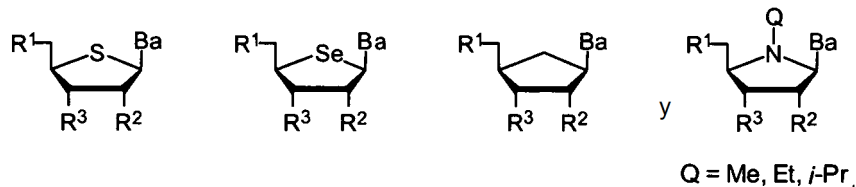
En algunas realizaciones, las nucleobases o nucleobases modificadas comprenden restos de unión a biomoléculas tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, biotina, avidina, estreptavidina, ligandos de receptor o restos quelantes. En otras realizaciones, Ba es 5-bromouracilo, 5-yodouracilo o 2,6-diaminopurina. En aún otras realizaciones, Ba se modifica por sustitución con un resto fluorescente o de unión a biomolécula. En algunas realizaciones, el sustituyente en Ba es un resto fluorescente. En otras realizaciones, el sustituyente en Ba es biotina o avidina.

#### Azúcares modificados del nucleótido/nucleósido

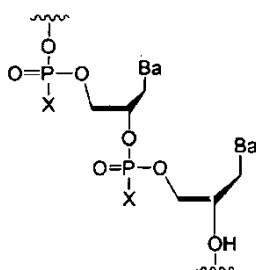
Los nucleótidos que existen de forma natural más comunes son azúcares de ribosa unidos a las nucleobases adenosina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T) o uracilo (U). También se contemplan nucleótidos modificados en los que el grupo fosfato o los restos de átomos de fósforo modificados en los nucleótidos pueden unirse a diversas posiciones del azúcar o azúcar modificado. Como ejemplos no limitantes, el grupo fosfato o el resto de átomo de fósforo modificado puede unirse en el resto hidroxilo 2', 3', 4' o 5' de un azúcar o azúcar modificado. Los nucleótidos que incorporan las nucleobases modificadas descritas anteriormente también pueden usarse en el proceso desvelado en el presente documento. En algunas realizaciones, los nucleótidos o nucleótidos modificados que comprenden un resto -OH no protegido se usan en el proceso desvelado en el presente documento.

Además del resto de ribosa descrito en los Esquemas 1-4b, también pueden incorporarse otros azúcares modificados en los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, los azúcares modificados contienen uno o más sustituyentes en la posición 2' que incluyen uno de los siguientes: F; CF<sub>3</sub>, CN, N<sub>3</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, O-alquil-N-alquilo o N-alquil-O-alquilo en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> y alquino sustituidos o sin sustituir. Ejemplos de sustituyentes incluyen, y no se limitan a, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub> y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, en los que n es de 1 a aproximadamente 10, MOE, DMAOE, DMAEOE. También se contemplan en el presente documento azúcares modificados descritos en el documento WO 2001/088198; y Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504. En algunas realizaciones, los azúcares modificados comprenden grupos sustituidos con sililo, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, una marca fluorescente, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ácido nucleico, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ácido nucleico, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Las modificaciones pueden hacerse en las posiciones 2', 3', 4', 5' o 6' del azúcar o azúcar modificado, que incluyen la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en la posición 5' del nucleótido del extremo 5'.

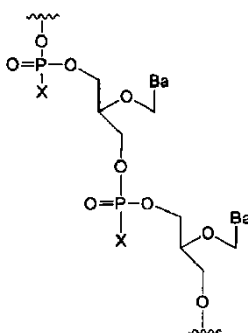
Los azúcares modificados también incluyen miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo o ciclopentilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificado incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N.º: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; y 5.359.044. Algunos azúcares modificados que se contemplan incluyen



Otros ejemplos no limitantes de azúcares modificados incluyen glicerol, que forman análogos de ácido nucleico de glicerol (GNA). Un ejemplo de un análogo de GNA se muestra a continuación y se describe en Zhang, R et al., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 5846-5847; Zhang L, et al., J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 4174-4175 y Tsai CH et al., PNAS, 2007, 14598-14603:



5 en la que X es como se define en el presente documento. Otro ejemplo de un análogo derivado de GNA, ácido nucleico flexible (FNA) basado en el acetal aminal mixto de formil glicerol, se describe en Joyce GF et al., PNAS, 1987, 84, 4398-4402 y Heuberger BD y Switzer C, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 412-413, y se muestra a continuación:



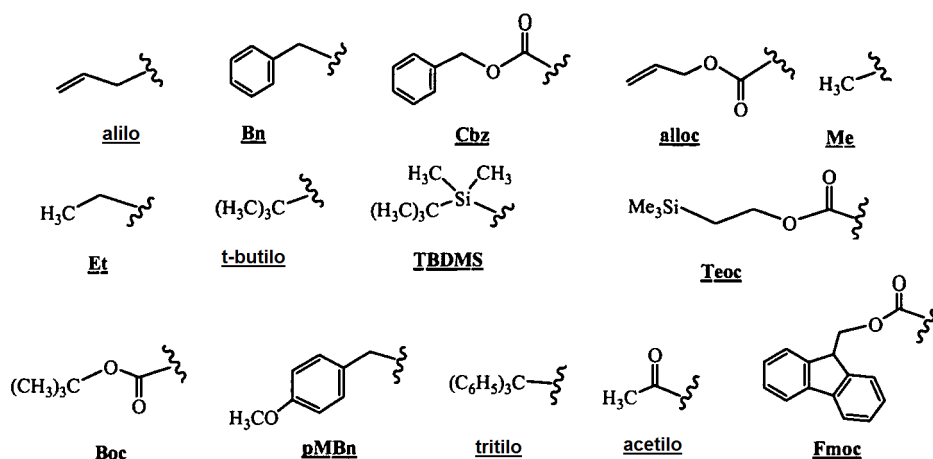
## 10 Grupos de bloqueo

15 En las reacciones descritas, es necesario en ciertas realizaciones proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxí, amino, tiol o carboxi, donde éstos se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Se usan grupos protectores para bloquear algunos o todos los restos reactivos y prevenir que tales grupos participen en reacciones químicas hasta que se elimine el grupo protector. En una realización, cada grupo protector puede eliminarse por un medio diferente. Grupos protectores que se escinden en condiciones de reacción totalmente dispares cumplen el requisito de eliminación diferencial. En algunas realizaciones, los grupos protectores se eliminan por ácido, base y/o hidrogenólisis. Grupos tales como tritilo, dimetoxitritilo, acetal y *t*-butildimetilsililo son lábiles a los ácidos y se usan en ciertas realizaciones para proteger restos reactivos con carboxi e hidroxí en presencia de grupos amino protegidos con grupos Cbz, que pueden eliminarse por hidrogenólisis, y/o grupos Fmoc, que son lábiles a las bases. En otras realizaciones, se bloquean restos reactivos con ácido carboxílico e hidroxí con grupos lábiles a las bases tales como, pero no se limitan a, metilo, etilo y acetilo en presencia de aminas bloqueadas con grupos lábiles a los ácidos tales como *t*-butilcarbamato o con carbamatos que son tanto estables a los ácidos como a las bases, pero hidrolíticamente eliminables.

25 En otra realización, los restos reactivos con hidroxí se bloquean con grupos protectores hidrolíticamente eliminables tales como el grupo bencilo, mientras que los grupos amina capaces de formar enlace de hidrógeno con ácidos se bloquean con grupos lábiles a las bases tales como Fmoc. En otra realización, los restos reactivos con ácido carboxílico se protegen por conversión en compuestos de éster simples, o, en otra realización más, se bloquean con grupos protectores oxidativamente eliminables tales como 2,4-dimetoxibencilo, mientras que grupos amino co-existentes se bloquean con grupos de bloqueo de sililo o carbamato lábiles al fluoruro.

35 Los grupos de bloqueo de alilo son útiles en presencia de grupos protectores de ácido y base ya que los primeros son estables y pueden ser posteriormente eliminados por catalizadores metálicos o de ácido pi. Por ejemplo, pueden desprotegerse grupos hidroxí bloqueados con alilo con una reacción catalizada por Pd (0) en presencia de grupos protectores de amina de *t*-butilcarbamato lábiles a ácidos o de acetato lábiles a bases. Otra forma más de grupo protector es una resina a la que está unida un compuesto o producto intermedio. En tanto que el residuo esté unido a la resina, ese grupo funcional se bloquea y no puede reaccionar. Una vez liberado de la resina, el grupo funcional está disponible para reaccionar.

40 Normalmente, grupos de bloqueo/protectores son, a modo de ejemplo solo:



Grupos protectores representativos útiles para proteger nucleótidos durante la síntesis incluyen grupos protectores lábiles a las bases y grupos protectores lábiles a los ácidos. Se usan grupos protectores lábiles a las bases para proteger los grupos amino exocíclicos de las nucleobases heterocíclicas. Este tipo de protección se logra generalmente por acilación. Tres grupos acilantes comúnmente usados para este fin son cloruro de benzoilo, anhídrido fenoxiacético y cloruro de isobutirilo. Estos grupos protectores son estables a las condiciones de reacción usadas durante la síntesis de los ácidos nucleicos y se escinden a tasas aproximadamente iguales durante el tratamiento con base al final de la síntesis.

En algunas realizaciones, el grupo protector en 5' es tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo, 2-clorotritilo, DATE, TBTr, 9-fenilxantin-9-ilo (Pixyl) o 9-(*p*-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX).

En algunas realizaciones, se incorporan restos de tiol en los compuestos de fórmula 1, 2, 4 o 5 y se protegen. En algunas realizaciones, los grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, Pixyl, tritilo, bencilo, *p*-metoxibencilo (PMB) o *tert*-butilo (*t*-Bu).

Otros grupos protectores, más una descripción detallada de técnicas aplicables a la creación de grupos protectores y su eliminación, se describen en Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, y Kocienski, Protective Groups, Thieme Verlag, New York, NY, 1994.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -OR<sup>a</sup>, en el que R<sup>a</sup> es tritilo sustituido o sin sustituir o sililo sustituido. En otras realizaciones, R<sup>1</sup> es -N<sub>3</sub>, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, alquiloxi o -OH. En algunas realizaciones, R<sup>2</sup> es -OR<sup>b</sup>, en el que R<sup>b</sup> es tritilo sustituido o sin sustituir, sililo sustituido, acetilo, acilo o éter metílico sustituido. En otras realizaciones, R<sup>2</sup> es -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenoil-Y<sup>1</sup>-, alquinoil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, donde Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se, y está sustituido con restos fluorescentes o de unión a biomolécula. En aún otras realizaciones, el sustituyente en R<sup>2</sup> es un resto fluorescente. En algunas realizaciones, el sustituyente en R<sup>2</sup> es biotina o avidina. En algunas realizaciones, R<sup>2</sup> es -OH, -N<sub>3</sub>, hidrógeno, halógeno, alcoxi o alquiloxi.

En otras realizaciones, R<sup>3</sup> es un grupo de bloqueo que es tritilo sustituido, acilo, sililo sustituido o bencilo sustituido. En aún otras realizaciones, R<sup>3</sup> es un resto de enlace conectado a un soporte sólido. En realizaciones adicionales, el grupo de bloqueo del resto Ba es un resto de bencilo, acilo, formilo, dialquilformamidinilo, isobutirilo, fenoxiacetilo o tritilo, cualquiera de los cuales puede estar sin sustituir o sustituido.

### Métodos de uso de los ácidos nucleicos que comprenden un resto de X-fosfonato quiral

Los oligonucleótidos estereodefinidos que comprenden un resto de X-fosfonato quiral que se obtienen por los métodos de la invención son útiles en varias áreas para aplicaciones debido a una combinación de estabilidad, quiralidad definida y facilidad de síntesis. Ampliamente, los compuestos sintetizados por este método son útiles como terapéuticos, sondas y reactivos de diagnóstico, herramientas sintéticas para producir otros productos de oligonucleótido, y materiales de nanoestructura adecuados para varios materiales nuevos y aplicaciones de cálculo.

Los oligonucleótidos estereodefinidos obtenidos por los métodos de la invención tienen estabilidad en suero mejorada con respecto a la de equivalentes de ADN/ARN naturales, y en particular, oligonucleótidos estereodefinidos de la clase de los fosforotioatos. Además, el isómero S<sub>P</sub> es más estable que el isómero R<sub>P</sub>. En algunas realizaciones, el nivel de estabilidad en suero se modula por la introducción de tanto todos los centros S<sub>P</sub> como los centros S<sub>P</sub> en posiciones seleccionadas para conferir resistencia a la degradación. En otras realizaciones, la introducción de estereocentros R<sub>P</sub> y/o S<sub>P</sub> de selección puede proporcionar asociación de apareamiento de bases específica con una diana endógena o exógena, protegiendo así la diana del metabolismo o mejorando una reacción biológica particular.

La activación de RNasa H también se modula por la presencia de los análogos de ácido nucleico de fosforotioato estereocontrolado, siendo el ADN/ARN natural más susceptible que el estereoisómero  $R_P$ , que a su vez es más susceptible que el isómero  $S_P$  correspondiente.

Se observa estabilidad del dúplex mejorada hacia ARN con oligonucleótidos de fosforotioato  $R_P$  que tienen mayor estabilidad del dúplex que los oligonucleótidos  $S_P$  correspondientes, que a su vez demuestran mayor estabilidad que la del ADN/ARN natural. Se observa estabilidad del dúplex mejorada hacia ARN con  $S_P$  que tiene mayor estabilidad del dúplex que  $R_P$  que tiene más estabilidad que la del ADN/ARN natural (P. Guga, Curr. Top Med. Chem., 2007, 7, 695-713).

Estas moléculas pueden ser útiles como agentes terapéuticos, en varias aplicaciones particulares. Pueden incorporarse en oligonucleótidos que también contienen los nucleósidos de ADN/ARN estándar, o pueden sintetizarse como secuencia entera de los oligonucleótidos estereocontrolados obtenidos por los métodos de la invención. Algunas categorías de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de antígeno que forman una triple hélice con secuencias elegidas como diana para reprimir la transcripción de genes no deseados y modular la expresión de proteínas y/o actividad, oligonucleótidos de señuelo, vacunas de ADN, aptámeros, ribozimas, desoxirribozimas (ADNZimas o enzimas de ADN), ARNip, microARN, ARNnc (ARN no codificantes), y profármacos modificados con P. La modulación engloba aumentar o disminuir indirecta o directamente la actividad de una proteína o la inhibición o promoción de la expresión de una proteína. Estos compuestos de ácido nucleico pueden usarse para controlar la proliferación celular, replicación viral, o cualquier otro proceso de señalización de células.

En un ejemplo, el campo de los terapéuticos de ARNip tiene una necesidad de especies de oligonucleótidos que puedan proporcionar estabilidad elevada contra la actividad de RNasa, con el fin de mejorar la duración de la acción con respecto a la observada con ARNip compuesto de nucleósidos naturales. Adicionalmente, la formación de la hélice en forma de A parece ser más indicativa de éxito en la entrada de iARN que la presencia de elementos nativos específicos en el oligonucleótido. Ambos de estos requisitos que pueden ser proporcionados por el uso de los oligonucleótidos estereocontrolados obtenidos por los métodos de la invención pueden proporcionar estabilidad mejorada (Y-L Chiu, T.M. Rana RNA, 2003, 9,1034-1048).

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son útiles como agentes terapéuticos contra diversos estados de enfermedad, que incluyen el uso como agentes antivirales. Los ácidos nucleicos pueden usarse como agentes para el tratamiento de enfermedades mediante la modulación de la actividad de ADN y/o ARN. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden usarse para inhibir expresión génica específica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden ser complementarios a una secuencia de ARN mensajero (ARNm) diana específica. Pueden usarse para inhibir la replicación viral tales como los ortopoxvirus, virus de la variolovacuna, herpes, papiloma, gripe, citomegalovirus y otros virus. Otros ejemplos incluyen usos como compuestos antisentido contra ARN del VIH u otro ARN retroviral o para hibridar con ARNm del VIH que codifica la proteína tat, o para la región TAR del ARNm del VIH. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos imitan la estructura secundaria de la región TAR de ARNm del VIH, y haciendo esto se unen a la proteína tat. En una realización, los ácidos nucleicos se usan para inhibir la expresión de una proteína diana poniendo en contacto una célula con un compuesto de fórmula 1 en el que la expresión de otras proteínas en la célula no se inhibe o se inhibe de forma mínima. En alguna realización, la inhibición de la proteína diana se produce *in vivo* en un mamífero. En otras realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula 1 para inhibir la expresión de una proteína diana.

Otros ejemplos de proteínas donde la expresión puede modularse incluyen proteínas cinasa Jun del extremo N (JNK), diacilglicerol aciltransferasa I, apolipoproteína B, receptor de glucagón, Aurora B, acil CoA colesterol aciltransferasa-2, proteína c reactiva, familia de proteínas STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción) y P-glicoproteína MDR. Los ácidos nucleicos pueden usarse para inhibir la expresión de la proteína fosfatasa 1B (PTP1B), polimerasa viral de ARN dependiente de ARN. Los ácidos nucleicos pueden usarse para inducir acontecimientos tales como apoptosis en células cancerosas o para hacer una célula más susceptible a la apoptosis. Los ácidos nucleicos pueden usarse para modular actividades de proteínas. Por ejemplo, pueden ayudar a modular la actividad de RNasa H en moléculas de ARN multiresistentes a fármacos (MDR).

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son útiles para tratar indicaciones que incluyen, pero no se limitan a, hipercolesterolemia, síndrome respiratorio agudo grave (SARS), enfermedades retrovirales tales como SIDA o VIH, otras infecciones virales, infecciones intrauterinas y cáncer.

Cuando se usa como terapéutico, el ácido nucleico descrito en el presente documento se administra como una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quirral de fórmula 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un principio inactivo farmacéuticamente aceptable seleccionado de diluyentes farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticamente aceptables y vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra realización, la composición farmacéutica se formula para inyección intravenosa, administración por vía oral, administración por vía oral, inhalación, administración nasal, administración

tópica, administración oftálmica o administración ótica. En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica es un comprimido, una píldora, una cápsula, un líquido, un inhalante, una solución de espray nasal, un supositorio, una suspensión, un gel, un coloide, una dispersión, una suspensión, una solución, una emulsión, una pomada, una loción, un colirio o una gota ótica.

5 Una segunda categoría donde los compuestos sintetizados por los métodos de la invención son útiles es como cebadores o sondas. Como el método proporciona control total de secuencia, natural y no natural, y de estereoquímica en el centro de fósforo, puede producirse específicamente cualquier molécula específica. Adicionalmente, la resistencia a RNasa adicional proporciona moléculas que son robustas en condiciones *ex vivo* o  
10 *in vivo*. Los oligonucleótidos estereodefinidos obtenidos por los métodos de la invención pueden usarse como sondas para la investigación de mecanismos de reacción enzimática que implican átomos de fósforo tales como la digestión, ligación y polimerización de ácidos nucleicos. Esta clase de moléculas puede usarse como sondas para la investigación de mecanismos de reacción de ribozimas y desoxirribosimas. También pueden funcionar de sondas para la investigación de iARN y otros mecanismos de silenciamiento génico mediados por ARN no codificante como  
15 sondas para el análisis de interacciones proteína-ácido nucleico. La capacidad para definir la estructura tridimensional que incorpora estereocentros de fósforo  $R_P$  o  $S_P$  seleccionados permite la posibilidad de diseñar novedosas clases de las llamadas balizas moleculares.

20 Como este método de síntesis no se limita al estrecho conjunto de nucleobases naturales, nucleobases modificadas u otras modificaciones a la base o azúcar o extremos permite el uso de esta clase de oligonucleótidos como sondas o sensores para ácidos nucleicos, proteínas y cualquier sustancia biológica o química en solución. También pueden usarse similarmente, sin nucleobases modificadas, usando métodos de detección estándar en lugar de ADN/ARN natural. Cualquiera de éstos puede incorporarse como parte de un ensayo de diagnóstico.

25 Tales pruebas de diagnóstico pueden realizarse usando fluidos biológicos, tejidos, células intactas o componentes celulares aislados. Al igual que con la inhibición de la expresión génica, las aplicaciones de diagnóstico utilizan la capacidad de los ácidos nucleicos para hibridarse con una hebra complementaria de ácido nucleico. La hibridación es el enlace de hidrógeno específico de secuencia de compuestos oligoméricos mediante pares de bases de Watson-Crick y/u Hoogsteen a ARN o ADN. Se dice que las bases de tales pares de bases son complementarias  
30 entre sí. Los ácidos nucleicos pueden usarse para analizar estados corporales, por ejemplo, estados enfermos en animales. Pueden usarse para la identificación de adenovirus o virus de la gripe en una muestra o como agentes intercalantes o sondas. Por ejemplo, pueden usarse para detectar metilación de ADN o sondar interacciones de ADN con otros componentes celulares tales como proteínas.

35 Se describe un método se proporciona de identificación o detección de una molécula diana en una muestra, comprendiendo el método: poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene una molécula diana con una molécula sensora de ácido nucleico de fórmula 1, sintetizada según los métodos de la invención, en el que un cambio en una señal generada por una unidad generadora de señales indica la presencia de dicha diana en dicha muestra. La molécula sensora de ácido nucleico se une específicamente con la molécula diana. En algunas  
40 realizaciones hay una pluralidad de moléculas sensoras de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la pluralidad de moléculas sensoras de ácido nucleico comprende moléculas sensoras de ácido nucleico que se unen específicamente a diferentes moléculas diana. En algunos casos, el método comprende además cuantificar el cambio en la señal generado por la unidad generadora de señales para cuantificar la cantidad de molécula diana en la muestra. La unidad generadora de señales detecta cualquier tipo de señal, que incluye, pero no se limita a,  
45 fluorescencia, resonancia de plasmones superficiales, extinción de fluorescencia, quimioluminiscencia, interferometría o detección del índice de refracción.

La muestra que va a detectarse es una muestra ambiental, material de riesgo biológico, muestra orgánica, fármaco, toxina, aroma, fragancia o muestra biológica. La muestra biológica es una célula, extracto de células, lisado celular, tejido, extracto de tejido, fluido corporal, suero, sangre o hemoderivado. En algunas realizaciones del método, la presencia de la molécula diana indica la presencia de una afección patológica. En algunas realizaciones del método, la presencia de la molécula diana indica la presencia de una molécula deseable.

50 En un uso relacionado, los oligonucleótidos estereodefinidos proporcionados por los métodos de la invención son útiles como cebadores para PCR o como moldes o cebadores para la síntesis de ADN/ARN usando polimerasas. Las temperaturas de fusión pueden optimizarse para una aplicación particular dependiendo de la introducción seleccionada de quiralidad  $R_P$  o  $S_P$  en el fósforo en el oligonucleótido producto.

60 Se proporciona un método de amplificación de regiones deseadas de de ácido nucleico de un molde de ácido nucleico que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de primeros cebadores de PCR que tienen una región de secuencia de nucleótidos fija complementaria a una secuencia consenso de interés; (b) proporcionar una pluralidad de segundos cebadores de PCR, (c) amplificar el molde de ácido nucleico mediante PCR usando la pluralidad de primeros cebadores de PCR y la pluralidad de segundos cebadores de PCR en condiciones en las que un subconjunto de la pluralidad de primeros cebadores se une a la secuencia consenso de interés sustancialmente  
65 donde quiera que se produzca en el molde, y un subconjunto de la pluralidad de segunda cebadores se une al molde en localizaciones eliminadas de los primeros cebadores de forma que las regiones de ácido nucleico flanqueadas



por el primer cebador y el segundo cebador se amplifiquen específicamente, y en el que la pluralidad de primeros cebadores de PCR y/o la pluralidad de segundos cebadores de PCT son moléculas de ácidos nucleicos de fórmula 1 que se producen según los métodos de la invención.

- 5 En algunas realizaciones, el molde es ADN genómico. En algunas realizaciones, el molde es ADN genómico eucariota. En algunas realizaciones, el molde es ADN genómico humano. En algunas realizaciones, el molde es ADN procariota. En algunas realizaciones, el molde es ADN que es un ADN genómico clonado, una región de ADN subgenómica, un cromosoma o una región subcromosómica. En algunas realizaciones, el molde es ARN.
- 10 Los oligonucleótidos estereodefinidos también son útiles, debido a su elevada estabilidad y su capacidad para retener el reconocimiento y la unión con sus dianas biológicas, como sustancias para chips de ADN y micromatrices de oligonucleótidos. También pueden usarse como oligonucleótidos estabilizados alternativos a los ácidos nucleicos naturales tales como ARNt y ARNm en la síntesis de proteínas libres de células.
- 15 Es útil un área adicional donde la capacidad para controlar la estabilidad, composición molecular que incluye restos no naturales, y estructura, todos dentro de la misma síntesis, para aplicaciones dentro del diseño de nanomateriales de ADN. Los oligonucleótidos estereodefinidos obtenidos por los métodos de la invención pueden usarse como sustancias para la construcción de nano-estructuras de ácido nucleico que consisten en estructuras dúplex, tríplex, cuádruplex, y otras de orden superior. La capacidad para incorporar otros restos orgánicos en las moléculas
- 20 producidas por estos métodos conduce a aplicaciones en nanomateriales que diseñan estructura de orden superior no natural específica. La estabilidad *in vivo* y la flexibilidad del diseño permitirán que el uso de estas moléculas en, por ejemplo, ordenadores de ADN. Adicionalmente, pueden incorporarse moléculas orgánicas quelantes o conductoras de metales en los estereodefinidos obtenidos por los métodos de la invención y conducir a su uso como nano-hilos de ADN en dispositivos electrónicos o nano-máquinas de ADN/ARN (F.A. Aldate, A.L. Palmer, Science, 2008, 321, 1795-1799).
- 25

### Ejemplos

#### Información general:

- 30 Todos los espectros de RMN en el presente documento se registraron en un Varian Mercury 300. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se obtuvieron a 300 MHz con tetrametilsilano (TMS) (δ 0,0) como patrón interno en CDCl<sub>3</sub>. Los espectros de RMN <sup>31</sup>P se obtuvieron a 121,5 MHz con 85 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (δ 0,0) como patrón externo. Se registraron EM-MALDI TOF en un Applied Biosystems Voyager System 4327. La cromatografía en columna de gel de sílice se llevó a cabo usando gel de sílice 60N de Kanto (esférico, neutro, 63-210 μm). Se realizó CCF analítica en placas Kieselgel 60-F<sub>254</sub> de Merck. Se prepararon disolventes orgánicos secos por procedimientos apropiados antes de uso. Los otros disolventes orgánicos fueron de calidad reactivo y se usaron como se recibieron. Se llevó a cabo ACQUITY UPLC® usando BEH C<sub>18</sub> (1,7 μm, 2,1 × 150 mm). El rendimiento de los dímeros de fosforotioato dTT, dCT, dAT, dGT, rU<sub>OMe</sub>U y rU<sub>F</sub>U se determinó por mediciones de absorbancia UV a 260 nm con los coeficientes de extinción molar de valores aproximados para los dímeros naturales dTT (16800), dCT (15200), dAT (22800), dGT (20000), rUU (19600), rJU (19600), respectivamente.
- 40

#### Abreviaturas:

- 45 bz: benzoílo  
reactivo de Beaucage: 1,1-dióxido de 3*H*-1,2-benzoditiol-3-ona  
BSA: *N*,*O*-bis(trimetilsilil)acetamida  
BTC: bis(triclorometil)carbonato  
ce: cianoetilo
- 50 CF<sub>3</sub>COIm: *N*-trifluoroacetilimidazol  
CMP: *N*-cianometilpirrolidina  
CMPT: trifluorometanosulfonato de *N*-cianometilpirrolidinio  
CPG: vidrio de poro controlado  
DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
- 55 DCA: ácido dicloroacético  
DCM: diclorometano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
DMAc: *N,N*-dimetilacetamida  
DMAN: 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno  
DMTr: 4,4'-dimetoxitritilo
- 60 DTD: disulfuro de *N,N'*-dimetiltiuram  
HCP: poliestireno altamente reticulado  
pac: fenoxiacetilo  
TBS: *t*-butildimetilsililo  
TBDPS: *t*-butildifenilsililo
- 65 TFA: ácido trifluoroacético  
L-2: mismo que la fórmula P en el presente documento

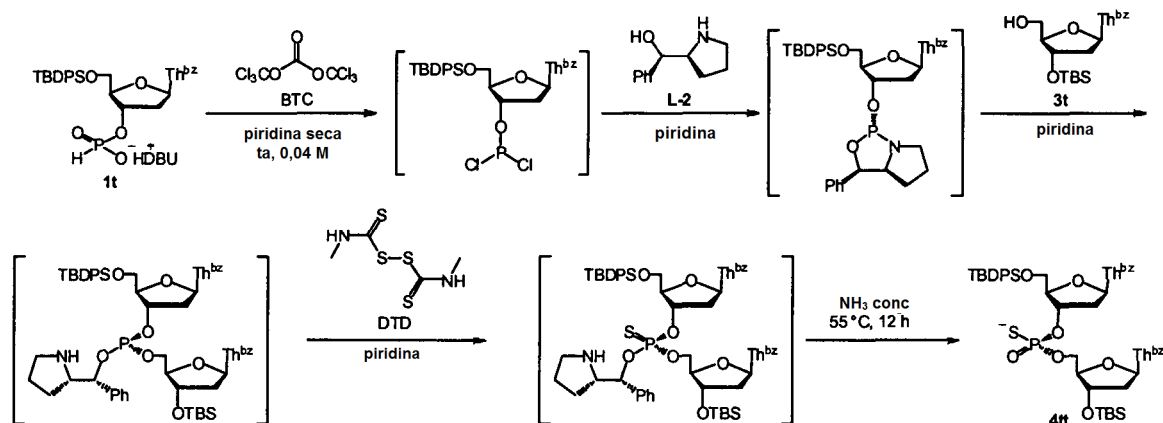
D-2: mismo que la fórmula O en el presente documento

L-6: mismo que la fórmula R en el presente documento

D-6: mismo que la fórmula Q en el presente documento

5 **Ejemplo 1:** Síntesis en solución de un dímero de fosforotioato, *N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)timidin-3'-il *N*<sup>β</sup>-benzoil-3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilfosforotioato de (*S*<sub>P</sub>)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*S*<sub>P</sub>)-4tt] mediante la Ruta A

10 Se secó *N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (**1t**) (96,0 mg, 120 μmoles) por coevaporaciones repetidas con piridina seca y entonces se disolvió en piridina seca (2 ml). Se añadió BTC (29,7 mg 100 μmoles), y la mezcla se agitó durante 10 min. Se añadió una solución de aminoalcohol L-2 (21,3 mg, 120 μmoles), que se preparó por coevaporaciones repetidas con piridina seca y se disolvió en piridina seca (1 ml), a la mezcla de reacción gota a gota mediante una jeringa, y la mezcla se agitó durante 5 min bajo atmósfera de argón. A la solución de *N*<sup>β</sup>-benzoil-3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidina (3t), que se preparó por coevaporaciones repetidas con piridina seca y se disolvió en piridina (500 μmoles), se añadió la mezcla de reacción mediante una jeringa. Después de 30 min, se añadió DTD (42,5 mg, 120 μmoles) a la mezcla de reacción. Tras 5 min adicionales, el disolvente se evaporó a presión reducida. Se añadió NH<sub>3</sub> concentrado-EtOH (40 ml; 3:1, v/v) al residuo, y la mezcla se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a sequedad a presión reducida. La mezcla en bruto se diluyó con CHCl<sub>3</sub> (15 ml), y se lavó con hidrogenocarbonato de trietilamonio 0,2 M (20 ml). La fase acuosa se retro-extrajo con CHCl<sub>3</sub> (4 x 15 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC. El producto se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (5 ml), se lavó con tampón hidrogenocarbonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio 0,2 M (10 ml) y se retro-extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3 x 5 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a sequedad proporcionando (*S*<sub>P</sub>)-**4tt** (41,8 mg, rendimiento del 98 %, *R*<sub>P</sub>:*S*<sub>P</sub> = 9:91) como una espuma blanca. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>31</sup>P (Figura 1 y 2, respectivamente) fueron idénticos a aquellos de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. RMN <sup>31</sup>P (121,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 57,4 (isómero *R*<sub>P</sub>: 57,9). El esquema sintético se muestra en el Esquema 10.



30 **Esquema 10. Síntesis en solución de un dímero de ADN como en el Esquema 5 (Ruta A).**

35 **Ejemplo 2:** Síntesis en solución de un dímero de fosforotioato, 6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-desoxiadenosin-3'-il 3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilfosforotioato de (*S*<sub>P</sub>)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*S*<sub>P</sub>)-4at] mediante la Ruta A.

40 Se obtiene (*S*<sub>P</sub>)-4at a partir de 6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-desoxiadenosin-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (**1a**) en lugar de **1t**, usando las etapas de reacción descritas anteriormente para (*S*<sub>P</sub>)-4tt.

45 **Ejemplo 3:** Síntesis en solución de un dímero de fosforotioato, 4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-desoxicitidin-3'-il 3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilfosforotioato de (*S*<sub>P</sub>)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*S*<sub>P</sub>)-4ct] mediante la Ruta A.

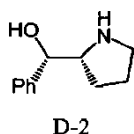
Se obtiene (*S*<sub>P</sub>)-4ct a partir de 4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-desoxicitidin-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (**1c**), en lugar de **1t**, usando las etapas de reacción descritas anteriormente para (*S*<sub>P</sub>)-4tt.

**Ejemplo 4:** Síntesis en solución de un dímero de fosforotioato, 2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)desoxiguanosin-3'-il 3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*S<sub>P</sub>*)-4gt] mediante la Ruta A.

5 Se obtiene (*S<sub>P</sub>*)-4gt a partir de 2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)desoxiguanosin-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (1g) en lugar de 1t, usando las etapas de reacción descritas anteriormente para (*S<sub>P</sub>*)-4tt.

10 **Ejemplo 5:** Síntesis en solución de un dímero de fosforotioato, *N*<sup>β</sup>-benzoi-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)timidin-3'-il *N*<sup>β</sup>-benzoi-3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*R<sub>P</sub>*)-4tt] mediante la Ruta A.

15 Se obtuvo (*R<sub>P</sub>*)-4tt como una espuma blanca (rendimiento del 93 %, *R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 95:5) usando aminoalcohol **D-2** en lugar de L-2 de un modo similar a (*S<sub>P</sub>*)-4tt en el Ejemplo 1. Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>31</sup>P se muestran en las Figuras 3 y 4, respectivamente. RMN <sup>31</sup>P (121,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 57,6 (*S<sub>P</sub>* isómero: 57,3).



20 **Ejemplo 6:** Síntesis en solución de un dímero de fosforotioato, 6-*N*-benzoi-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)desoxiadenosin-3'-il 3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*R<sub>P</sub>*)-4at] mediante la Ruta A.

25 Se produce (*R<sub>P</sub>*)-4at mediante las transformaciones descritas anteriormente en el Ejemplo 2 usando el compuesto 1a y el aminoalcohol D-2 como reactivo quiral, en lugar de L-2.

**Ejemplo 7:** Síntesis en solución de un dímero de fosforotioato, 4-*N*-benzoi-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)desoxicitidin-3'-il 3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*R<sub>P</sub>*)-4ct] mediante la Ruta A.

30 Se produce (*R<sub>P</sub>*)-4ct mediante las transformaciones descritas anteriormente en el Ejemplo 3 usando el compuesto 1c y el aminoalcohol D-2 como reactivo quiral, en lugar de L-2.

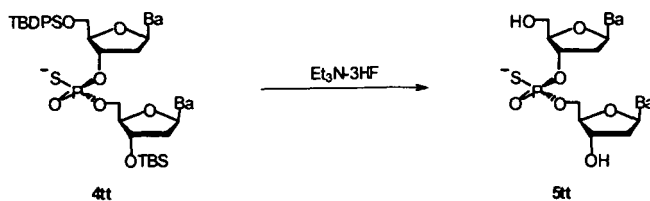
35 **Ejemplo 8:** Síntesis en solución de un dímero de fosforotioato, 2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)desoxiguanosin-3'-il 3'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*R<sub>P</sub>*)-4gt] mediante la Ruta A.

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-4gt mediante las transformaciones descritas anteriormente en el Ejemplo 4 usando el compuesto 1g y el aminoalcohol D-2 como reactivo quiral, en lugar de L-2.

40 **Ejemplo 9:** Desprotección para formar timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5tt].

45 Se seca (*S<sub>P</sub>*)-4tt (50 μmoles) por coevaporaciones repetidas con piridina seca y tolueno seco, y entonces se disuelve en trifluorhidrato de trietilamina (500 μl). La mezcla se agita durante 15 h a temperatura ambiente. Entonces se añade un tampón acetato de amonio 0,1 M (2,5 ml) a la mezcla, y la mezcla se lava con Et<sub>2</sub>O (3 × 3 ml). Las fases orgánicas combinadas se retro-extraen con tampón acetato de amonio 0,1 M (3 ml). Las fases acuosas combinadas se concentran entonces a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por cromatografía en columna de fase inversa [un gradiente lineal de acetonitrilo 0-10 % en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0)] proporcionando (*S<sub>P</sub>*)-5tt. El esquema de desprotección se muestra en el Esquema 11.

50 **Esquema 11. Desprotección**



**Ejemplo 10:** Desprotección para formar desoxiadenosin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5at].

Se produce (S<sub>P</sub>)-5at como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9 usando (S<sub>P</sub>)-4at en lugar de (S<sub>P</sub>)-4tt.

5 **Ejemplo 11:** Desprotección para formar desoxicitidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5ct].

Se produce (S<sub>P</sub>)-5ct como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9 usando (S<sub>P</sub>)-4ct en lugar de (S<sub>P</sub>)-4tt.

10 **Ejemplo 12:** Desprotección para formar desoxiguanosin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5gt].

Se produce (S<sub>P</sub>)-5gt como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9 usando (S<sub>P</sub>)-4gt en lugar de (S<sub>P</sub>)-4tt en.

**Ejemplo 13:** Desprotección para formar timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (R<sub>P</sub>)-amonio [(R<sub>P</sub>)-5tt].

15 Se produce (R<sub>P</sub>)-5tt como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9 usando (R<sub>P</sub>)-4tt en lugar de (S<sub>P</sub>)-4tt de una manera similar a (S<sub>P</sub>)-5tt.

**Ejemplo 14:** Desprotección para formar desoxiadenosin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (R<sub>P</sub>)-amonio [(R<sub>P</sub>)-5at].

20 Se produce (R<sub>P</sub>)-5at como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9 usando (R<sub>P</sub>)-4at en lugar de (S<sub>P</sub>)-4tt.

**Ejemplo 15:** Desprotección para formar desoxicitidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (R<sub>P</sub>)-amonio [(R<sub>P</sub>)-5ct].

Se produce (R<sub>P</sub>)-5ct como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9 usando (R<sub>P</sub>)-4ct en lugar de (S<sub>P</sub>)-4tt.

25 **Ejemplo 16:** Desprotección para formar desoxiguanosin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (R<sub>P</sub>)-amonio [(R<sub>P</sub>)-5gt].

Se produce (R<sub>P</sub>)-5gt como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9 usando (R<sub>P</sub>)-4gt en lugar de (S<sub>P</sub>)-4tt de una manera similar a (S<sub>P</sub>)-5tt.

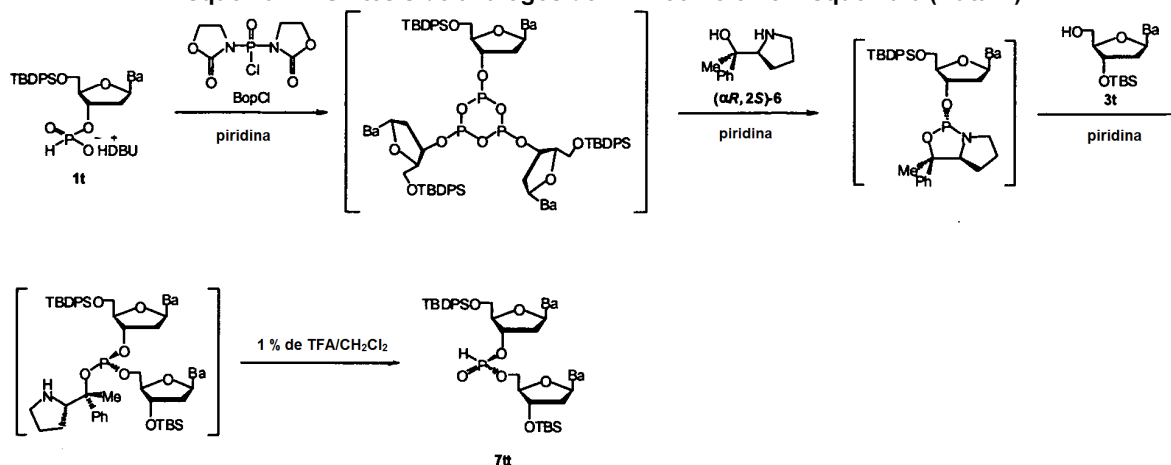
30 **Ejemplo 17:** Síntesis de *H*-fosfonato de (R<sub>P</sub>)-5'-*O*-(*terc*-butildifenilsilil)timidin-3'-il 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilo [(R<sub>P</sub>)-7tt] mediante la Ruta B.

35 Se seca 1t (100 μmoles) por coevaporaciones repetidas con piridina seca y entonces se disuelve en piridina seca (1 ml). Se añade cloruro *N,N*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinico (BopCl; 500 μmoles), y la mezcla se agita durante 5 min. A la mezcla se añade gota a gota una solución de aminoalcohol ((*αR*, 2*S*)-6) (100 μmoles), que se ha secado por coevaporaciones con piridina seca y se disuelve en piridina seca (1 ml), mediante una jeringa, y la mezcla se agita durante 5 min bajo argón. Se seca 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidina usando coevaporaciones repetidas con piridina seca y se disuelve en 100 μmoles de piridina. La mezcla anterior se añade mediante cánula a la solución de 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidina 3t en piridina seca (100 μmoles). Después de 15 min, la mezcla se concentra a presión reducida. El residuo se diluye con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) y se lava con NaHCO<sub>3</sub> saturado (3 × 5 ml). Las fases acuosas combinadas se retro-extraen con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 5 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y se concentran a aprox. 1 ml a presión reducida. El residuo se añade gota a gota mediante una jeringa a una solución con agitación de 1 % de ácido trifluoroacético (TFA) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (20 ml) a 0 °C. Después de 5 min

40 adicionales, la mezcla se diluye con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (100 ml) y se lava con soluciones acuosas saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (2 × 100 ml). Las fases acuosas combinadas se retro-extraen con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y se concentran a sequedad a presión reducida proporcionando (R<sub>P</sub>)-7tt en bruto. El esquema sintético se muestra en el Esquema 12.

50

Esquema 12. Síntesis de análogos de ADN como en el Esquema 6 (Ruta B).



5 **Ejemplo 18:** Síntesis de *H*-fosfonato de (*R<sub>P</sub>*)-6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*terc*-butildifenilsilil)desoxiadenosin-3'-il 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilo [(*R<sub>P</sub>*)-7at] mediante la Ruta B.

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-7at en bruto como se describe en el Ejemplo 17 usando 1a en lugar de 1t.

10 **Ejemplo 19:** Síntesis de *H*-fosfonato de (*R<sub>P</sub>*)-4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*terc*-butildifenilsilil)desoxicitidin-3'-il 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilo [(*R<sub>P</sub>*)-7ct] mediante la Ruta B.

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-7ct en bruto como se describe en el Ejemplo 17 usando 1c en lugar de 1t.

15 **Ejemplo 20:** Síntesis de *H*-fosfonato de (*R<sub>P</sub>*)-2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*terc*-butildifenilsilil)desoxiguanosin-3'-il 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilo [(*R<sub>P</sub>*)-7gt] mediante la Ruta B.

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-7gt en bruto como se describe en el Ejemplo 17 usando 1g en lugar de 1t.

20 **Ejemplo 21:** Síntesis de *H*-fosfonato de (*S<sub>P</sub>*)-5'-*O*-(*terc*-butildifenilsilil)timidin-3'-il 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-7tt] mediante la Ruta B.

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-7tt en bruto como se describe en el Ejemplo 17 usando  $(\alpha S, 2R)\text{-}6$  en lugar de  $(\alpha R, 2S)\text{-}6$  como reactivo quiral.

25 **Ejemplo 22:** Síntesis de *H*-fosfonato de (*S<sub>P</sub>*)-6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*terc*-butildifenilsilil)desoxiadenosin-3'-il 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-7at] mediante la Ruta B.

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-7at en bruto como se describe en el Ejemplo 17 usando el compuesto 1a y  $(\alpha S, 2R)\text{-}6$  en lugar de  $(\alpha R, 2S)\text{-}6$  como reactivo quiral.

30 **Ejemplo 23:** Síntesis de *H*-fosfonato de (*S<sub>P</sub>*)-4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*terc*-butildifenilsilil)desoxicitidin-3'-il 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-7ct] mediante la Ruta B.

35 Se produce (*S<sub>P</sub>*)-7ct en bruto como se describe en el Ejemplo 17 usando el compuesto 1c y  $(\alpha S, 2R)\text{-}6$  en lugar de  $(\alpha R, 2S)\text{-}6$  como reactivo quiral.

**Ejemplo 24:** Síntesis de *H*-fosfonato de (*S<sub>P</sub>*)-2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*terc*-butildifenilsilil)desoxiguanosin-3'-il 3'-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)timidin-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-7gt] mediante la Ruta B.

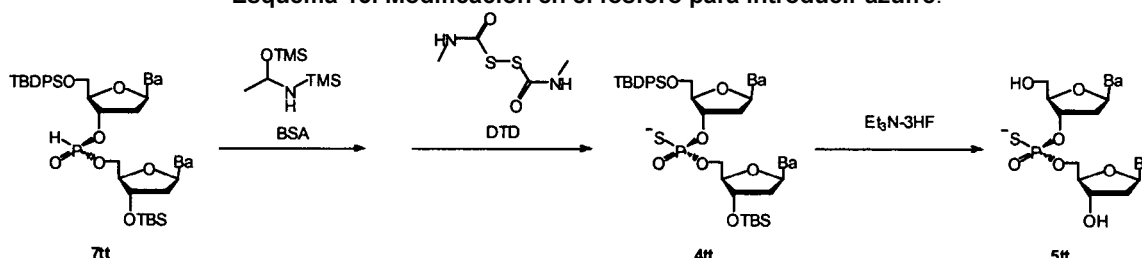
40 Se produce (*S<sub>P</sub>*)-7gt en bruto como se describe en el Ejemplo 17 usando el compuesto 1g en lugar de 1t y el compuesto  $(\alpha S, 2R)\text{-}6$  en lugar del compuesto  $(\alpha R, 2S)\text{-}6$  como reactivo quiral.

**Ejemplo 25:** Modificación para producir timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-5tt] como se muestra en Esquema general 13.

45 Se seca (*S<sub>P</sub>*)-7tt por coevaporaciones repetidas con piridina seca y tolueno seco, y entonces se disuelve en CH<sub>3</sub>CN (1 ml). Se añade *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA; 100  $\mu$ l). Después de 1 min, se añade disulfuro de *N,N'*-dimetiltiuram (DTD; 120  $\mu$ moles). Después de 3 min adicionales, la mezcla se concentra a sequedad a presión reducida dando (*R<sub>P</sub>*)-4tt en bruto. Entonces, se disuelve (*R<sub>P</sub>*)-4tt en bruto en trifluorhidrato de trietilamina (1 ml). La mezcla se agita durante 15 h a temperatura ambiente. Entonces se añade un tampón acetato de amonio 0,1 M (5

ml) a la mezcla, y la mezcla se lava con Et<sub>2</sub>O (3 × 5 ml). Las fases orgánicas combinadas se retro-extraen con tampón acetato de amonio 0,1 M (5 ml). Las fases acuosas combinadas se concentran entonces a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por cromatografía en columna de fase inversa [un gradiente lineal de acetonitrilo 0-10 % en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0)] proporcionando (R<sub>P</sub>)-5tt. Las etapas de modificación se muestran en el Esquema 13.

Esquema 13. Modificación en el fósforo para introducir azufre.



10 **Ejemplo 26:** Modificación para producir desoxiadenosin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (R<sub>P</sub>)-amonio [(R<sub>P</sub>)-5at].

Se produce (R<sub>P</sub>)-5at como se describe en el Ejemplo 25 usando (S<sub>P</sub>)-7at en lugar de (S<sub>P</sub>)-7tt.

15 **Ejemplo 27:** Modificación para producir desoxicitidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (R<sub>P</sub>)-amonio [(R<sub>P</sub>)-5ct].

Se produce (R<sub>P</sub>)-5ct como se describe en el Ejemplo 25 usando (S<sub>P</sub>)-7ct en lugar de (S<sub>P</sub>)-7tt.

**Ejemplo 28:** Modificación para producir desoxiguanosin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (R<sub>P</sub>)-amonio [(R<sub>P</sub>)-5gt].

20 Se produce (R<sub>P</sub>)-5gt como se describe en el Ejemplo 25 usando (S<sub>P</sub>)-7gt en lugar de (S<sub>P</sub>)-7tt.

**Ejemplo 29:** Modificación para producir timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5tt].

Se produce (S<sub>P</sub>)-5tt como se describe en el Ejemplo 25 usando (R<sub>P</sub>)-7tt en lugar de (S<sub>P</sub>)-7tt.

25 **Ejemplo 30:** Modificación para producir desoxiadenosin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5at].

Se produce (S<sub>P</sub>)-5at como se describe en el Ejemplo 25 usando (R<sub>P</sub>)-7at en lugar de (S<sub>P</sub>)-7tt.

30 **Ejemplo 31:** Modificación para producir desoxicitidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5ct].

Se produce (S<sub>P</sub>)-5ct como se describe en el Ejemplo 25 usando (R<sub>P</sub>)-7ct en lugar de (S<sub>P</sub>)-7tt.

35 **Ejemplo 32:** Modificación para producir desoxiguanosin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5gt].

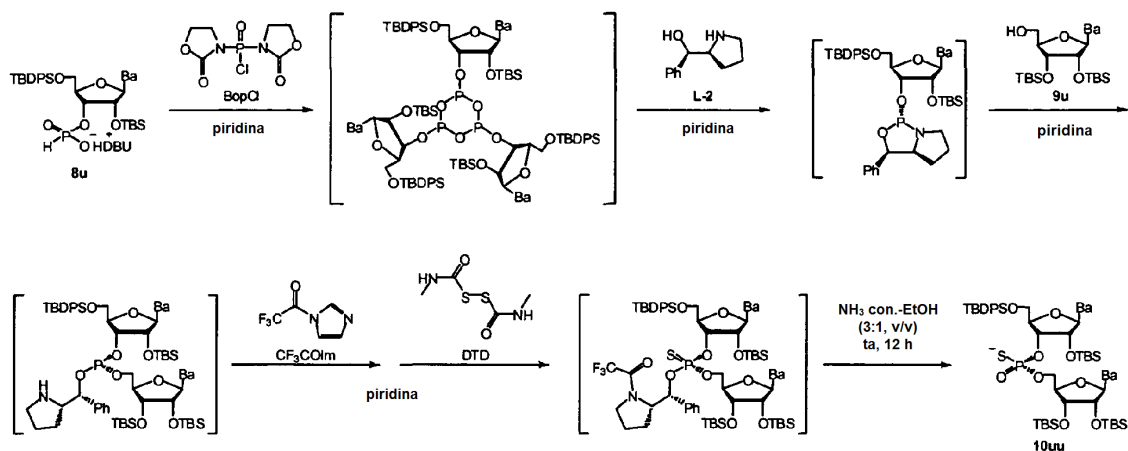
Se produce (S<sub>P</sub>)-5gt como se describe en el Ejemplo 25 usando (R<sub>P</sub>)-7gt en lugar de (S<sub>P</sub>)-7tt.

**Ejemplo 33:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, 5'-O-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)uridin-3'-il 2',3'-O-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(S<sub>P</sub>)-10uu] mediante la Ruta A.

Se seca 5'-O-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)uridin-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (8u) (100 μmoles) por coevaporaciones repetidas con piridina seca y entonces se disuelve en piridina seca (1 ml). Se añade cloruro *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl; 500 μmoles) y la mezcla se agita durante 5 min. A la mezcla se añade gota a gota una solución de aminoalcohol (L-2) (100 μmoles), que se ha secado por coevaporaciones repetidas con piridina seca y se disolvió en piridina seca (1 ml), mediante una jeringa, y la mezcla se agita durante 5 min bajo argón. Se seca 2',3'-O-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridina 9u por coevaporaciones repetidas con piridina seca y se disuelve en 100 μmoles de piridina. Entonces, la mezcla anterior se añade mediante cánula en la solución de 2',3'-O-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridina 9u (100 μmoles). Después de 10 min, se añade *N*-trifluoroacetilimidazol (CF<sub>3</sub>COIm; 200 μmoles). Después de 30 s adicionales, se añade disulfuro de *N,N'*-dimetiltiuram (DTD; 120 μmoles). Después de 3 min adicionales, la mezcla se seca a vacío. Al residuo se añade NH<sub>3</sub> conc.-EtOH (3:1, v/v, 10 ml), y la mezcla se agita durante 12 h, y entonces se concentra a sequedad a presión reducida. Entonces, la mezcla se diluye con CHCl<sub>3</sub> (5 ml), y se lava con tampón fosfato 0,2 M (pH 7,0, 5 ml). Las fases acuosas se retro-extraen con CHCl<sub>3</sub> (2 × 5 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y se concentran a sequedad a presión reducida. El residuo se purifica por PTLC. El producto se disuelve en CHCl<sub>3</sub> (5 ml), se lava con tampón bicarbonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio 0,2 M (5 ml) y se retro-extrae con CHCl<sub>3</sub> (2 × 5 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y se concentran a

seguridad proporcionando (*S<sub>P</sub>*)-10uu. El esquema sintético se muestra en el Esquema 14.

**Esquema 14. Síntesis de análogos de ARN como en el Esquema 5 (Ruta A).**



5

**Ejemplo 34:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, 6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)adenosin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*S<sub>P</sub>*)-10au] mediante la Ruta A.

10

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-10au como se describe en el Ejemplo 33 usando 6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)adenosin-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (8a) en lugar de 8u.

**Ejemplo 35:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, 4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)citidin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*S<sub>P</sub>*)-10cu] mediante la Ruta A.

15

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-10cu como se describe en el Ejemplo 33 usando 4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)citidin-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (8c) en lugar de 8u.

20

**Ejemplo 36:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, 2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)guanosin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*S<sub>P</sub>*)-10gu] mediante la Ruta A.

25

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-10gu como se describe en el Ejemplo 33 usando 2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)guanosin-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (8g) en lugar de 8u.

**Ejemplo 37:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, 5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)uridin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*R<sub>P</sub>*)-10uu] mediante la Ruta A.

30

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-10uu como se describe en el Ejemplo 33 usando el reactivo quiral D-2 en lugar del reactivo quiral L-2.

35

**Ejemplo 38:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, 6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)adenosin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*R<sub>P</sub>*)-10au] mediante la Ruta A.

40

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-10au como se describe en el Ejemplo 33 usando 8a en lugar de 8u y el reactivo quiral D-2 en lugar del reactivo quiral L-2.

**Ejemplo 39:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, 4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)citidin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*R<sub>P</sub>*)-10cu] mediante la Ruta A.

45

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-10cu como se describe en el Ejemplo 33 usando 8c en lugar de 8u y el reactivo quiral D-2 en lugar del reactivo quiral L-2.

**Ejemplo 40:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, 2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)guanosin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio [(*R<sub>P</sub>*)-10gu] mediante la Ruta A.

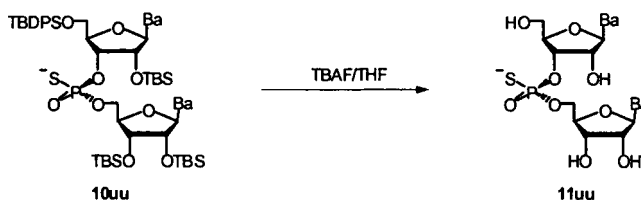
- 5 Se produce (*R<sub>P</sub>*)-10gu como se describe en el Ejemplo 33 usando 8g en lugar de 8u y el reactivo quiral D-2 en lugar del reactivo quiral L-2.

**Ejemplo 41:** Desprotección para formar uridin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*S<sub>P</sub>*)-11uu].

- 10 Se seca (*S<sub>P</sub>*)-10uu (50 μmoles) por coevaporaciones repetidas con piridina seca y tolueno seco, y entonces se disuelve en solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M (TBAF) en THF seco (500 μl). La mezcla se agita durante 12 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón acetato de trietilamonio 0,05 M (pH 6,9, 2,5 ml) a la mezcla, y la mezcla se lava con Et<sub>2</sub>O (3 × 3 ml). Las fases orgánicas combinadas se retro-extraen con tampón acetato de trietilamonio 0,05 M (3 ml). Las fases acuosas combinadas se concentran entonces a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por cromatografía en columna de fase inversa [un gradiente lineal de acetonitrilo 0-10 % en tampón acetato de trietilamonio 0,1 M (pH 6,9)] proporcionando (*S<sub>P</sub>*)-11uu. El esquema de desprotección se muestra en el Esquema 15.

Esquema 15. Desprotección como en el Esquema 5 (Ruta A).

20



**Ejemplo 42:** Desprotección para formar adenosin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*S<sub>P</sub>*)-11au].

- 25 Se produce (*S<sub>P</sub>*)-11au como se describe en el Ejemplo 41 usando (*S<sub>P</sub>*)-10au en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-10uu.

**Ejemplo 43:** Desprotección para formar citidin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*S<sub>P</sub>*)-11cu].

- 30 Se produce (*S<sub>P</sub>*)-11cu como se describe en el Ejemplo 41 usando (*S<sub>P</sub>*)-10cu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-10uu.

**Ejemplo 44:** Desprotección para formar guanosin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*S<sub>P</sub>*)-11gu].

- 35 Se produce (*S<sub>P</sub>*)-11gu como se describe en el Ejemplo 41 usando (*S<sub>P</sub>*)-10gu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-10uu.

**Ejemplo 45:** Desprotección para formar uridin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*R<sub>P</sub>*)-11uu].

- 40 Se produce (*R<sub>P</sub>*)-11uu como se describe en el Ejemplo 41 usando (*R<sub>P</sub>*)-10uu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-10uu.

**Ejemplo 46:** Desprotección para formar adenosin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*R<sub>P</sub>*)-11au].

- 45 Se produce (*R<sub>P</sub>*)-11au como se describe en el Ejemplo 41 usando (*R<sub>P</sub>*)-10au en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-10uu.

**Ejemplo 47:** Desprotección para formar citidin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*R<sub>P</sub>*)-11cu].

- 50 Se produce (*R<sub>P</sub>*)-11cu como se describe en el Ejemplo 41 usando (*R<sub>P</sub>*)-10cu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-10uu.

**Ejemplo 48:** Desprotección para formar guanosin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*R<sub>P</sub>*)-11gu].

- 55 Se produce (*R<sub>P</sub>*)-11gu como se describe en el Ejemplo 41 usando (*R<sub>P</sub>*)-10gu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-10uu.

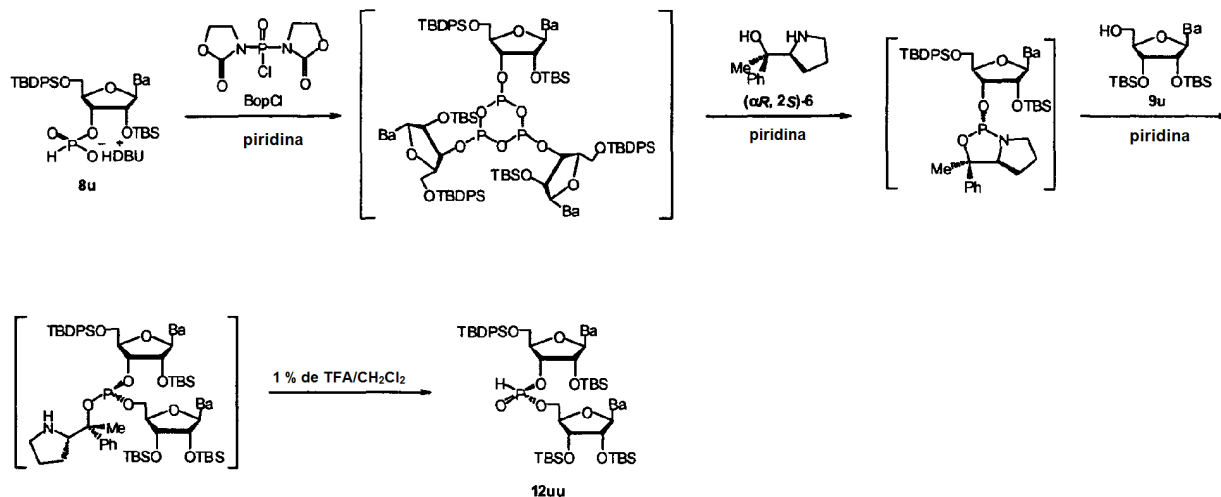
**Ejemplo 49:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, *H*-fosfonato de (*R<sub>P</sub>*)-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)uridin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilo [(*R<sub>P</sub>*)-12uu] mediante la Ruta B.

- Se seca 8u (100 μmoles) por coevaporaciones repetidas con piridina seca y entonces se disuelve en piridina seca (1 ml). Se añade cloruro *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl; 500 μmoles), y la mezcla se agita durante 5 min. A la mezcla se añade gota a gota una solución de aminoalcohol ((*αR*, 2*S*)-6) (100 μmoles), que se seca por coevaporaciones con piridina seca y se disuelve en piridina seca (1 ml), mediante una jeringa, y la mezcla se agita durante 5 min bajo argón. Entonces la mezcla se añade mediante cánula en una solución de 9u (100 μmoles), que se prepara por coevaporaciones repetidas con piridina seca y solución en piridina. Después de 15 min, la mezcla se



concentra a presión reducida. El residuo se diluye con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml) y se lava con  $\text{NaHCO}_3$  saturado ( $3 \times 5$  ml). Las fases acuosas combinadas se retro-extraen con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 5$  ml). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtran y se concentran a aprox. 1 ml a presión reducida. El residuo se añade gota a gota mediante una jeringa a una solución con agitación de 1 % de ácido trifluoroacético (TFA) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (20 ml) a 0 °C. Después de 5 min adicionales, la mezcla se diluye con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (100 ml) y se lava con soluciones acuosas saturadas de  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 100$  ml). Las fases acuosas combinadas se retro-extraen con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 100$  ml). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtran y se concentran a sequedad a presión reducida proporcionando (*R<sub>P</sub>*)-12uu en bruto, que se analiza por RMN  $^{31}\text{P}$ . El esquema sintético se muestra en el Esquema 16.

10 **Esquema 16. Síntesis de análogos de ARN mediante el Esquema 6 (Ruta B).**



15 **Ejemplo 50:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, *H*-fosfonato de (*R<sub>P</sub>*)-6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)adenosin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilo [(*R<sub>P</sub>*)-12au] mediante la Ruta B.

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-12au en bruto como se describe en el Ejemplo 49 usando 8a en lugar de 8u.

20 **Ejemplo 51:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, *H*-fosfonato de (*R<sub>P</sub>*)-4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)citidin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilo [(*R<sub>P</sub>*)-12cu] mediante la Ruta B.

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-12cu en bruto como se describe en el Ejemplo 49 usando 8c en lugar de 8u.

25 **Ejemplo 52:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, *H*-fosfonato de (*R<sub>P</sub>*)-2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)guanosin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilo [(*R<sub>P</sub>*)-12gu] mediante la Ruta B.

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-12gu en bruto como se describe en el Ejemplo 49 usando 8g en lugar de 8u.

30 **Ejemplo 53:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, *H*-fosfonato de (*S<sub>P</sub>*)-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)uridin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-12uu] mediante la Ruta B.

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-12uu en bruto como se describe en el Ejemplo 49 usando el reactivo quiral ( $\alpha\text{S}$ , 2*R*)-6 en lugar del reactivo quiral ( $\alpha\text{R}$ , 2*S*)-6.

35 **Ejemplo 54:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, *H*-fosfonato de (*S<sub>P</sub>*)-6-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)adenosin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-12au] mediante la Ruta B.

40 Se produce (*S<sub>P</sub>*)-12au en bruto como se describe en el Ejemplo 49 usando 8a en lugar de 8u y el reactivo quiral ( $\alpha\text{S}$ , 2*R*)-6 en lugar del reactivo quiral ( $\alpha\text{R}$ , 2*S*)-6.

**Ejemplo 55:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, *H*-fosfonato de (*S<sub>P</sub>*)-4-*N*-benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)citidin-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridin-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-12cu] mediante la Ruta B.

45 Se produce (*S<sub>P</sub>*)-12cu en bruto como se describe en el Ejemplo 49 usando 8c en lugar de 8u y el reactivo quiral ( $\alpha\text{S}$ , 2*R*)-6 en lugar del reactivo quiral ( $\alpha\text{R}$ , 2*S*)-6.

**Ejemplo 56:** Síntesis de un dímero de análogo de ARN, *H*-fosfonato de (*S<sub>P</sub>*)-2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(*tert*-butildifenilsilil)-2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)guanosa-3'-il 2',3'-*O*-bis(*tert*-butildimetilsilil)uridina-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-12gu] mediante la Ruta B.

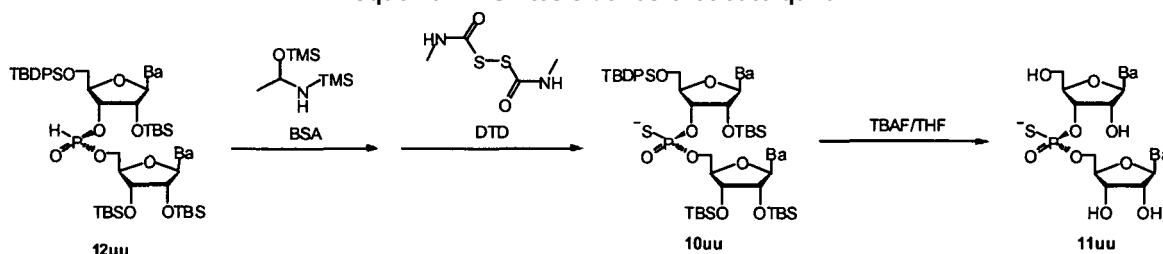
5 Se produce (*S<sub>P</sub>*)-12gu en bruto como se describe en el Ejemplo 49 usando 8g en lugar de 8u y el reactivo quiral ( $\alpha$ S, 2R)-6 en lugar del reactivo quiral ( $\alpha$ R, 2S)-6.

**Ejemplo 57:** Modificación para formar uridina-3'-il uridina-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*R<sub>P</sub>*)-11uu].

10 Se seca (*S<sub>P</sub>*)-12uu por coevaporación repetida con piridina seca y tolueno seco, y entonces se disuelve en CH<sub>3</sub>CN (1 ml). Se añade *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA; 100  $\mu$ l). Después de 1 min, se añade disulfuro de *N,N*-dimetiltiuram (DTD; 120  $\mu$ moles). Después de 3 min adicionales, la mezcla se concentra a sequedad a presión reducida dando (*R<sub>P</sub>*)-10uu en bruto. Entonces, se disuelve (*R<sub>P</sub>*)-10uu en bruto en solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M (TBAF) en THF seco (1 ml). La mezcla se agita durante 12 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón acetato de trietilamonio 0,05 M (pH 6,9, 5 ml) a la mezcla, y la mezcla se lava con Et<sub>2</sub>O (3  $\times$  5 ml). Las fases orgánicas combinadas se retro-extraen con tampón acetato de trietilamonio 0,05 M (5 ml). Las fases acuosas combinadas se concentran entonces a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por cromatografía en columna de fase inversa [un gradiente lineal de acetonitrilo 0-10 % en tampón acetato de trietilamonio 0,1 M (pH 6,9)] proporcionando (*R<sub>P</sub>*)-11uu. El esquema de modificación se muestra en el Esquema 17.

20

**Esquema 17. Síntesis de fosforotioato quiral.**



**Ejemplo 58:** Modificación para formar adenosina-3'-il uridina-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*R<sub>P</sub>*)-11au].

25

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-11au como se describe en el Ejemplo 57 usando (*S<sub>P</sub>*)-12au en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-12uu.

**Ejemplo 59:** Modificación para formar citidina-3'-il uridina-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*R<sub>P</sub>*)-11cu].

30

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-11cu como se describe en el Ejemplo 57 usando (*R<sub>P</sub>*)-12cu en lugar de (*R<sub>P</sub>*)-12uu.

**Ejemplo 60:** Modificación para formar guanosa-3'-il uridina-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*R<sub>P</sub>*)-11gu].

35

Se produce (*R<sub>P</sub>*)-11gu como se describe en el Ejemplo 57 usando (*S<sub>P</sub>*)-12gu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-12uu.

**Ejemplo 61:** Modificación para formar uridina-3'-il uridina-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*S<sub>P</sub>*)-11uu].

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-11uu como se describe en el Ejemplo 57 usando (*R<sub>P</sub>*)-12uu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-12uu.

40

**Ejemplo 62:** Modificación para formar adenosina-3'-il uridina-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*S<sub>P</sub>*)-11au].

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-11au como se describe en el Ejemplo 57 usando (*R<sub>P</sub>*)-12au en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-12uu.

45

**Ejemplo 63:** Modificación para formar citidina-3'-il uridina-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*S<sub>P</sub>*)-11cu].

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-11cu como se describe en el Ejemplo 57 usando (*R<sub>P</sub>*)-12cu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-12uu.

**Ejemplo 64:** Modificación para formar guanosa-3'-il uridina-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-trietilamonio [(*S<sub>P</sub>*)-11gu].

50

Se produce (*S<sub>P</sub>*)-11gu como se describe en el Ejemplo 57 usando (*R<sub>P</sub>*)-12gu en lugar de (*S<sub>P</sub>*)-12uu de una manera similar a (*R<sub>P</sub>*)-11uu.

**Ejemplo 65:** Síntesis en fase sólida de análogos de ADN que tienen restos de X-fosfonato mediante el Esquema 5 (Ruta A).

55

Se usa resina HCP o CPG cargada con 5'-*O*-(DMTr)timidina (0,5  $\mu$ moles) mediante un conector de succinilo para la síntesis. El alargamiento de cadena se realiza repitiendo las etapas en la Tabla 1. Después del alargamiento de

cadena, el grupo 5'-O-DMTr se elimina mediante tratamiento con 3 % de DCA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 s) y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El oligómero sobre la resina HCP o CPG se trata entonces con 25 % de NH<sub>3</sub>-piridina (9:1, v/v) durante 15 h a 55 °C para eliminar los auxiliares quirales y los grupos protectores de las nucleobases y también para liberar el oligómero de la resina HCP o CPG. La resina HCP o CPG se elimina por filtración y se lava con H<sub>2</sub>O. El filtrado se concentra a sequedad. El residuo se disuelve en H<sub>2</sub>O, se lava con Et<sub>2</sub>O, y los lavados combinados se retro-extraen con H<sub>2</sub>O. Las fases acuosas combinadas se concentran a sequedad. El producto en bruto resultante se analiza y/o purifica por HPLC de fase inversa con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón de acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 60 min a 50 °C a una tasa de 0,5 ml/min proporcionando ADN de X-fosfonato estereoregular.

Tabla 1.

etapa	Operación	reactivos y disolvente	tiempo
1	destritilación	3 % de DCA en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3 x 30 s
2	lavado	(i) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (ii) piridina seca (iii) secar a vacío.	-
3	acoplamiento	monómero pre-activado (0,2 M)* en piridina seca	15 min
4	lavado	(i) piridina seca (ii) CH <sub>3</sub> CN seco (iii) secar a vacío.	-
5	transformación	electrófilo de azufre, electrófilo de selenio o agente de borano	5 min
6	lavado	(i) THF seco (ii) secar a vacío.	-
7	terminación	CF <sub>3</sub> COIm - 2,6-lutidina - THF seco (1:1:8, v/v/v) bajo argón	30 s
8	lavado	(i) THF seco (ii) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-

\* preparación de monómero pre-activado en la etapa 3 de la Tabla 1: Se seca 5'-O-(DMTr)-2'-desoxirribonucleósido-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio por coevaporaciones repetidas con piridina seca y entonces se disuelve en piridina seca. Se añade BopCl a la solución, y la mezcla se agita durante 5 min. A la mezcla se añade gota a gota una solución de aminoalcohol (L-2 o D-2), que se seca por coevaporaciones repetidas con piridina seca y se disuelve en piridina seca, mediante una jeringa, y la mezcla se agita durante 5 min bajo argón.

#### All-(Rp)-[TPs]<sub>9</sub>T (fosforotioato).

Según el procedimiento típico descrito anteriormente, 3'-O-succinato de 5'-O-(DMTr)timidina unido a HCP (0,5 μmoles) da all-(Rp)-[TPs]<sub>9</sub>T [1,52 unidades de A<sub>260</sub>, 17,7 nmoles (35 %) basado en la suposición de 7 % de hipocromicidad: UV (H<sub>2</sub>O) α<sub>máx</sub> 267 nm, α<sub>mín</sub> 236 nm] después de la purificación de un décimo del producto en bruto por RP-HPLC. <4 % del oligómero purificado se digiere por incubación con nucleasa P1 durante 1 h a 37 °C.

**Ejemplo 66:** Síntesis en fase sólida de análogos de ADN que tienen restos de X-fosfonato mediante el Esquema 6 (Ruta B).

Se trata resina CPG cargada con 5'-O-(DMTr)timidina mediante un conector de succinilo u oxalilo con 1 % de TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 s) para la eliminación del grupo 5'-O-DMTr, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y piridina seca y se seca a vacío. El alargamiento de cadena se realiza repitiendo las siguientes etapas (a) y (b). (a) Reacción de acoplamiento usando una solución que contiene el monómero pre-activado\* correspondiente (0,2 M) en piridina seca (10 min) bajo argón. Después de la condensación, el soporte sólido se lava con piridina seca y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. (b) Eliminación del grupo 5'-O-DMTr y el auxiliar quiral simultáneamente mediante tratamiento con 1 % de TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Et<sub>3</sub>SiH (1:1, v/v) (3 × 5 s), y lavados posteriores con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y piridina seca. Los H-fosfonatos de oligonucleósido resultantes sobre la resina se convierten en ADN de X-fosfonato como se describe más adelante.

\* preparación de monómero pre-activado: Se seca 5'-O-(DMTr)-2'-desoxirribonucleósido-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio por coevaporaciones repetidas con piridina seca y entonces se disuelve en piridina seca. Se añade BopCl a la solución, y la mezcla se agita durante 5 min. A la mezcla se añade gota a gota una solución de aminoalcohol (L-6 o D-6), que se seca por coevaporación repetida con piridina seca y se disuelve en piridina seca, mediante una jeringa, y la mezcla se agita durante 5 min bajo argón.

#### Fosforotioato (X = S).

Se trata H-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de succinilo obtenido como antes con 10 % en peso de S<sub>8</sub> en CS<sub>2</sub>-piridina-trietilamina (35:35:1, v/v/v) a TA durante 3 h, y se lava sucesivamente con CS<sub>2</sub>, piridina y CH<sub>3</sub>CN. La resina se trata con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> a TA durante 12 h, y se lava con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas se combinan y se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC proporcionando ADN de fosforotioato estereoregulado.

#### Boranofosfato (X = BH<sub>3</sub>).

Se añaden DMF seca, N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) y BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub> al H-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido como antes a TA. Después de 15 min, la resina se lava sucesivamente con DMF, CH<sub>3</sub>CN y CH<sub>3</sub>OH. La resina se trata entonces con una solución saturada de NH<sub>3</sub> en CH<sub>3</sub>OH a TA durante 12 h, y se lava con CH<sub>3</sub>OH. Las soluciones de CH<sub>3</sub>OH se combinan y se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC proporcionando ADN de boranofosfato

estereoregulado.

**Hidroximetilfosfonato (X = CH<sub>2</sub>OH).**

5 Se trata *H*-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido como antes con cloruro de trimetilsililo 0,1 M (TMSCl) en piridina-1-metil-2-pirrolidona (NMP) (1:9, v/v) a TA durante 10 min, y con formaldehído gaseoso a TA durante 30 min, y entonces se lava con NMP y CH<sub>3</sub>CN. La resina se trata entonces con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> a TA durante 12 h, y se lava con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC proporcionando  
10 ADN de hidroximetilfosfonato estereoregulado.

**Fosforamidato (X = NH<sub>2</sub>).**

15 Se trata *H*-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido como antes con una solución saturada de NH<sub>3</sub> en CCl<sub>4</sub>-1,4-dioxano (4:1, v/v) a 0 °C durante 30 min, y se lava con 1,4-dioxano. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, se tratan con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> a TA durante 12 h y se lavan con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC proporcionando ADN de  
20 fosforamidato estereoregulado.

***N*-propilfosforamidato (X = NHPr).**

25 Se trata *H*-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido como antes con CCl<sub>4</sub>-propilamina (9:1, v/v) a TA durante 1 h, y se lava con CH<sub>3</sub>OH. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, se tratan con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> a TA durante 12 h y se lavan con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC proporcionando ADN de *N*-propilfosforamidato estereoregulado.

***N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato [X = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>].**

30 Se trata *H*-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido como antes con CCl<sub>4</sub>-2-dimetilaminoetilamina (9:1, v/v) a TA durante 1 h, y se lava con CH<sub>3</sub>CN. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, se tratan con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> a TA durante 12 h y se lavan con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas combinadas se concentran a sequedad a presión  
35 reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC proporcionando ADN de *N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato estereoregulado.

**Ejemplo 67:** Síntesis de all-(S<sub>P</sub>)-d[C<sub>S</sub>A<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T] (fosforotioato).

40 Se sintetiza el *H*-fosfonato de oligonucleósido correspondiente en una resina CPG mediante un conector de succinilo como se ha descrito anteriormente, y se trata con una solución 0,2 M de reactivo de Beaucage en BSA-CH<sub>3</sub>CN (1:8, v/v) a TA durante 30 min, y la resina se lava con CH<sub>3</sub>CN. La resina se trata entonces con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> a TA durante 12 h y se lava con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se analiza y caracteriza por RP-HPLC y EM-MALDI TOF. La RP-HPLC se realiza  
45 con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón de acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 60 min a 50 °C a un caudal de 0,5 ml/min usando una columna μBondasphere 5 μm C18 (100 Å, 3,9 mm × 150 mm) (Waters).

**Ejemplo 68:** Síntesis de all-(R<sub>P</sub>)-d[C<sub>S</sub>A<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T] (fosforotioato).

50 Se sintetiza el *H*-fosfonato de oligonucleósido correspondiente en una resina CPG mediante un conector de succinilo como se ha descrito anteriormente, y se trata con una solución 0,2 M de reactivo de Beaucage en BSA-CH<sub>3</sub>CN (1:8, v/v) (0,2 ml) a TA durante 30 min, y la resina se lava con CH<sub>3</sub>CN. La resina se trata con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> (5 ml) a TA durante 12 h, y se lava con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se analiza y caracteriza por RP-HPLC y EM-MALDI TOF. La RP-HPLC se realiza  
55 con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 60 min a 50 °C a un caudal de 0,5 ml/min usando una columna μBondasphere 5 μm C18 (100 Å, 3,9 mm × 150 mm) (Waters).

**Ejemplo 69:** Síntesis de all-(S<sub>P</sub>)-[T<sub>S</sub>]<sub>9</sub>T (fosforotioato).

60 Se sintetiza el *H*-fosfonato de oligonucleósido correspondiente en una resina CPG mediante un conector de succinilo como se ha descrito anteriormente, y se trata con una solución 0,2 M de reactivo de Beaucage en BSA-CH<sub>3</sub>CN (1:8, v/v) (0,2 ml) a TA durante 30 min, y la resina se lava con CH<sub>3</sub>CN. La resina CPG se trata con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> (5 ml) a TA durante 24 h, y se lava con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se analiza y caracteriza por RP-HPLC y EM-MALDI TOF. La RP-HPLC se realiza  
65 con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón de acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 80 min a 30 °C a un caudal de 0,5 ml/min usando una columna μBondasphere 5 μm C18 (100 Å, 3,9 mm × 150 mm)

(Waters).

**Ejemplo 70:** Síntesis de all-(R<sub>P</sub>)-[T<sub>S</sub>]<sub>9</sub>T (fosforotioato).

5 Se sintetiza el *H*-fosfonato de oligonucleósido correspondiente en una resina CPG mediante un conector de succinilo como se ha descrito anteriormente, y se trata con una solución 0,2 M de reactivo de Beaucage en BSA-CH<sub>3</sub>CN (1:8, v/v) (0,2 ml) a TA durante 30 min, y la resina se lava con CH<sub>3</sub>CN. La resina se trata con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub> (5 ml) a TA durante 24 h, y se lava con H<sub>2</sub>O. Las soluciones acuosas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se analiza y caracteriza por RP-HPLC y EM-MALDI TOF. La RP-HPLC se realiza con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón de acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 80 min a 30 °C a un caudal de 0,5 ml/min usando una columna μBondasphere 5 μm C18 (100 Å, 3,9 mm × 150 mm) (Waters).

**Ejemplo 71:** Síntesis de all-(R<sub>P</sub>)-[T<sub>B</sub>]<sub>3</sub>T (boranofosfato).

15 Se sintetiza el *H*-fosfonato de oligonucleósido correspondiente en una resina CPG mediante un conector de succinilo como se ha descrito anteriormente, y se trata con una mezcla de DMF seca (0,8 ml), BSA (0,1 ml) y BH<sub>3</sub>·S(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,1 ml) a TA durante 15 min, y la resina se lava sucesivamente con DMF, CH<sub>3</sub>CN y CH<sub>3</sub>OH. La resina se trata entonces con una solución saturada de NH<sub>3</sub> en CH<sub>3</sub>OH (5 ml) a TA durante 2 h, y se lava con CH<sub>3</sub>OH. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se analiza y caracteriza por RP-HPLC y EM-MALDI TOF. La RP-HPLC se realiza con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón de acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 60 min a 30 °C a un caudal de 0,5 ml/min usando una PEGASIL ODS 5 μm (120 Å, 4,0 mm × 150 mm) (Senshu Pak).

**Ejemplo 72:** Síntesis de all-(S<sub>P</sub>)-[T<sub>B</sub>]<sub>3</sub>T (boranofosfato).

25 Se sintetiza el *H*-fosfonato de oligonucleósido correspondiente en una resina CPG mediante un conector de succinilo como se ha descrito anteriormente, y se trata con una mezcla de DMF seca (0,8 ml), BSA (0,1 ml) y BH<sub>3</sub>·S(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,1 ml) a TA durante 15 min, y la resina se lava sucesivamente con DMF, CH<sub>3</sub>CN y CH<sub>3</sub>OH. La resina se trata entonces con una solución saturada de NH<sub>3</sub> en CH<sub>3</sub>OH (5 ml) a TA durante 2 h, y se lava con CH<sub>3</sub>OH. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se analiza y caracteriza por RP-HPLC y EM-MALDI TOF. La RP-HPLC se realiza con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón de acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 60 min a 30 °C a un caudal de 0,5 ml/min usando una PEGASIL ODS 5 μm (120 Å, 4,0 mm × 150 mm) (Senshu Pak).

35 **Ejemplo 73:** Síntesis de all-(S<sub>P</sub>)-[T<sub>N</sub>]<sub>3</sub>T (*N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato).

Se sintetiza el *H*-fosfonato de oligonucleósido correspondiente en una resina CPG mediante un conector de oxalilo como se ha descrito anteriormente, y se trata con CCl<sub>4</sub>-2-dimetilaminoetilamina (9:1, v/v) a TA durante 1 h, y se lava con CH<sub>3</sub>CN. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se analiza y caracteriza por RP-HPLC y EM-MALDI TOF. La RP-HPLC se realiza con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón de acetato de trietilamonio 0,1 M (pH 7,0) durante 60 min a 30 °C a un caudal de 0,5 ml/min usando una PEGASIL ODS 5 μm (120 Å, 4,0 mm × 150 mm) (Senshu Pak).

45 **Ejemplo 74:** Síntesis de all-(R<sub>P</sub>)-[T<sub>N</sub>]<sub>3</sub>T (*N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato).

Se sintetiza el *H*-fosfonato de oligonucleósido correspondiente en una resina CPG mediante un conector de oxalilo como se ha descrito anteriormente, y se trata con CCl<sub>4</sub>-2-dimetilaminoetilamina (9:1, v/v) a TA durante 1 h, y se lava con CH<sub>3</sub>CN. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida, y el residuo se analiza y caracteriza por RP-HPLC y EM-MALDI TOF. La RP-HPLC se realiza con un gradiente lineal de 0-20 % de acetonitrilo en tampón de acetato de trietilamonio 0,1 M (pH 7,0) durante 60 min a 30 °C a un caudal de 0,5 ml/min usando una PEGASIL ODS 5 μm (120 Å, 4,0 mm × 150 mm) (Senshu Pak).

**Ejemplo 75:** Un procedimiento general para la síntesis en fase sólida de ARN de X-fosfonato mediante el Esquema 5 (Ruta A).

55 Se usa resina HCP o CPG cargada con 5'-O-(DMTr)uridina mediante un conector de succinilo para la síntesis. El alargamiento de cadena se realiza repitiendo las etapas en la Tabla 2. Después del alargamiento de cadena el grupo 5'-O-DMTr se elimina mediante tratamiento con 3 % de DCA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la resina se lava sucesivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y EtOH. La resina se trata entonces con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) durante 2 h a temperatura ambiente y se elimina por filtración. El filtrado se diluye con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) y se pone en un matraz herméticamente sellado durante 48 h a temperatura ambiente. La solución se concentra a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC. Se recogen las fracciones que contienen los ARN de X-fosfonato protegidos con 2'-O-TBS deseados y se liofilizan. El residuo se trata con una solución 1 M de TBAF en THF seco durante 24 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón TEAA 0,05 M (pH 6,9), y el THF se elimina mediante evaporación. El residuo se desala con un cartucho Sep-pak C<sub>18</sub>, y se purifica por RP-HPLC proporcionando ARN de X-fosfonato estereoregular.

Tabla 2.

etapa	Operación	reactivos y disolvente	tiempo
1	destritilación	3 % de DCA en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4 x 30 s
2	lavado	(i) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (ii) piridina seca (iii) secar a vacío.	-
3	acoplamiento	monómero pre-activado (0,2 M)* en piridina seca	15 min
4	lavado	(i) piridina seca (ii) CH <sub>3</sub> CN seco (iii) secar a vacío.	-
5	transformación	electrófilo de azufre, electrófilo de selenio o agente de borano	5 min
6	lavado	(i) THF seco (ii) secar a vacío.	-
7	terminación	CF <sub>3</sub> COIm - 2,6-lutidina - THF seco (1:1:8, v/v/v) bajo argón	30 s
8	lavado	(i) THF seco (ii) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-

\* preparación de monómero pre-activado en la etapa 3 de la Tabla 2: Se seca 5'-O-(DMTr)-2'-O-(TBS)-ribonucleósido-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio por coevaporaciones repetidas con piridina seca y entonces se disuelve en piridina seca. Se añade BopCl a la solución, y la mezcla se agita durante 5 min. A la mezcla se añade gota a gota una solución de aminoalcohol (L-2 o D-2), que se coevaporaciones repetidas con piridina seca y se disuelve en piridina seca, mediante una jeringa, y la mezcla se agita durante 5 min bajo argón.

**Ejemplo 76:** Un procedimiento general para la síntesis en fase sólida de ARN de X-fosfonato mediante el Esquema 6 (Ruta B).

Procedimiento para la síntesis de ARN de H-fosfonato. Se trata resina CPG cargada con 5'-O-(DMTr)uridina mediante un conector de succinilo u oxalilo con 1 % de TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 s) para la eliminación del grupo 5'-O-DMTr, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y piridina seca y se seca a vacío. El alargamiento de cadena se realiza repitiendo las siguientes etapas (a) y (b). (a) Reacción de acoplamiento usando una solución que contiene el monómero pre-activado\* correspondiente (0,2 M) en piridina seca (10 min) bajo argón. Después de la condensación, el soporte sólido se lava con piridina seca y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. (b) Eliminación del grupo 5'-O-DMTr y el auxiliar quiral simultáneamente mediante tratamiento con 1 % de TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Et<sub>3</sub>SiH (1:1, v/v) (3 x 5 s), y lavados posteriores con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y piridina seca. Los H-fosfonatos de oligonucleósido resultantes en la resina se convierten en análogos de ARN modificados en el esqueleto como se describe a continuación.

\*preparación de monómero pre-activado

Se seca 5'-O-(DMTr)-2'-O-(TBS)-ribonucleósido-3'-ilfosfonato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio por coevaporaciones repetidas con piridina seca y entonces se disuelve en piridina seca. Se añade BopCl a la solución, y la mezcla se agita durante 5 min. A la mezcla se añade gota a gota una solución de aminoalcohol (L-6 o D-6), que se seca por coevaporaciones repetidas con piridina seca y se disuelve en piridina seca, mediante una jeringa, y la mezcla se agita durante 5 min bajo argón.

#### Fosforotioato (X = S).

Se trata H-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de succinilo obtenido como antes con 10 % en peso de S<sub>8</sub> en CS<sub>2</sub>-piridina-trietilamina (35:35:1, v/v/v) a TA durante 3 h, y se lava sucesivamente con CS<sub>2</sub>, piridina y EtOH. La resina se trata entonces con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) durante 2 h a temperatura ambiente y se elimina por filtración. El filtrado se diluye con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) y se pone en un matraz herméticamente sellado durante 12 h a temperatura ambiente. La solución se concentra a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC. Se recogen y liofilizan las fracciones que contienen los ARN de fosforotioato protegidos con 2'-O-TBS deseados. El residuo se trata con una solución 1 M de TBAF en THF seco durante 24 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón TEAA 0,05 M (pH 6,9), y se elimina el THF mediante evaporación. El residuo se desala con un cartucho Sep-pak C<sub>18</sub>, y se purifica por RP-HPLC proporcionando ARN de fosforotioato estereoregular.

#### Boranofosfato (X = BH<sub>3</sub>).

Se añaden DMF seca, N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) y BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub> al H-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido como antes a TA. Después de 15 min, la resina se lava sucesivamente con DMF, CH<sub>3</sub>CN y EtOH. La resina se trata entonces con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) durante 2 h a temperatura ambiente y se elimina por filtración. El filtrado se diluye con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) y se pone en un matraz herméticamente sellado durante 12 h a temperatura ambiente. La solución se concentra a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC. Se recogen y liofilizan las fracciones que contienen los ARN de boranofosfato protegidos con 2'-O-TBS deseados. El residuo se trata con una solución 1 M de TBAF en THF seco durante 24 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón TEAA 0,05 M (pH 6,9), y el THF se elimina mediante evaporación. El residuo se desala con un cartucho Sep-pak C<sub>18</sub>, y se purifica por RP-HPLC proporcionando ARN de boranofosfato estereoregular.

**Hidroximetilfosfonato (X = CH<sub>2</sub>OH).**

Se trata *H*-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido como antes con cloruro de trimetilsililo 0,1 M (TMSCl) en piridina-1-metil-2-pirrolidona (NMP) (1:9, v/v) a TA durante 10 min, y con formaldehído gaseoso a TA durante 30 min, y entonces se lava con NMP y EtOH. La resina se trata entonces con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) durante 2 h a temperatura ambiente y se elimina por filtración. El filtrado se diluye con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) y se pone en un matraz herméticamente sellado durante 12 h a temperatura ambiente. La solución se concentra a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC. Se recogen y liofilizan las fracciones que contienen los ARN de hidroximetilfosfonato protegidos con 2'-*O*-TBS deseados. El residuo se trata con una solución 1 M de TBAF en THF seco durante 24 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón TEAA 0,05 M (pH 6,9), y el THF se elimina mediante evaporación. El residuo se desala con un cartucho Sep-pak C<sub>18</sub>, y se purifica por RP-HPLC proporcionando ARN de hidroximetilfosfonato estereoregular.

**Fosforamidato (X = NH<sub>2</sub>).**

Se trata *H*-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido con una solución saturada de NH<sub>3</sub> en CCl<sub>4</sub>-1,4-dioxano (4:1, v/v) a 0 °C durante 30 min, y se lava con 1,4-dioxano. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida. El filtrado se diluye con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) y se pone en un matraz herméticamente sellado durante 12 h a temperatura ambiente. La solución se concentra a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC. Se recogen y liofilizan las fracciones que contienen los ARN de fosforamidato protegidos con 2'-*O*-TBS deseados. El residuo se trata con una solución 1 M de TBAF en THF seco durante 24 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón TEAA 0,05 M (pH 6,9), y el THF se elimina mediante evaporación. El residuo se desala con un cartucho Sep-pak C<sub>18</sub>, y se purifica por RP-HPLC proporcionando ARN de fosforamidato estereoregular.

***N*-propilfosforamidato (X = NHPr).**

Se trata *H*-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido con CCl<sub>4</sub>-propilamina (9:1, v/v) a TA durante 1 h, y se lava con CH<sub>3</sub>OH. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida. El filtrado se diluye con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) y se pone en un matraz herméticamente sellado durante 12 h a temperatura ambiente. La solución se concentra a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC. Se recogen y liofilizan las fracciones que contienen los ARN de *N*-propilfosforamidato protegidas con 2'-*O*-TBS deseados. El residuo se trata con una solución 1 M de TBAF en THF seco durante 24 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón TEAA 0,05 M (pH 6,9), y el THF se elimina mediante evaporación. El residuo se desala con un cartucho Sep-pak C<sub>18</sub>, y se purifica por RP-HPLC proporcionando ARN de *N*-propilfosforamidato estereoregular.

***N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato [X = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>].**

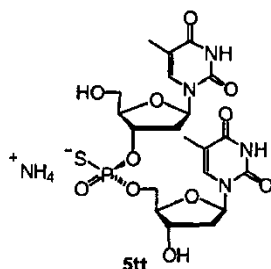
Se trata *H*-fosfonato de oligonucleósido cargado en una resina CPG mediante un conector de oxalilo obtenido con CCl<sub>4</sub>-2-dimetilaminoetilamina (9:1, v/v) a TA durante 1 h, y se lava con CH<sub>3</sub>CN. Las soluciones orgánicas combinadas se concentran a sequedad a presión reducida. El filtrado se diluye con una solución acuosa al 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (3:1, v/v) y se pone en un matraz herméticamente sellado durante 12 h a temperatura ambiente. La solución se concentra a presión reducida, y el residuo se purifica por RP-HPLC. Se recogen y liofilizan las fracciones que contienen los ARN de *N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato protegidos con 2'-*O*-TBS deseados. El residuo se trata con una solución 1 M de TBAF en THF seco durante 24 h a temperatura ambiente. Se añade una solución de tampón TEAA 0,05 M (pH 6,9), y el THF se elimina mediante evaporación. El residuo se desala con un cartucho Sep-pak C<sub>18</sub>, y se purifica por RP-HPLC proporcionando ARN de *N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato estereoregular.

**Ejemplo 77: Síntesis en fase sólida; Procedimiento general para la preparación de solución de monómero pre-activado**

Se secó monoéster de *H*-fosfonato apropiado por coevaporaciones repetidas con piridina seca y tolueno seco, entonces se disolvió en disolvente seco. A la solución se añadió gota a gota reactivo de condensación, y se agitó durante 10 min. Entonces se añadió aminoalcohol y se agitó durante 10 min adicionales dando la solución de monómero pre-activado.

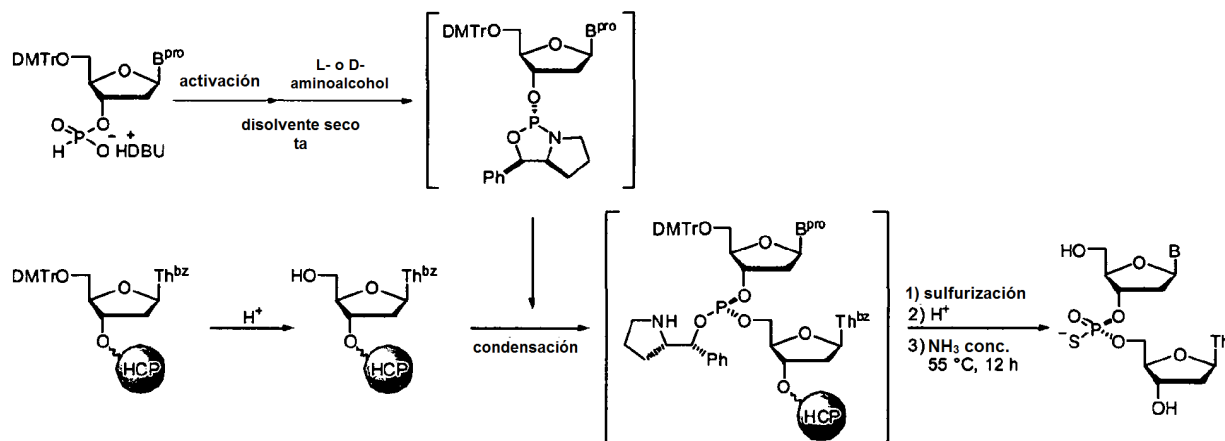
60

**Ejemplo 78:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5tt] mediante la Ruta A.



5 Se trató resina HCP cargada con *N*<sup>3</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidina (16,4 mg; 30,5 μmol/g, 0,5 μmoles) mediante un conector de succinilo con 3 % de DCA / DCM (3 × 1 ml), entonces se lavó con DCM (3 × 1 ml) y MeCN seco (3 × 1 ml). Después de secarse la resina a presión reducida (>5 min), se añadió solución de monómero pre-  
 10 activado (250 μl, 25 μmoles; que consistía en *N*<sup>3</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles, para monoéster de *H*-fosfonato), MeCN-piridina (9:1, v/v, para disolvente), Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (62,5 μmoles, para reactivo de condensación) y L-2 (30 μmoles, para aminoalcohol). Agitándose durante 2 min, la solución de reacción se eliminó, y la resina se lavó con MeCN (3 × 1 ml) y se secó a presión reducida (>5 min). Para la etapa de modificación, el producto intermedio resultante sobre la resina se sulfurizó mediante tratamiento con DTD 0,3 M / MeCN (500 μl, 150 μmoles) durante 5 min, la resina se lavó entonces con MeCN (3 × 1 ml) y DCM (3 × 1 ml). El grupo 5'-O-DMTr se eliminó mediante tratamiento con 3 % de DCA / DCM (3 × 1 ml), y la resina se lavó con DCM (3 × 1 ml). El dímero de fosforotioato sobre la resina se trató entonces con 25 % de NH<sub>3</sub> (1 ml) durante 12 h a 55 °C para eliminar el auxiliar quiral y los grupos protectores de las nucleobases y también para liberar el dímero de la resina. La resina se eliminó por filtración y se lavó con H<sub>2</sub>O. El filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en H<sub>2</sub>O (2 ml), se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 × 2 ml), y los lavados combinados se retro-extrajeron con H<sub>2</sub>O (2 ml). Las fases acuosas combinadas se concentraron a sequedad. El producto en bruto resultante se analizó por UPLC<sup>®</sup> de fase inversa con un gradiente lineal de 0-20 % de MeOH en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 15 min a 55 °C a una tasa de 0,4 ml/min. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5tt fue del 97 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 2:98). Tiempo de retención: 13,4 min ((*R<sub>P</sub>*)-5tt: 12,3 min). El Esquema general se muestra en el Esquema 18. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 5A. En otra síntesis de (*S<sub>P</sub>*)-5tt, se usó BTC (20 μmoles) en lugar de Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (62,5 μmoles). El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5tt fue del 95 % de rendimiento (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 3:97). Tiempo de retención: 13,5 min ((*R<sub>P</sub>*)-5tt: 12,4 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 5B.

30 **Esquema 18. Síntesis en fase sólida general de dímeros de fosforotioato mediante la Ruta A**



**Ejemplo 79:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5tt].

35 Se trató resina HCP cargada con *N*<sup>3</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidina (16,4 mg; 30,5 μmol/g, 0,5 μmoles) mediante un conector de succinilo con 3 % de DCA / DCM (3 × 1 ml), entonces se lavó con DCM (3 × 1 ml) y MeCN seco (3 × 1 ml). Después de secarse la resina a presión reducida (>5 min), se añadió solución de monómero pre-  
 40 activado (200 μl, 25 μmoles; que consiste en *N*<sup>3</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles, para monoéster de *H*-fosfonato), MeCN-CMP (9:1, v/v, para disolvente), Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (62,5 μmoles, para reactivo de condensación) y L-2 (30 μmoles, para aminoalcohol), seguido de la adición



de CMPT 5 M / MeCN (50  $\mu$ l, 250  $\mu$ moles, para reactivo de activación). Agitándose durante 10 min, la solución de reacción se eliminó, y la resina se lavó con MeCN (3  $\times$  1 ml), se secó a presión reducida (>5 min). El producto intermedio resultante sobre la resina se sulfurizó mediante tratamiento con DTD 0,3 M / MeCN (500  $\mu$ l, 150  $\mu$ moles) durante 5 min, entonces la resina se lavó con MeCN (3  $\times$  1 ml) y DCM (3  $\times$  1 ml). El grupo 5'-O-DMTr se eliminó mediante tratamiento con 3 % de DCA / DCM (3  $\times$  1 ml), y se lavó con DCM (3  $\times$  1 ml). El dímero de fosforotioato sobre la resina se trató entonces con 25 % de NH<sub>3</sub> (1 ml) durante 12 h a 55 °C para eliminar el auxiliar quiral y los grupos protectores de las nucleobases y también para liberar el dímero de la resina. La resina se eliminó por filtración y se lavó con H<sub>2</sub>O. El filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en H<sub>2</sub>O (2 ml), se lavó con Et<sub>2</sub>O (3  $\times$  2 ml), y los lavados combinados se retro-extrajeron con H<sub>2</sub>O (2 ml). Las fases acuosas combinadas se concentraron a sequedad. El producto en bruto resultante se analizó por UPLC<sup>®</sup> de fase inversa con un gradiente lineal de 0-20 % de MeOH en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 15 min a 55 °C a una tasa de 0,4 ml/min. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**S<sub>P</sub>**)-**5tt** tuvo un rendimiento del 98 % ( $R_P:S_P = 1:99$ ). Tiempo de retención: 13,5 min ((**R<sub>P</sub>**)-**5tt**: 12,4 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 6A. Este compuesto también se obtuvo usando "BTC (16  $\mu$ moles) y L-2 (26  $\mu$ moles)" en lugar de "Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (62,5  $\mu$ moles) y L-2 (30  $\mu$ moles)" en un modo similar descrito. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**S<sub>P</sub>**)-**5tt** fue del 95 % de rendimiento ( $R_P:S_P = 1:99$ ). Tiempo de retención: 13,5 min ((**R<sub>P</sub>**)-**5tt**: 12,4 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 6B.

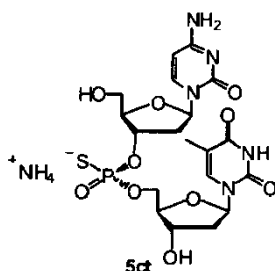
**Ejemplo 80:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (**R<sub>P</sub>**)-amonio [(**R<sub>P</sub>**)-**5tt**] mediante la Ruta A.

Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (30  $\mu$ moles)" en lugar de "L-2 (30  $\mu$ moles)" de un modo similar al "Ejemplo 78". El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**R<sub>P</sub>**)-**5tt** fue del 98 % ( $R_P:S_P = 97:3$ ). Tiempo de retención: 12,2 min ((**S<sub>P</sub>**)-**5tt**: 13,5 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 7A. En otra síntesis de (**R<sub>P</sub>**)-**5tt**, se usó BTC (20  $\mu$ moles) en lugar de Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (62,5  $\mu$ moles). El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**R<sub>P</sub>**)-**5tt** fue del 97 % ( $R_P:S_P = 95:5$ ). Tiempo de retención: 12,3 min ((**S<sub>P</sub>**)-**5tt**: 13,6 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 7B.

**Ejemplo 81:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (**R<sub>P</sub>**)-amonio [(**R<sub>P</sub>**)-**5tt**] mediante la Ruta A.

Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (30  $\mu$ moles)" en lugar de "L-2 (30  $\mu$ moles)" de un modo similar al "Ejemplo 79". El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**R<sub>P</sub>**)-**5tt** fue del 98 % ( $R_P:S_P = 98:2$ ). Tiempo de retención: 12,3 min ((**S<sub>P</sub>**)-**5tt**: 13,6 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 8.

**Ejemplo 82:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxicitidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (**S<sub>P</sub>**)-amonio [(**S<sub>P</sub>**)-**5ct**] mediante la Ruta A.

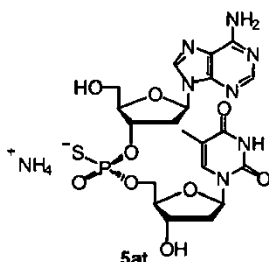


Este compuesto se obtuvo usando "4-*N*-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxicitidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25  $\mu$ moles)" en lugar de "*N* <sup>$\beta$</sup> -benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25  $\mu$ moles)" de un modo similar al Ejemplo 78. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**S<sub>P</sub>**)-**5ct** fue del 98 % ( $R_P:S_P = 3:97$ ). Tiempo de retención: 9,7 min ((**R<sub>P</sub>**)-**5ct**: 8,7 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 9A. Este compuesto también se obtuvo usando "BTC (16  $\mu$ moles) y L-2 (26  $\mu$ moles)" en lugar de "Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (62,5  $\mu$ moles) y L-2 (30  $\mu$ moles)" como se describió. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**S<sub>P</sub>**)-**5ct** fue del 94 % ( $R_P:S_P = 3:97$ ). Tiempo de retención: 9,7 min ((**R<sub>P</sub>**)-**5ct**: 8,7 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 9B.

**Ejemplo 83:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxicitidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-5ct] mediante la Ruta A.

Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (30 μmoles)" en lugar de "L-2 (30 μmoles)" de un modo similar al experimento para el Ejemplo 82, Figura 9A. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5ct fue del 98 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 97:3). Tiempo de retención: 8,6 min ((*S<sub>P</sub>*)-5ct: 9,7 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 10A. Este compuesto también se obtuvo usando "D-2 (30 μmoles)" en lugar de "L-2 (30 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 82, Figura 9B. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5ct fue del 87 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 98:2). Tiempo de retención: 8,6 min ((*S<sub>P</sub>*)-5ct: 9,8 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 10B.

**Ejemplo 84:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiadenin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5at] mediante la Ruta A.

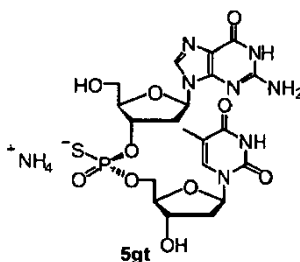


Este compuesto se obtuvo usando "6-*N,N*-dibenzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiadenin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles)" en lugar de "*N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 78. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5at fue del 96 % de rendimiento (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 1:99). Tiempo de retención: 14,0 min ((*R<sub>P</sub>*)-5at: 12,6 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 11.

**Ejemplo 85:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiadenin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-5at] mediante la Ruta A.

Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (30 μmoles)" en lugar de "L-2 (30 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 83. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5at fue del 96 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 96:4). Tiempo de retención: 12,5 min ((*S<sub>P</sub>*)-5at: 14,1 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 12.

**Ejemplo 86:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiguanin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5gt] mediante la Ruta A.



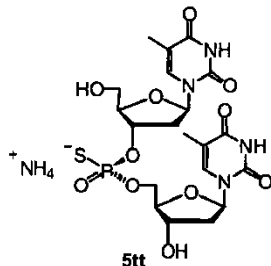
Este compuesto se obtuvo usando "*O*<sup>6</sup>-cianoetil-2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiguanin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles)" en lugar de "*N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 78. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5gt fue del 96 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 2:98). Tiempo de retención: 11,5 min ((*R<sub>P</sub>*)-5gt: 10,3 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 13.

**Ejemplo 87:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiguanin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-5gt] mediante la Ruta A.

Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (30 μmoles)" en lugar de "L-2 (30 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 86. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5gt fue del 96 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 97:3). Tiempo de retención: 10,3 min ((*S<sub>P</sub>*)-5gt: 11,6 min). El perfil de

UPLC se muestra en la Figura 14.

**Ejemplo 88:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5tt] mediante la Ruta B.



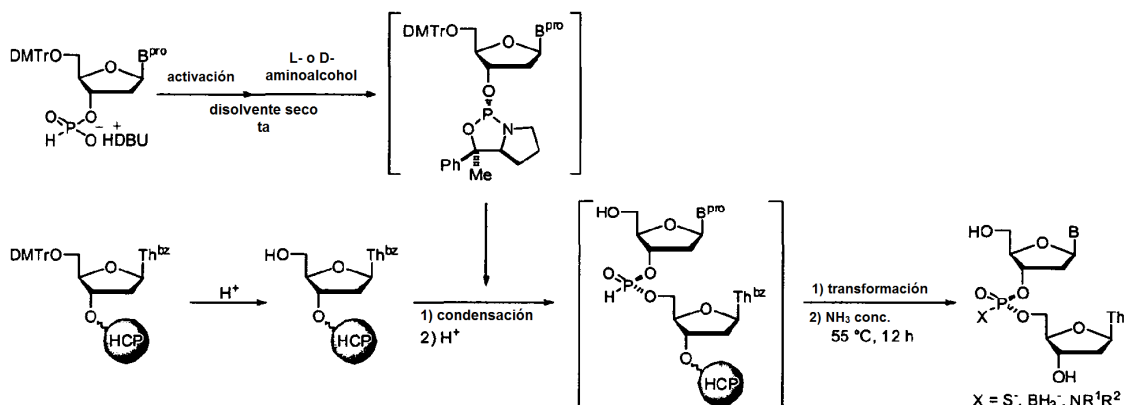
Se trató resina HCP cargada con *N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidina (16,4 mg; 30,5 μmol/g, 0,5 μmoles) mediante un conector de succinilo con 1 % de TFA / DCM (3 × 1 ml) para la eliminación del grupo 5'-*O*-DMTr, se lavó con DCM (3 × 1 ml) y MeCN seco (3 × 1 ml), y se secó a vacío. Se añadió solución de monómero pre-activado (200 μl, 50 μmoles; que consiste en *N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50 μmoles, para monoéster de *H*-fosfonato), MeCN-CMP (9:1, v/v, para disolvente), Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (125 μmoles, para reactivo de condensación) y L-6 (52 μmoles, para aminoalcohol), seguido de la adición de CMPT 5 M / MeCN (50 μl, 250 μmoles). Agitándose durante 2 min, la solución de reacción se eliminó, y la resina se lavó con MeCN (3 × 1 ml), DCM (3 × 1 ml) y se secó a presión reducida (>5 min). El grupo 5'-*O*-DMTr y el auxiliar quiral se eliminaron simultáneamente mediante tratamiento con 1 % de TFA en DCM (3 × 1 ml), se lavaron con DCM (3 × 1 ml) y MeCN seco (3 × 1 ml), y se secaron a vacío. El producto intermedio resultante sobre la resina se sulfurizó mediante tratamiento con la mezcla de solución de reactivo de Beaucage 0,2 M / MeCN (200 μl, 40 μmoles) y BSA (25 μl, 100 μmoles) durante 20 min, la resina se lavó entonces con MeCN (3 × 1 ml). El dímero de fosforotioato sobre la resina se trató entonces con 25 % de NH<sub>3</sub>-EtOH (2 ml, 4:1, v/v) durante 12 h a temperatura ambiente para eliminar los grupos protectores de las nucleobases y también para liberar el dímero de la resina. La resina se eliminó por filtración y se lavó con H<sub>2</sub>O. El filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en H<sub>2</sub>O (2 ml), se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 × 2 ml) y los lavados combinados se retro-extrajeron con H<sub>2</sub>O (2 ml). Las fases acuosas combinadas se concentraron a sequedad. El producto en bruto resultante se analizó por UPLC<sup>®</sup> de fase inversa con un gradiente lineal de 0-20 % de MeOH en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 15 min a 55 °C a una tasa de 0,4 ml/min. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (S<sub>P</sub>)-5tt fue del 96 % (R<sub>P</sub>:S<sub>P</sub> = 4:96). Tiempo de retención: 13,5 min ((R<sub>P</sub>)-5tt: 12,4 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 15A.

En una síntesis alternativa, este compuesto también se obtuvo usando "BTC (32 μmoles)" en lugar de "Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (125 μmoles)" en una manera similar a como se describió. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (S<sub>P</sub>)-5tt fue del 96 % (R<sub>P</sub>:S<sub>P</sub> = 5:95). Tiempo de retención: 13,4 min ((R<sub>P</sub>)-5tt: 12,3 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 15B.

**Ejemplo 89:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-5tt] mediante la Ruta B.

En otra síntesis alternativa, se obtuvo [(S<sub>P</sub>)-5tt] usando "*N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles), BTC (16 μmoles) y L-6 (26 μmoles)" en lugar de "*N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50 μmoles), Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (125 μmoles) y L-6 (52 μmoles)" de un modo similar a la Figura 15A, Ejemplo 88. El Esquema general se muestra en el Esquema 19. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (S<sub>P</sub>)-5tt fue del 93 % (R<sub>P</sub>:S<sub>P</sub> = 6:94). Tiempo de retención: 13,5 min ((R<sub>P</sub>)-5tt: 12,4 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 16A. Este compuesto se obtuvo usando "DTD 0,2 M / MeCN (200 μl, 80 μmoles)" en lugar de "reactivo de Beaucage 0,2 M / MeCN (200 μl, 40 μmoles)" en una manera similar a como se describió. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (S<sub>P</sub>)-5tt fue del 95 % (R<sub>P</sub>:S<sub>P</sub> = 6:94). Tiempo de retención: 13,5 min ((R<sub>P</sub>)-5tt: 12,4 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 16B.

Esquema 19

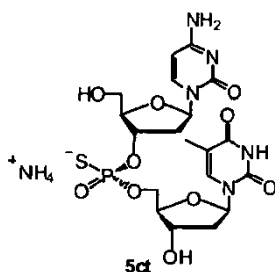


5 **Ejemplo 90:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, timidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-5tt] mediante la Ruta B.

Este compuesto se obtuvo usando "D-6 (52 μmoles)" en lugar de "L-6 (52 μmoles)" de un modo similar a los métodos en el Ejemplo 88, Figura 15A. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5tt fue del 95 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 97:3). Tiempo de retención: 12,3 min ((*S<sub>P</sub>*)-5tt: 13,6 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 17A.

Este compuesto se obtuvo usando "D-6 (52 μmoles)" en lugar de "L-6 (52 μmoles)" de un modo similar a los métodos en el Ejemplo 88, Figura 15B. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5tt fue del 94 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 97:3). Tiempo de retención: 12,3 min ((*S<sub>P</sub>*)-5tt: 13,6 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 17B.

**Ejemplo 91:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxicitidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5ct] mediante la Ruta B.



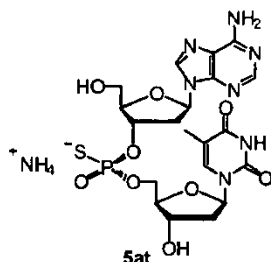
20 Este compuesto se obtuvo usando "4-*N*-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxicitidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50 μmoles)" en lugar de "*N*<sup>6</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 88. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5ct fue del 95 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 4:96). Tiempo de retención: 9,7 min ((*R<sub>P</sub>*)-5ct: 8,7 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 18.

30 **Ejemplo 92:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxicitidin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-5ct] mediante la Ruta B.

Este compuesto se obtuvo usando "D-6 (52 μmoles)" en lugar de "L-6 (52 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 91. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5ct fue del 96 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 97:3). Tiempo de retención: 8,6 min ((*S<sub>P</sub>*)-5ct: 9,8 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 19.

35

**Ejemplo 93:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiadenin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5at] mediante la Ruta B.



5 Este compuesto se obtuvo usando "6-*N,N*-dibenzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiadenin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50  $\mu$ moles)" en lugar de "*N<sup>3</sup>*-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50  $\mu$ moles)" de un modo similar al Ejemplo 88. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5at fue del 95 % de rendimiento,  $R_P:S_P = 5:95$ . Tiempo de retención: 14,0 min ((*R<sub>P</sub>*)-5at: 12,5 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 20A.

15 Este compuesto también se obtuvo usando "BTC (32  $\mu$ moles)" en lugar de " $Ph_3PCl_2$  (125  $\mu$ moles)" de un modo similar al método descrito en este ejemplo para la Figura 20A. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5at fue del 94 % ( $R_P:S_P = 5:95$ ). Tiempo de retención: 13,9 min ((*R<sub>P</sub>*)-5at: 12,5 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 20B.

**Ejemplo 94:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiadenin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5at] mediante la Ruta B.

20 Este compuesto se obtuvo usando "6-*N*-((dimetilamino)metileno)-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiadenin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50  $\mu$ moles)" en lugar de "*N<sup>3</sup>*-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50  $\mu$ moles)" de un modo similar al Ejemplo 88. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5at fue del 91 % de rendimiento,  $R_P:S_P = 5:95$ . Tiempo de retención: 13,9 min ((*R<sub>P</sub>*)-5at: 12,5 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 21.

**Ejemplo 95:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiadenin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-5at] mediante la Ruta B.

30 Este compuesto se obtuvo usando "D-6 (52  $\mu$ moles)" en lugar de "L-6 (52  $\mu$ moles)" de un modo similar al método para el Ejemplo 93, Figura 20A. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5at fue del 96 % de rendimiento,  $R_P:S_P = 97:3$ . Tiempo de retención: 12,5 min ((*S<sub>P</sub>*)-5at: 14,0 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 22A.

35 Este compuesto se obtuvo usando "D-6 (52  $\mu$ moles)" en lugar de "L-6 (52  $\mu$ moles)" de un modo similar al método para el Ejemplo 93, Figura 20B. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5at fue del 94 % ( $R_P:S_P = 95:5$ ). Tiempo de retención: 12,4 min ((*R<sub>P</sub>*)-5at: 14,0 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 22B.

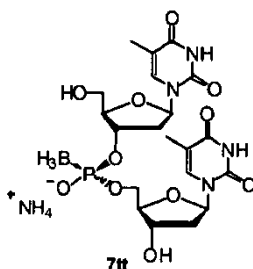
**Ejemplo 96:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiguanin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-5gt] mediante la Ruta B.

45 Este compuesto se obtuvo usando "*O<sup>6</sup>*-cianoetil-2-*N*-fenoxiacetil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiguanin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50  $\mu$ moles)" en lugar de "*N<sup>3</sup>*-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50  $\mu$ moles)" de un modo similar al Ejemplo 88. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-5gt fue del 95 % ( $R_P:S_P = 6:94$ ). Tiempo de retención: 11,5 min ((*R<sub>P</sub>*)-5gt: 10,3 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 23.

**Ejemplo 97:** Síntesis en fase sólida de un dímero de fosforotioato, 2'-desoxiguanin-3'-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-5gt] mediante la Ruta B.

50 Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (52  $\mu$ moles)" en lugar de "L-2 (52  $\mu$ moles)" de un modo similar al Ejemplo 96. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-5gt fue del 95 % ( $R_P:S_P = 94:6$ ). Tiempo de retención: 10,3 min ((*S<sub>P</sub>*)-5gt: 11,6 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 24.

**Ejemplo 98:** Síntesis en fase sólida de un dímero de boranofosfato, timidin-3'-il timidin-5'-il boranofosfato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-7tt] mediante la Ruta B

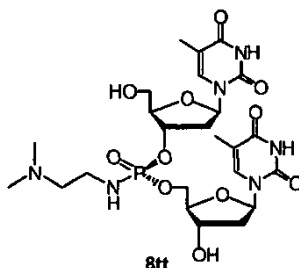


5 Se trató resina HCP cargada con *N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidina (16,4 mg; 30,5 μmol/g, 0,5 μmoles) mediante un conector de succinilo con 1 % de TFA / DCM (3 × 1 ml) para la eliminación del grupo 5'-*O*-DMTr, se lavó con DCM (3 × 1 ml) y MeCN seco (3 × 1 ml), y se secó a vacío. Se añadió solución de monómero pre-activado (200 μl, 50 μmoles; que consiste en *N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50 μmoles, para monoéster de *H*-fosfonato), MeCN-CMP (9:1, v/v, para disolvente), BTC (32 μmoles, para reactivo de condensación) y **D-6** (52 μmoles, para aminoalcohol)), seguido de la adición de CMPT 5 M / MeCN (50 μl, 250 μmoles). Agitándose durante 2 min, la solución de reacción se eliminó, y la resina se lavó con MeCN (3 × 1 ml), DCM (3 × 1 ml) y se secó a presión reducida (>5 min). El grupo 5'-*O*-DMTr y el auxiliar quiral se eliminaron simultáneamente mediante tratamiento con 1 % de TFA en DCM (3 × 1 ml), y la resina se lavó con DCM (3 × 1 ml) y MeCN seco (3 × 1 ml), y se secó a vacío. El producto intermedio resultante sobre la resina se boró mediante tratamiento con una mezcla de BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>-BSA-DMAc (1 ml, 1:1:8, v/v/v) durante 15 min, la resina se lavó entonces con DMAc (3 × 1 ml), MeCN (3 × 1 ml) y MeOH (3 × 1 ml). El dímero de boranofosfato sobre la resina se trató entonces con NH<sub>3</sub> 2 M / EtOH (2 ml) durante 12 h a temperatura ambiente para eliminar los grupos protectores de las nucleobases y también para liberar el dímero de la resina. La resina se eliminó por filtración y se lavó con MeOH. El filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en H<sub>2</sub>O (2 ml), se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 × 2 ml) y los lavados combinados se retro-extrajeron con H<sub>2</sub>O (2 ml). Las fases acuosas combinadas se concentraron a sequedad. El producto en bruto resultante se analizó por UPLC<sup>®</sup> de fase inversa con un gradiente lineal de 0-15 % de MeCN en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 15 min a 60 °C a una tasa de 0,5 ml/min. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-7tt se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el dímero TT natural (16800). El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-7tt fue del 89 % (*R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 4:96). Tiempo de retención: 9,6 min ((*R<sub>P</sub>*)-7tt: 9,8 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 25.

30 **Ejemplo 99:** Síntesis en fase sólida de un dímero de boranofosfato, timidin-3'-il timidin-5'-il boranofosfato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-7tt] mediante la Ruta B

Este compuesto se obtuvo usando "L-2 (52 μmoles)" en lugar de "D-2 (52 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 98. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-7tt se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el dímero TT natural (16800). El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-7tt fue del 90 % de rendimiento, *R<sub>P</sub>*:*S<sub>P</sub>* = 95:5. Tiempo de retención: 9,8 min ((*S<sub>P</sub>*)-7tt: 9,7 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 26.

40 **Ejemplo 100:** Síntesis en fase sólida de un dímero de *N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato, *N*-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato de (*S<sub>P</sub>*)-timidin-3'-il timidin-5'-ilo [(*S<sub>P</sub>*)-8tt] mediante la Ruta B



45 Se trató resina HCP cargada con *N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidina (16,4 mg; 30,5 μmol/g, 0,5 μmoles) mediante un conector de succinilo con 1 % de TFA / DCM (3 × 1 ml) para la eliminación del grupo 5'-*O*-DMTr, se lavó con DCM (3 × 1 ml) y MeCN seco (3 × 1 ml), y se secó a vacío. Se añadió solución de monómero pre-activado (200 μl, 50 μmoles; que consiste en *N*<sup>β</sup>-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (50 μmoles, para monoéster de *H*-fosfonato), MeCN-CMP (9:1, v/v, para disolvente), BTC (32 μmoles, para reactivo de condensación) y L-6 (52 μmoles, para aminoalcohol)), seguido de la adición de CMPT 5 M / MeCN (50 μl,

250  $\mu$ moles). Agitándose durante 2 min, la solución de reacción se eliminó, y la resina se lavó con MeCN ( $3 \times 1$  ml), DCM ( $3 \times 1$  ml) y se secó a presión reducida ( $>5$  min). El grupo 5'-O-DMTr y el auxiliar quiral se eliminaron simultáneamente mediante tratamiento con 1 % de TFA en DCM ( $3 \times 1$  ml), y la resina se lavó con DCM ( $3 \times 1$  ml) y MeCN seco ( $3 \times 1$  ml), y se secó a vacío. El producto intermedio resultante sobre la resina se amidó mediante tratamiento con una mezcla de  $\text{CCl}_4$ - $\text{Me}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  (1 ml, 1:9, v/v) durante 30 min, la resina se lavó entonces con DCM ( $3 \times 1$  ml). El dímero de fosforamidato sobre la resina se trató entonces con  $\text{NH}_3$  2 M / EtOH (2 ml) durante 12 h a temperatura ambiente para eliminar los grupos protectores de las nucleobases y también para liberar el dímero de la resina. La resina se eliminó por filtración y se lavó con MeOH. El filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en  $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml), se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $3 \times 2$  ml), y los lavados combinados se retro-extrajeron con  $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml). Las fases acuosas combinadas se concentraron a sequedad. El producto en bruto resultante se analizó por UPLC<sup>®</sup> de fase inversa con un gradiente lineal de 0-20 % de MeOH en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 15 min a 55 °C a una tasa de 0,4 ml/min. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**Sp**)-**8tt** se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el dímero TT natural (16800). El rendimiento de (**Sp**)-**8tt** fue del 90 % ( $R_P:S_P = 6:94$ ). Tiempo de retención: 10,3 min ((**Rp**)-**8tt**: 9,6 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 27.

**Ejemplo 101:** Síntesis en fase sólida de un dímero de N-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato, N-[(2-dimetilamino)etil]fosforamidato de (*R<sub>P</sub>*)-timidin-3'-il timidin-5'-ilo [(*R<sub>P</sub>*)-**8tt**] mediante la Ruta B

Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (52  $\mu$ moles)" en lugar de "L-2 (52  $\mu$ moles)" de un modo similar al Ejemplo 100. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de *H*-fosfonato convencional. El rendimiento de (**Rp**)-**8tt** se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el dímero TT natural (16800). El rendimiento de (**Rp**)-**8tt** fue del 86 % de rendimiento,  $R_P:S_P = 96:4$ . Tiempo de retención: 9,6 min ((**Sp**)-**8tt**: 10,3 min). El perfil de UPLC se muestra en la Figura 28.

**Ejemplo 102:** Síntesis en fase sólida de un tetrámero de fosforotioato, All-(*S<sub>P</sub>*)-[*T<sub>PS</sub>*]<sub>3</sub>T (fosforotioato) mediante la Ruta A

Se usó resina HCP cargada con 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidina (0,5  $\mu$ moles) mediante un conector de succinilo para la síntesis. Repitiendo las etapas en la Tabla 3 se realiza el alargamiento de cadena. Después del alargamiento de cadena, el grupo 5'-O-DMTr se eliminó mediante tratamiento con 3 % de DCA / DCM ( $3 \times 1$  ml) y se lavó con DCM ( $3 \times 1$  ml). El tetrámero de fosforotioato sobre la resina se trató entonces con 25 % de  $\text{NH}_3$  durante 12 h a 55 °C para eliminar los auxiliares quirales y los grupos protectores de las nucleobases y también para liberar el tetrámero de la resina. La resina se eliminó por filtración y se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$ . El filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en  $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml), se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $3 \times 2$  ml), y los lavados combinados se retro-extrajeron con  $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml). Las fases acuosas combinadas se concentraron a sequedad. El producto en bruto resultante se analizó por UPLC<sup>®</sup> de fase inversa con un gradiente lineal de 0-30 % de MeOH en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 30 min a 55 °C a una tasa de 0,4 ml/min. El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de fosforamidato convencional. El rendimiento del producto se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el tetrámero  $T_4$  natural (33000). El rendimiento del acoplamiento promedio fue del 96 %, la pureza óptica fue del 96 % (promedio: 99 %). Tiempo de retención: 23,0 min; EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para  $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_{23}\text{P}_3\text{S}_3$  [M-H]<sup>-</sup> 1201,15, hallado 1200,97. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 29.

Tabla 3.

etapa	operación	reactivos y disolventes	tiempo
1	destritilación	3 % de DCA/DCM	$3 \times 30$ s
2	lavado	(i) DCM (ii) MeCN seco (iii) secar a vacío.	-
3	acoplamiento	CMPT 5 M / MeCN (50 $\mu$ l, 250 $\mu$ moles) solución de monómero ( <i>R<sub>P</sub></i> ) o ( <i>S<sub>P</sub></i> ) pre-activado (200 $\mu$ l, 25 $\mu$ moles)*	5 min
4	lavado	(i) MeCN (ii) secar a vacío.	-
5	terminación	(i) $\text{CF}_3\text{COIm}$ 0,5 M / THF seco (ii) DMAN 1 M / THF seco	30 s
6	lavado	(i) MeCN seco (ii) secar a vacío.	-
7	sulfurización	DTD 0,3 M / MeCN	5 min
8	lavado	(i) MeCN (ii) DCM	-

\* Preparación de "solución de monómero (*R<sub>P</sub>*) o (*S<sub>P</sub>*) pre-activado"

Se secó  $\text{N}^3$ -benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25  $\mu$ moles) por coevaporaciones repetidas con piridina seca y tolueno seco, entonces se disolvió en MeCN seco-CMP (9:1, v/v). A la solución se añadió  $\text{Ph}_3\text{PCl}_2$  (62,5  $\mu$ moles) y se agitó durante 10 min. Entonces se añadió L-2 (30  $\mu$ moles; D-2 para solución "S<sub>P</sub>") y se agitó durante 10 min adicionales para dar una solución de monómero pre-activado.

55

**Ejemplo 103:** Síntesis en fase sólida de un tetrámero de fosfortioato, (S<sub>P</sub>, R<sub>P</sub>, S<sub>P</sub>)-[T<sub>PS</sub>]<sub>3</sub>T (fosfortioato) mediante la Ruta A

Este compuesto se obtuvo de un modo similar a All-(S<sub>P</sub>)-[T<sub>PS</sub>]<sub>3</sub>T en el Ejemplo 102. El rendimiento del producto se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el tetrámero T<sub>4</sub> natural (33000). El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de fosforamidito convencional. El rendimiento del acoplamiento promedio es del 96 %, la pureza óptica es del 94 % (promedio: 98 %). Tiempo de retención: 22,3 min; EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>23</sub>P<sub>3</sub>S<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup> 1201,15, hallado 1200,97. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 30.

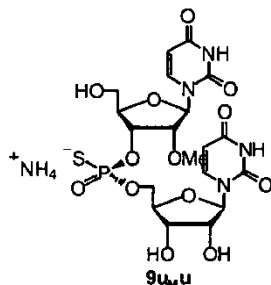
**Ejemplo 104:** Síntesis en fase sólida de un tetrámero de fosfortioato, (R<sub>P</sub>, S<sub>P</sub>, R<sub>P</sub>)-[T<sub>PS</sub>]<sub>3</sub>T (fosfortioato) mediante la Ruta A

Este compuesto se obtuvo de un modo similar a All-(S<sub>P</sub>)-[T<sub>PS</sub>]<sub>3</sub>T en el Ejemplo 102. El rendimiento del producto se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el tetrámero T<sub>4</sub> natural (33000). El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de fosforamidito convencional. El rendimiento del acoplamiento promedio es del 97 %, la pureza óptica es del 96 % (promedio: 99 %). Tiempo de retención: 21,7 min; EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>23</sub>P<sub>3</sub>S<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup> 1201,15, hallado 1200,96. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 31.

**Ejemplo 105:** Síntesis en fase sólida de un tetrámero de fosfortioato, All-(R<sub>P</sub>)-[T<sub>PS</sub>]<sub>3</sub>T (fosfortioato) mediante la Ruta A

Este compuesto se obtuvo de un modo similar a All-(S<sub>P</sub>)-[T<sub>PS</sub>]<sub>3</sub>T. El rendimiento del producto se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el tetrámero T<sub>4</sub> natural (33000). El producto fue idéntico al de una muestra de control sintetizada por el método de fosforamidito convencional. El rendimiento del acoplamiento promedio es del 95 %, la pureza óptica es del 92 % (promedio: 97 %). Tiempo de retención: 19,1 min; EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>23</sub>P<sub>3</sub>S<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup> 1201,15, hallado 1200,92. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 32.

**Ejemplo 106:** Síntesis en fase sólida de un tetrámero de fosfortioato de ARN, 2'-O-metiluridin-3'-il uridin-5'-ilfosfortioato de (S<sub>P</sub>)-amonio [(S<sub>P</sub>)-9<sub>umu</sub>] mediante la Ruta A



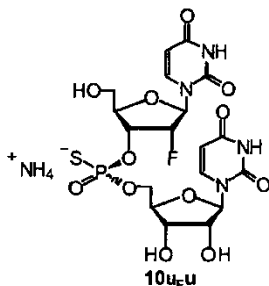
Se trató resina CPG cargada con 2'-O-acetil-N<sup>3</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)uridina (21,4 mg; 23,4 μmol/g, 0,5 μmoles) mediante un conector de succinilo con 3 % de DCA / DCM (3 × 1 ml), entonces se lavó con DCM (3 × 1 ml) y MeCN seco (3 × 1 ml). Después de secarse la resina a presión reducida (>5 min), se añadió solución de monómero pre-activado (250 μl, 25 μmoles; que consiste en N<sup>6</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-metiluridin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles, para monoéster de H-fosfonato), MeCN-piridina (9:1, v/v, para disolvente), Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub> (62,5 μmoles, para reactivo de condensación) y L-2 (30 μmoles, para aminoalcohol). Agitándose durante 5 min, la solución de reacción se eliminó, y la resina se lavó con MeCN (3 × 1 ml), se secó a presión reducida (>5 min). El producto intermedio resultante se sulfurizó mediante tratamiento con DTD 0,3 M / MeCN (500 μl, 150 μmoles) durante 5 min, entonces se lavó con MeCN (3 × 1 ml) y DCM (3 × 1 ml). El grupo 5'-O-DMTr se eliminó mediante tratamiento con 3 % de DCA / DCM (3 × 1 ml) y se lavó con DCM (3 × 1 ml). El dímero de fosfortioato sobre la resina se trató entonces con 25 % de NH<sub>3</sub> (1 ml) durante 12 h a 55 °C para eliminar el auxiliar quiral y los grupos protectores de las nucleobases y también para liberar el dímero de la resina. La resina se eliminó por filtración y se lavó con H<sub>2</sub>O. El filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en H<sub>2</sub>O (2 ml), se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 × 2 ml), y los lavados combinados se retro-extrajeron con H<sub>2</sub>O (2 ml). Las fases acuosas combinadas se concentraron a sequedad. El producto en bruto resultante se analizó por UPLC<sup>®</sup> de fase inversa con un gradiente lineal de 0-20 % de MeOH en tampón acetato de amonio 0,1 M (pH 7,0) durante 15 min a 55 °C a una tasa de 0,4 ml/min. El rendimiento de (S<sub>P</sub>)-9<sub>umu</sub> fue del 95 % (R<sub>P</sub>:S<sub>P</sub> = 2:98). Tiempo de retención: 10,2 min ((R<sub>P</sub>)-9<sub>umu</sub>: 9,3 min); EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>PS [M-H]<sup>-</sup> 579,08, hallado 578,92. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 33.



**Ejemplo 107:** Síntesis en fase sólida de un tetrámero de fosforotioato de ARN, 2'-O-metiluridin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-9u<sub>mu</sub>] mediante la Ruta A

5 Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (30 μmoles)" en lugar de "L-2 (30 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 106. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-9u<sub>mu</sub> fue del 94 % (Rp:Sp = 95:5). Tiempo de retención: 9,3 min ((*S<sub>P</sub>*)-9u<sub>mu</sub>: 10,3 min); EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>PS [M-H]<sup>-</sup> 579,08, hallado 578,97. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 34.

10 **Ejemplo 108:** Síntesis en fase sólida de un tetrámero de fosforotioato de ARN, 2'-desoxi-2'-fluorouridin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-10u<sub>Fu</sub>] mediante la Ruta A

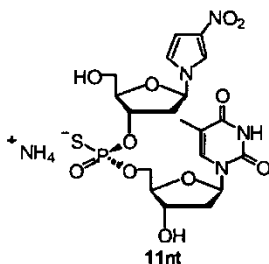


15 Este compuesto se obtuvo usando "N<sup>β</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxi-2'-fluorouridin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles)" en lugar de "N<sup>β</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-metiluridin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 106. El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-10u<sub>Fu</sub> fue del 93 % (Rp:Sp = 1:99). Tiempo de retención: 10,6 min ((*R<sub>P</sub>*)-10u<sub>Fu</sub>: 8,5 min); EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>12</sub>PS [M-H]<sup>-</sup> 567,06, hallado 566,96. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 35.

20 **Ejemplo 109:** Síntesis en fase sólida de un tetrámero de fosforotioato de ARN, 2'-desoxi-2'-fluorouridin-3'-il uridin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-10u<sub>Fu</sub>] mediante la Ruta A

25 Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (30 μmoles)" en lugar de "L-2 (30 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 108. El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-10u<sub>Fu</sub> fue del 92 % de rendimiento, Rp:Sp = 96:4. Tiempo de retención: 8,4 min ((*S<sub>P</sub>*)-10u<sub>Fu</sub>: 10,7 min); EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>12</sub>PS [M-H]<sup>-</sup> 567,06, hallado 566,97. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 36.

30 **Ejemplo 110:** Disolución-fase síntesis de nucleobase no natural, 1-(3-nitropirrol-1-il)-2-desoxiribofuranos-3-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*S<sub>P</sub>*)-amonio [(*S<sub>P</sub>*)-11nt] mediante la Ruta A



35 Este compuesto se obtuvo usando "5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1-(3-nitropirrol-1-il)-2-desoxiribofuranos-3-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles)" en lugar de "N<sup>β</sup>-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-ilfosfonato de 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio (25 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 78. El rendimiento del producto se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el dímero CT natural (15200). El rendimiento de (*S<sub>P</sub>*)-11nt fue rendimiento del 98 %. Tiempo de retención: 16,3 min. (*R<sub>P</sub>*)-11nt no pudo resolverse; EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>PS [M-H]<sup>-</sup> 547,09, hallado 547,02. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 37.

40 **Ejemplo 111:** Síntesis en fase de solución de nucleobase no natural, 1-(3-nitropirrol-1-il)-2-desoxiribofuranos-3-il timidin-5'-ilfosforotioato de (*R<sub>P</sub>*)-amonio [(*R<sub>P</sub>*)-11nt] mediante la Ruta A

45 Este compuesto se obtuvo usando "D-2 (30 μmoles)" en lugar de "L-2 (30 μmoles)" de un modo similar al Ejemplo 110. El rendimiento del producto se determinó por una medición de absorbancia de UV a 260 nm con el coeficiente de extinción molar de un valor aproximado para el dímero CT natural (15200). El rendimiento de (*R<sub>P</sub>*)-11nt fue del 97 % de rendimiento. Tiempo de retención: 16,1 min. (*S<sub>P</sub>*)-11nt no pudo resolverse; EM (EM-MALDI TOF) *m/z* Calcd para C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>PS [M-H]<sup>-</sup> 547,09, hallado 547,01. El perfil de UPLC se muestra en la Figura 38.

Aunque se han mostrado y descrito realizaciones preferidas de la presente invención en el presente documento, será obvio para aquellos expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solo. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que así se cubran métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones.

5

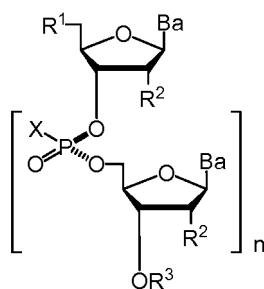
## REIVINDICACIONES

1. Un método para una síntesis de un ácido nucleico que comprende un resto de fosfonato quiral, comprendiendo el método:

hacer reaccionar un nucleósido que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral, un reactivo quiral y un nucleósido que comprende un resto 5'-OH, para formar un producto intermedio de oligonucleótido; y convertir el producto intermedio de oligonucleótido en el ácido nucleico que comprende un resto de fosfonato quiral;

en el que:

el ácido nucleico que comprende un resto de fosfonato quiral es un compuesto de fórmula 1:



Fórmula 1

en la que:

R<sup>1</sup> es -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquiniilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alqueniil-Y<sup>1</sup>-, alquiniil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>;

Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se;

R<sup>a</sup> es un resto de bloqueo;

R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo;

cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquiniilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>);

cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, alquenoilo, alquiniilo, alquil-Y<sup>2</sup>-, alqueniil-Y<sup>2</sup>-, alquiniil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-, o un catión que es Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>;

Y<sup>2</sup> es O, S o NR<sup>d</sup>; en donde cada caso de R<sup>d</sup> en Y<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquiniilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato;

cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alquenoilo, alquiniilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alqueniil-Y<sup>1</sup>-, alquiniil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en donde R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo;

cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada;

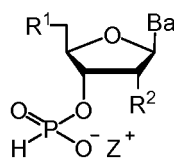
cada caso de X es independientemente alquilo, alcoxi, arilo, alquiltio, acilo, -NR<sup>f</sup>R<sup>f</sup>, alqueniilo, alquiniilo, alqueniiltio, alquiniiltio, -S-Z<sup>+</sup>, -Se-Z<sup>+</sup> o -BH<sub>3</sub>Z<sup>+</sup>;

cada caso de R<sup>f</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquiniilo o arilo;

Z<sup>+</sup> es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o Z<sup>+</sup> es un ión metálico monovalente;

R<sup>3</sup> es hidrógeno, un grupo de bloqueo, un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico; y n es un número entero de 1 a 200; y en donde cada resto estereogénico del compuesto de fórmula 1 tiene opcionalmente más del 98 % de pureza diaestereomérica como se ha determinado por espectroscopía de RMN <sup>31</sup>P o HPLC de fase inversa;

el nucleósido que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral es un compuesto de fórmula 2:



Fórmula 2

en la que:

R<sup>1</sup> es -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>;

Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se;

R<sup>3</sup> es un resto de bloqueo;

R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo;

cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>);

cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>2</sup>-, alquenil-Y<sup>2</sup>-, alquinil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-;

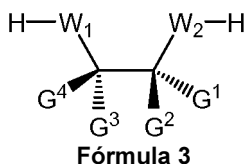
Y<sup>2</sup> es O, S o NR<sup>d</sup>; en donde cada caso de R<sup>d</sup> en Y<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato;

R<sup>2</sup> es hidrógeno, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>; en donde R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo; y

Ba es una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada; y

Z<sup>+</sup> es ión amonio, ión alquilamonio, ión imino heteroaromático o ión imino heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o un ión metálico monovalente;

el reactivo quirál es un compuesto de fórmula 3:



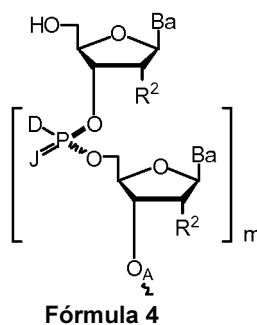
en la que:

W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son independientemente -NG<sup>5</sup>-, -O- o -S-;

G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heteroarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente G<sup>6</sup>, en donde dos G<sup>6</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene un heteroátomo de hasta 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y

en donde no más de cuatro de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup>;

el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un compuesto de fórmula 4:



en la que:

cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenil-Y<sup>1</sup>-, alquinil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en donde R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo;

Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se;

R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo;

cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>);

cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil-Y<sup>2</sup>-, alquenil-Y<sup>2</sup>-, alquinil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-;

Y<sup>2</sup> es O, S o NR<sup>d</sup>; en donde cada caso de R<sup>d</sup> en Y<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato;

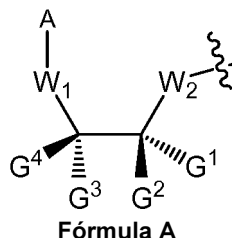
cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada;

m es un número entero de 0 a n-1;

n es un número entero de 1 a 200;

O<sub>A</sub> está conectado a un resto de tritilo, un resto de sililo, un resto de acetilo, un resto de acilo, un resto de arilacilo, un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico; J es O y D es H, o J es S, Se o BH<sub>3</sub> y D es un ligando quirál o un resto de fórmula A:

5



en la que:

10

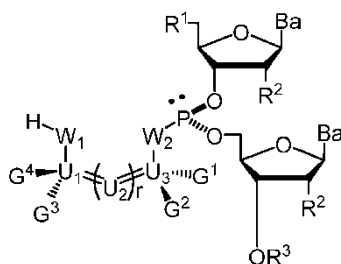
W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son independientemente NHG<sup>5</sup>, OH o SH;

A es hidrógeno, resto de acilo, arilo, alquilo, aralquilo o sililo; y

15

en la que G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heteroarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente G<sup>6</sup>, en donde dos G<sup>6</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene un heteroátomo de hasta 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en donde no más de cuatro de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup>; y el producto intermedio de oligonucleótido tiene la estructura de:

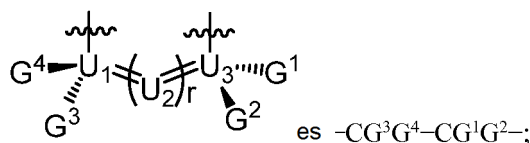
20



en la que:

25

W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son independientemente NHG<sup>5</sup>, OH o SH;



30

G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heteroarilo o arilo, o dos de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son independientemente G<sup>6</sup>, en donde dos G<sup>6</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene un heteroátomo de hasta 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en donde no más de cuatro de G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup> y G<sup>5</sup> son G<sup>6</sup>;

35

R<sup>1</sup> es -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenoil-Y<sup>1</sup>-, alquinoil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub>, -HP(O)(R<sup>e</sup>), -OR<sup>a</sup> o -SR<sup>c</sup>;

Y<sup>1</sup> es O, NR<sup>d</sup>, S o Se;

R<sup>3</sup> es un resto de bloqueo;

R<sup>c</sup> es un grupo de bloqueo;

40

cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato, -P(O)(R<sup>e</sup>)<sub>2</sub> o -HP(O)(R<sup>e</sup>);

cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>2</sup>-, alquenoil-Y<sup>2</sup>-, alquinoil-Y<sup>2</sup>-, aril-Y<sup>2</sup>- o heteroaril-Y<sup>2</sup>-;

Y<sup>2</sup> es O, S o NR<sup>d</sup>; en donde cada caso de R<sup>d</sup> en Y<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato;

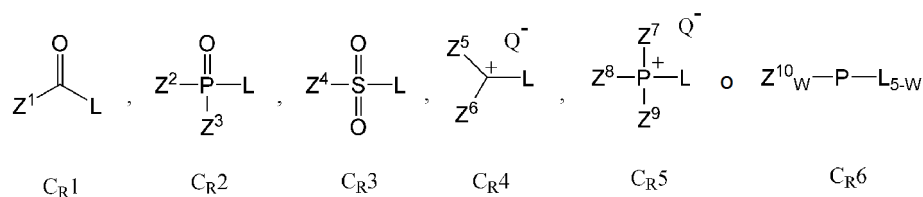
45

cada caso de R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, -OH, -SH, -NR<sup>d</sup>, -N<sub>3</sub>, halógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquil-Y<sup>1</sup>-, alquenoil-Y<sup>1</sup>-, alquinoil-Y<sup>1</sup>-, aril-Y<sup>1</sup>-, heteroaril-Y<sup>1</sup>-, -OR<sup>b</sup> o -SR<sup>c</sup>, en donde R<sup>b</sup> es un resto de bloqueo;

cada caso de Ba es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada; y  
 $R^3$  es hidrógeno, un grupo de bloqueo, un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico.

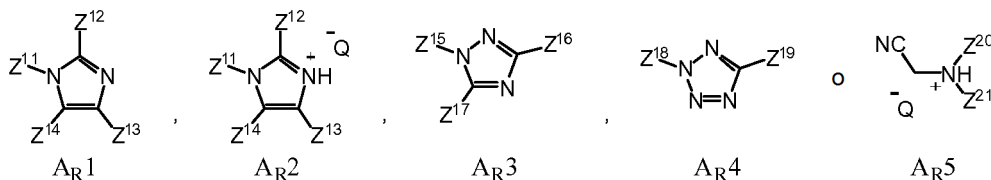
5 2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de hacer reaccionar el nucleósido que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral y un reactivo quiral y el nucleósido que comprende un resto 5'-OH para formar un producto intermedio de oligonucleótido es una reacción de una sola etapa.

10 3. El método de la reivindicación 1, que comprende además proporcionar un reactivo de condensación  $C_R$  por el cual el nucleósido que comprende un resto de *H*-fosfonato aquiral se activa para reaccionar con el reactivo quiral para formar un producto intermedio quiral, y opcionalmente que comprende además proporcionar un reactivo de activación  $A_R$ , en el que  $C_R$  tiene una de las siguientes fórmulas generales:  $Ar_3PL_2$  y  $(ArO)_3PL_2$ .



15 en las que  $Z^1, Z^2, Z^3, Z^4, Z^5, Z^6, Z^7, Z^8, Z^9$  y  $Z^{10}$  están seleccionados independientemente de alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi o heteroariloxi,  
 20 o en las que cualquiera de  $Z^2$  y  $Z^3, Z^5$  y  $Z^6, Z^7$  y  $Z^8, Z^8$  y  $Z^9, Z^9$  y  $Z^7$  y  $Z^8$  y  $Z^9$  se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 20 miembros;  
 $Q^-$  es un contraión;  
 $w$  es un número entero de 0 a 3;  
 $L$  es un grupo saliente; y  
 25 en las que  $Ar$  es arilo o heteroarilo, y opcionalmente está unido al soporte de polímero;

en el que  $A_R$  tiene una de las siguientes fórmulas generales:



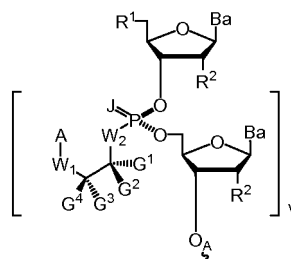
30  $Z^{11}, Z^{12}, Z^{13}, Z^{14}, Z^{15}, Z^{16}, Z^{17}, Z^{18}, Z^{19}, Z^{20}$  y  $Z^{21}$  son independientemente hidrógeno, alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi o heteroariloxi,  
 35 o en donde cualquiera de  $Z^{11}$  y  $Z^{12}, Z^{11}$  y  $Z^{13}, Z^{11}$  y  $Z^{14}, Z^{12}$  y  $Z^{13}, Z^{12}$  y  $Z^{14}, Z^{13}$  y  $Z^{14}, Z^{15}$  y  $Z^{16}, Z^{15}$  y  $Z^{17}, Z^{16}$  y  $Z^{17}, Z^{18}$  y  $Z^{19}$  o  $Z^{20}$  y  $Z^{21}$  se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 20 miembros, o para formar un anillo aromático de 5 o 20 miembros;  
 y  $Q^-$  es un contraión.

4. El método de la reivindicación 1, en el que la reacción se realiza en un disolvente orgánico aprótico.

40 5. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de convertir el producto intermedio de oligonucleótido en un compuesto de fórmula 1 comprende:

terminación del producto intermedio de oligonucleótido y modificación del producto intermedio de oligonucleótido terminado para producir un compuesto de fórmula 5:

45



Fórmula 5

en la que:

- 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30
- $R^1$  es  $-NR^dR^d$ ,  $-N_3$ , halógeno, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$ -,  $-P(O)(R^e)_2$ ,  $-HP(O)(R^e)$ ,  $-OR^a$  o  $-SR^c$ ;  
 $Y^1$  es O,  $NR^d$ , S o Se;  
 $R^a$  es un resto de bloqueo;  
 $R^c$  es un grupo de bloqueo;  
 cada caso de  $R^d$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato,  $-P(O)(R^e)_2$  o  $-HP(O)(R^e)$ ;  
 cada caso de  $R^e$  es independientemente alquilo, arilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^2$ -, alquenil- $Y^2$ -, alquinil- $Y^2$ -, aril- $Y^2$ - o heteroaril- $Y^2$ -,  
 $Y^2$  es O, S o  $NR^d$ ; en donde cada caso de  $R^d$  en  $Y^2$  es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido, carbamato;  
 cada caso de  $R^2$  es independientemente hidrógeno,  $-NR^dR^d$ ,  $-N_3$ , halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$ -,  $-OR^b$  o  $SR^c$ , en donde  $R^b$  es un resto de bloqueo;  
 cada caso de  $Ba$  es independientemente una adenina bloqueada o no bloqueada, citosina, guanina, timina, uracilo o nucleobase modificada;  
 cada caso de  $J$  es S, Se o  $BH_3$ ;  
 $v$  es un número entero de 2 a  $n-1$ ;  
 $O_A$  está conectado a un resto de enlace conectado a un soporte sólido o un resto de enlace conectado a un ácido nucleico;  
 $A$  es un resto de acilo, arilo, alquilo, aralquilo o sililo; y  
 $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son independientemente hidrógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocíclico, heteroarilo o arilo, o dos de  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son independientemente  $G^6$ , en donde dos  $G^6$  se toman conjuntamente para formar un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o insaturado, o que contiene heteroátomo de hasta aproximadamente 20 átomos de anillo que es monocíclico o policíclico, condensado o no condensado, y en donde no más de cuatro de  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$  son  $G^6$ .

6. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de convertir el producto intermedio de oligonucleótido en un compuesto de fórmula 1 comprende acidificar el producto intermedio de oligonucleótido para producir un compuesto de fórmula 4, en donde  $m$  es al menos uno,  $J$  es O y  $D$  es H.

7. El método de la reivindicación 6, que comprende además la etapa de modificar el compuesto de fórmula 4 para introducir un resto  $X$  produciendo así un compuesto de fórmula 1 en donde  $R^3$  es un grupo de bloqueo o un resto de enlace conectado a un soporte sólido.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de modificación se realiza usando un agente de boración, un electrófilo de azufre o un electrófilo de selenio.

9. El método de la reivindicación 7, en el que la etapa de modificación se realiza:

- (i) usando un reactivo de siliación seguido de un electrófilo de azufre, un electrófilo de selenio, un agente de boración, un agente alquilante, un aldehído o un agente acilante, o  
 (ii) haciendo reaccionar con un reactivo de halogenación seguido de hacer reaccionar con un nucleófilo.

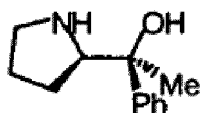
10. El método de la reivindicación 5, en el que  $R^a$  es tritilo sustituido o sin sustituir o sililo sustituido; o en el que:

- (i)  $R^b$  es tritilo sustituido o sin sustituir, sililo sustituido, acetilo, acilo o éter metílico sustituido,  
 (ii) el grupo de bloqueo del resto  $Ba$  es un resto de bencilo, acilo, formilo, dialquilformamidinilo, isobutirilo, fenoxiacetilo o tritilo, cualquiera de los cuales puede estar sin sustituir o sustituido, o  
 (iii)  $R^2$  es  $-NR^dR^d$ , alquilo, alquenilo, alquinilo, alquil- $Y^1$ -, alquenil- $Y^1$ -, alquinil- $Y^1$ -, aril- $Y^1$ -, heteroaril- $Y^1$  y está sustituido con restos fluorescentes o de unión a biomolécula; o en donde:  
 (i)  $R^3$  es un grupo de bloqueo que es tritilo sustituido, acilo, sililo sustituido o bencilo sustituido, o  
 (ii)  $X$  es alquilo, alcoxi,  $-NR^fR^f$ ,  $-S-Z^+$  o  $-BH_3-Z^+$ ; o en donde:

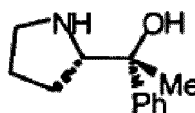
(i) R<sup>1</sup> es -N<sub>3</sub>, -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup>, alquiloxi u -OH, o

(ii) Z es ión piridinio, ión trietilamonio, ión N,N-diisopropiletilamonio, ión 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enio, ión sodio o ión potasio.

- 5 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R<sup>1</sup> es -OH o -OR<sup>a</sup>.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada caso de R<sup>d</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, sililo sustituido o carbamato.
- 10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada caso de R<sup>e</sup> es independientemente alquilo, arilo, alquenilo o alquinilo.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Y<sup>2</sup> es O o S.
- 15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada caso de X es independientemente alquiltio, alqueniltio, alquiniltio o -S-Z<sup>+</sup>.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que n es un número entero de 10 a 100.
- 20 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que n es un número entero de 15 a 25.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que W<sub>1</sub> es NHG<sup>5</sup> y W<sub>2</sub> es O y en el que el reactivo quiral es el compuesto de fórmula 3.
- 25 19. El método de la reivindicación 1, en el que el reactivo quiral es la fórmula Q o la fórmula R:

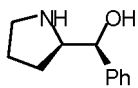


Fórmula Q

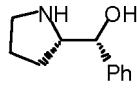


Fórmula R

20. El método de la reivindicación 1, en el que el reactivo quiral es la fórmula O o la fórmula P:



Fórmula O

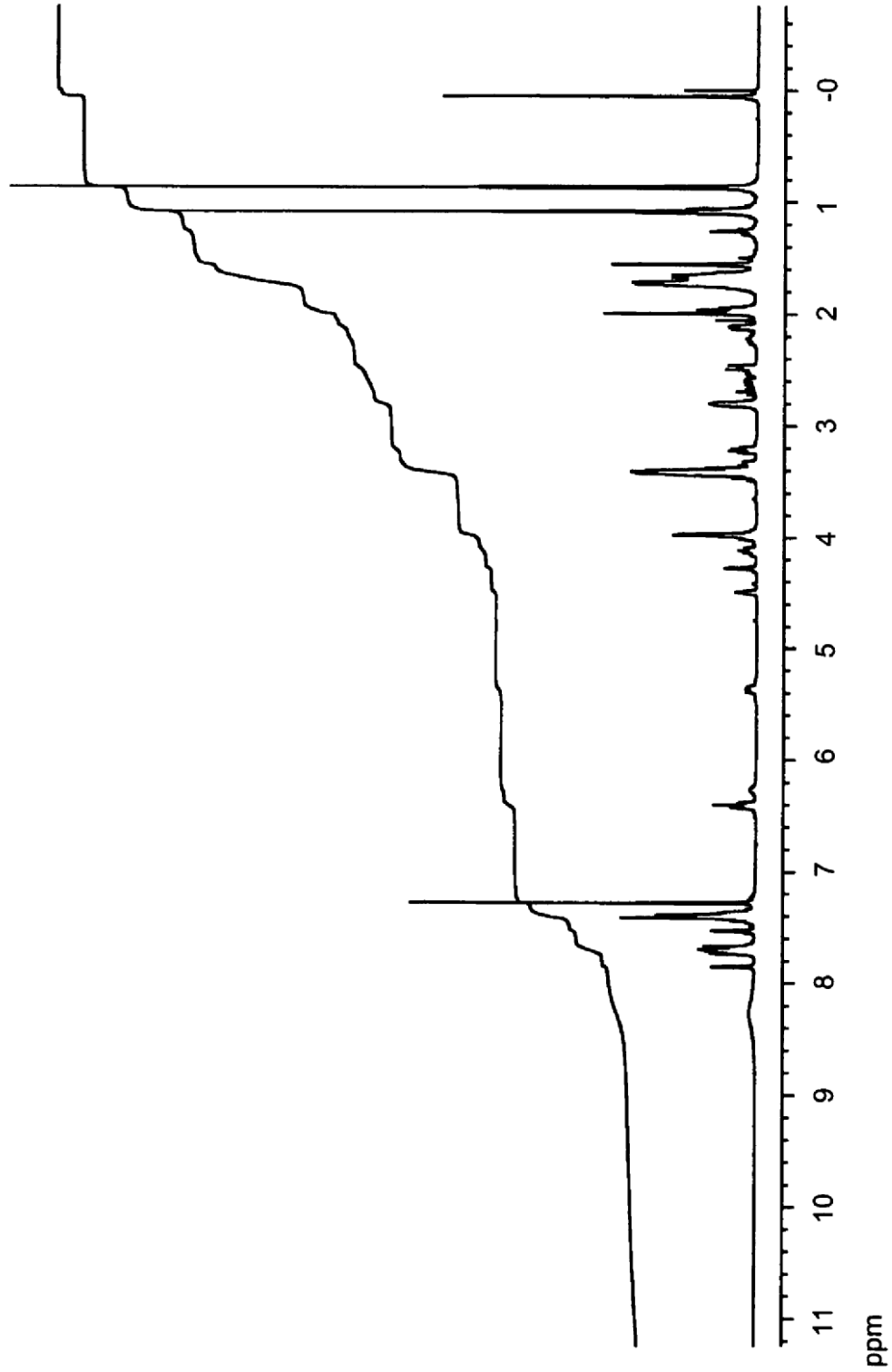


Fórmula P

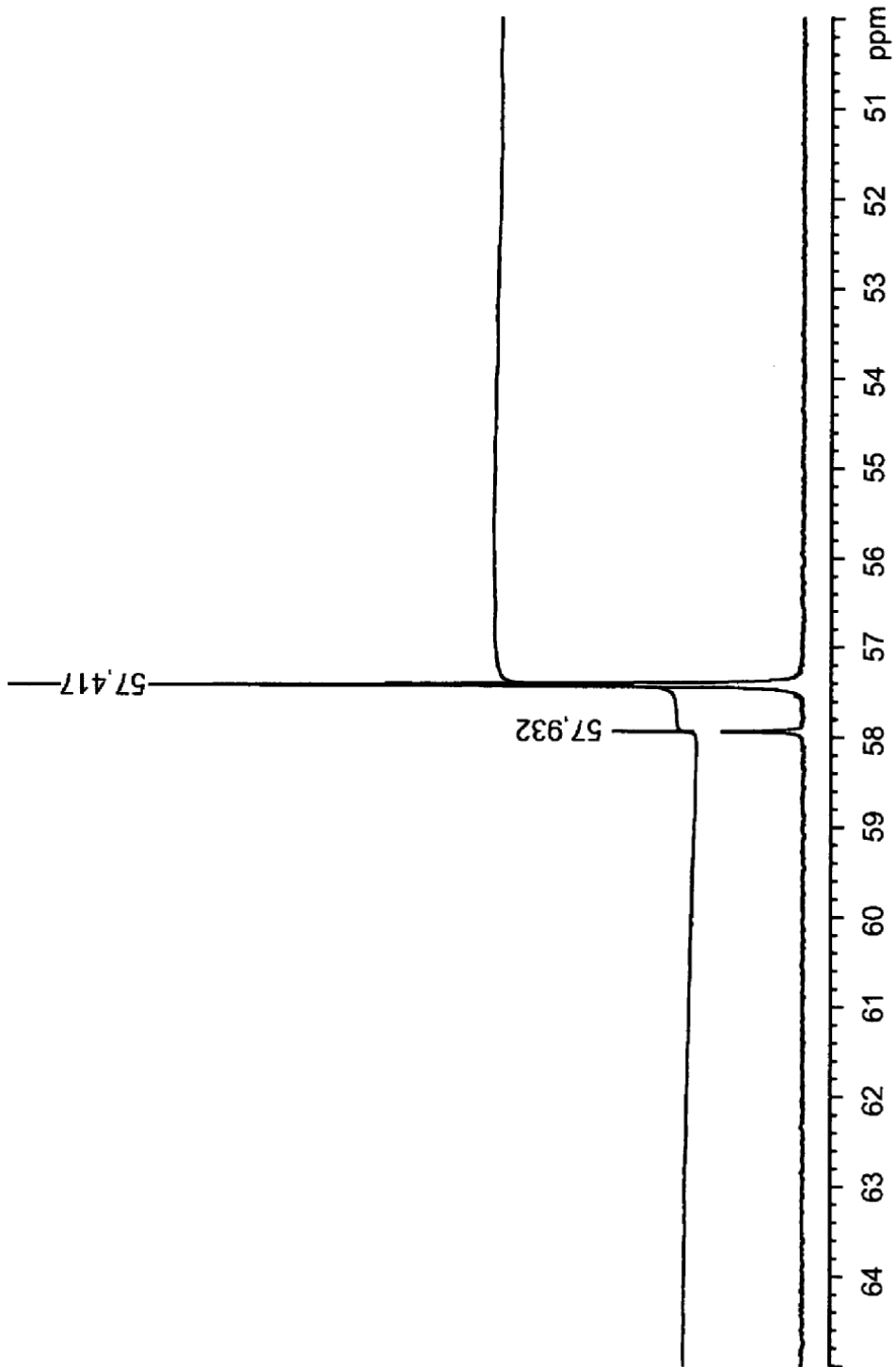
30



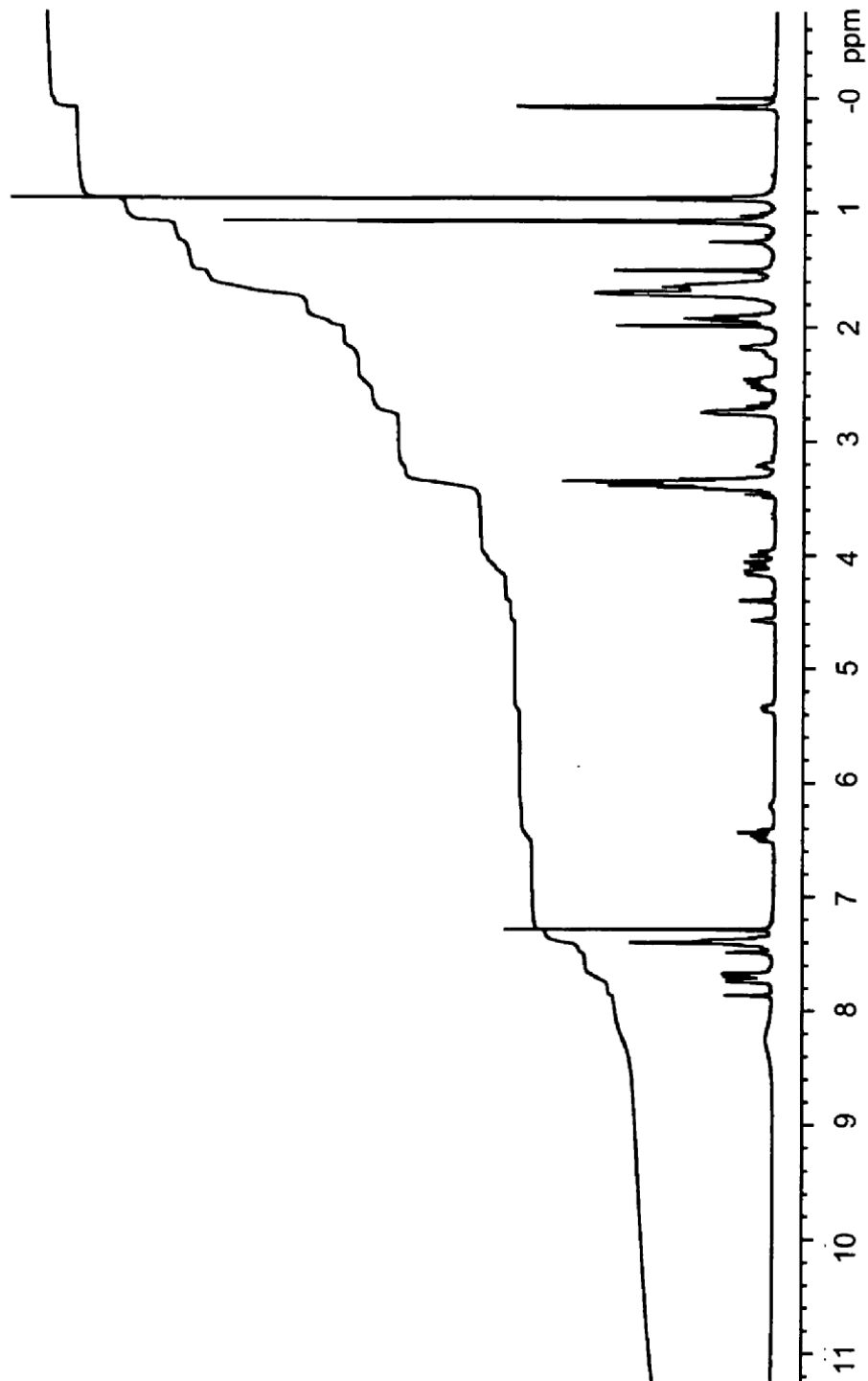
**FIGURA 1**  
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de (*S<sub>P</sub>*)-4tt ( $\text{CDCl}_3$ )



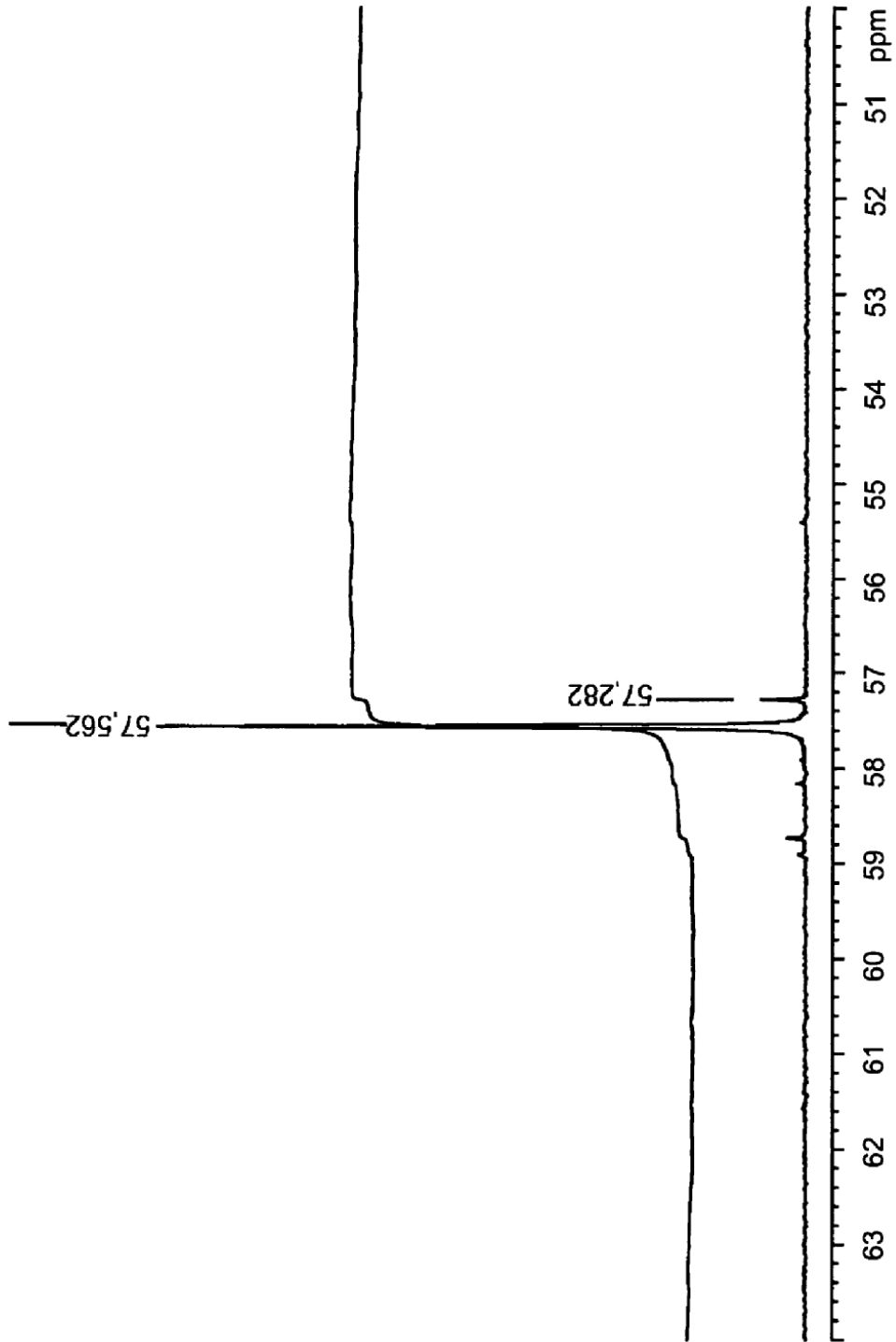
**FIGURA 2**  
Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  de (S<sub>P</sub>)-4tt (CDCl<sub>3</sub>)



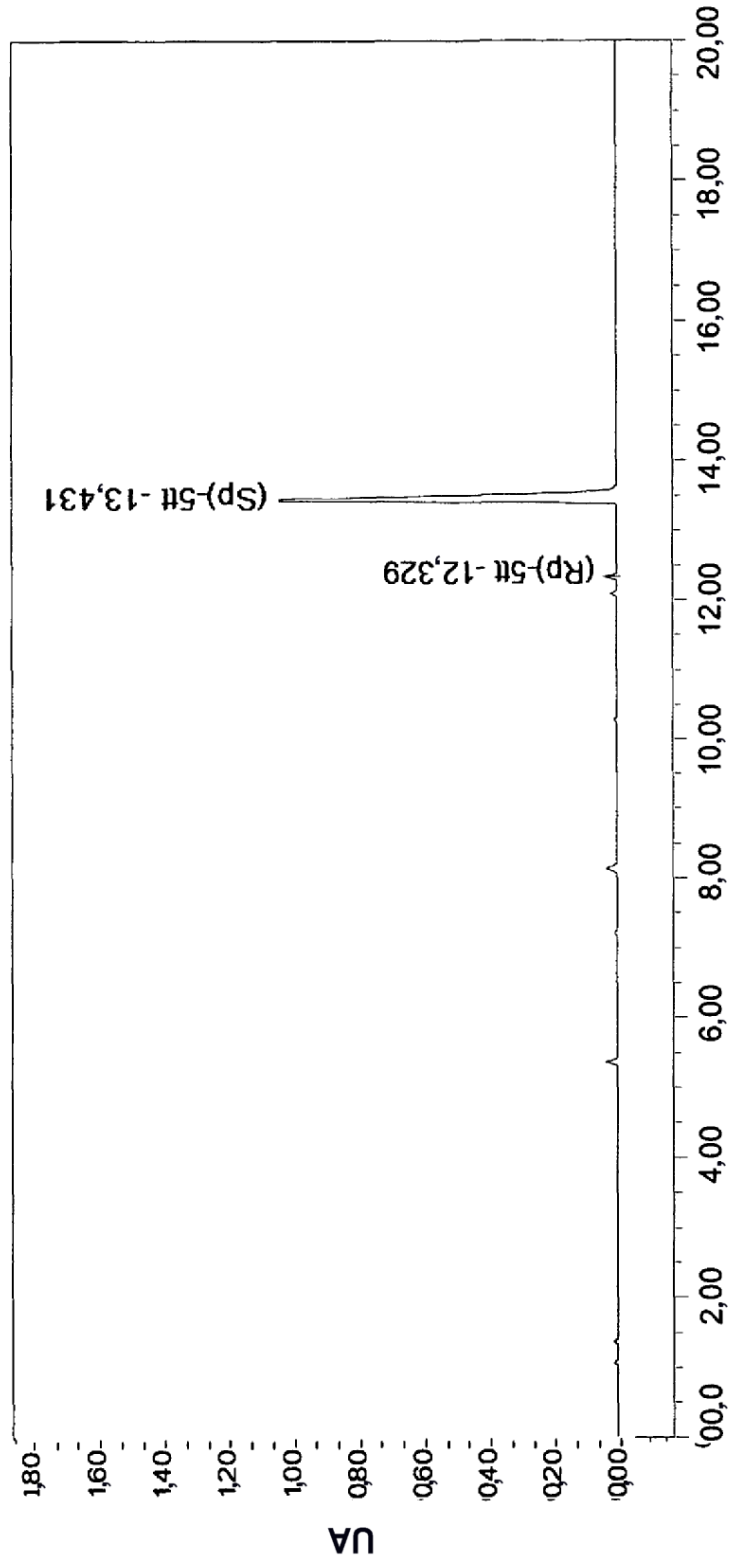
**FIGURA 3**  
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de (*R<sub>P</sub>*)-4tt ( $\text{CDCl}_3$ )



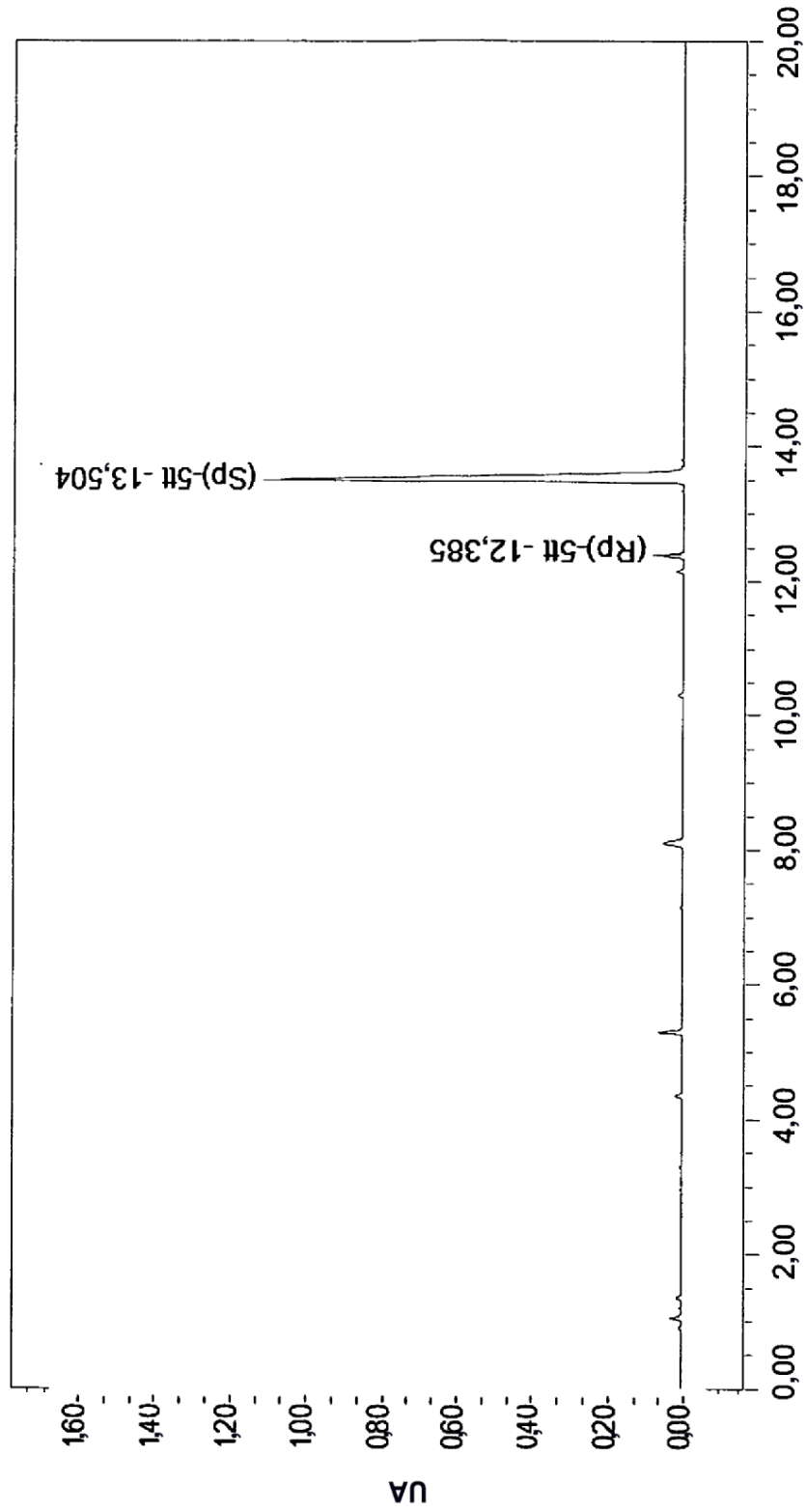
**FIGURA 4**  
Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  de (*R<sub>P</sub>*)-4tt ( $\text{CDCl}_3$ )



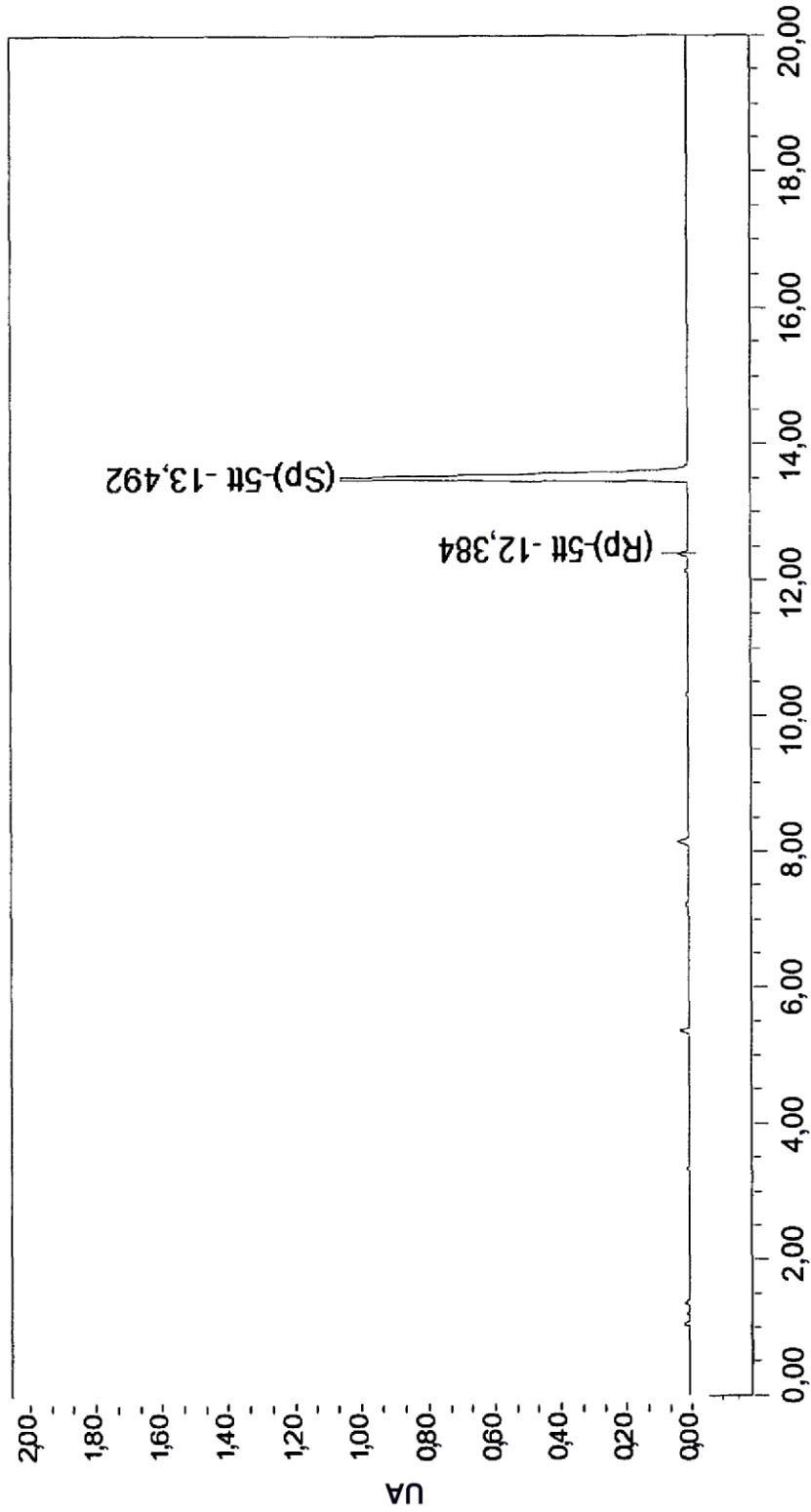
**FIGURA 5A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5tt



**FIGURA 5B**  
Perfil de UPLC® en bruto de (S<sub>P</sub>)-5tt usando BTC en lugar de Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>

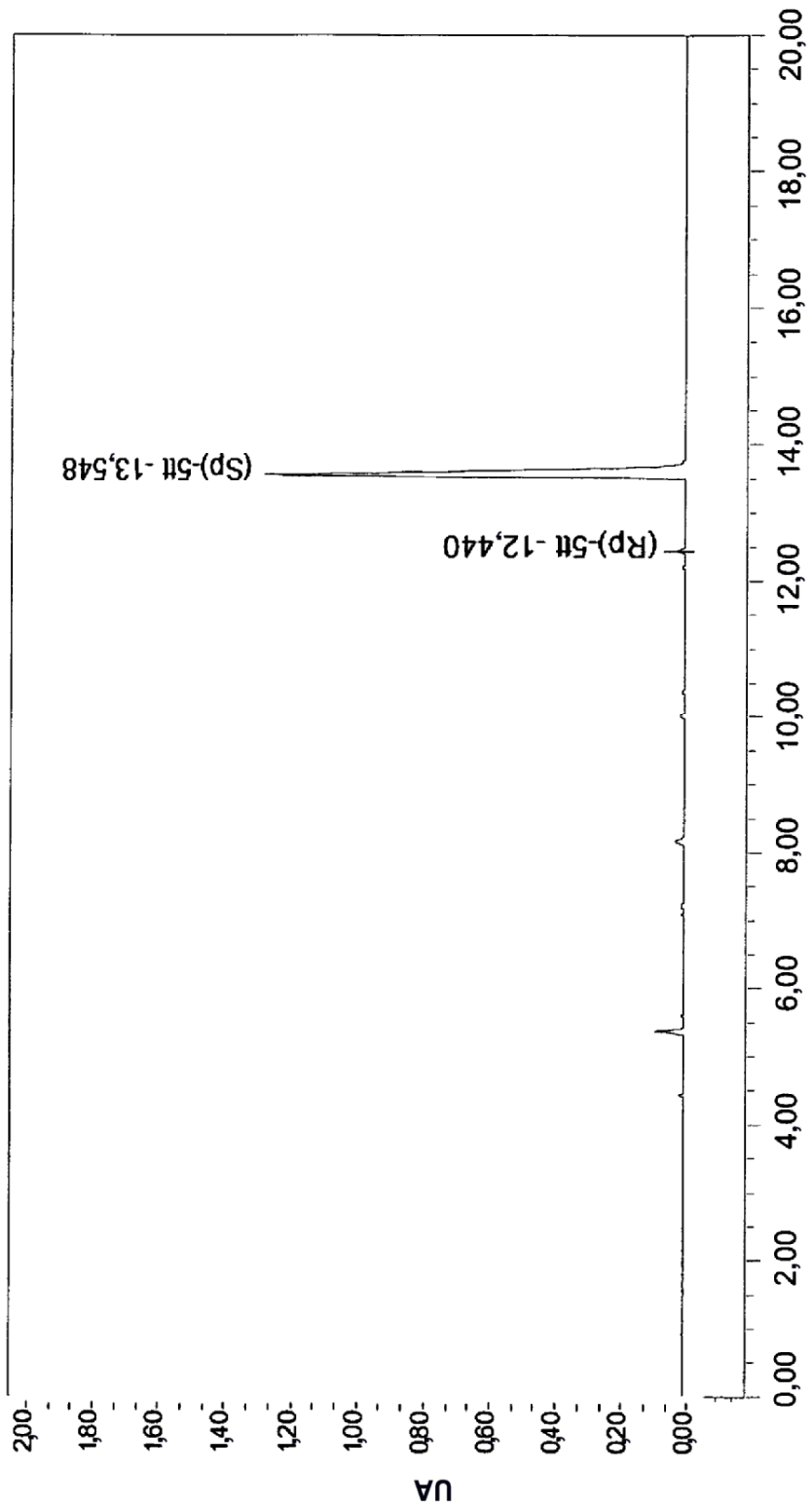


**FIGURA 6A.**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5tt



**FIGURA 6B**

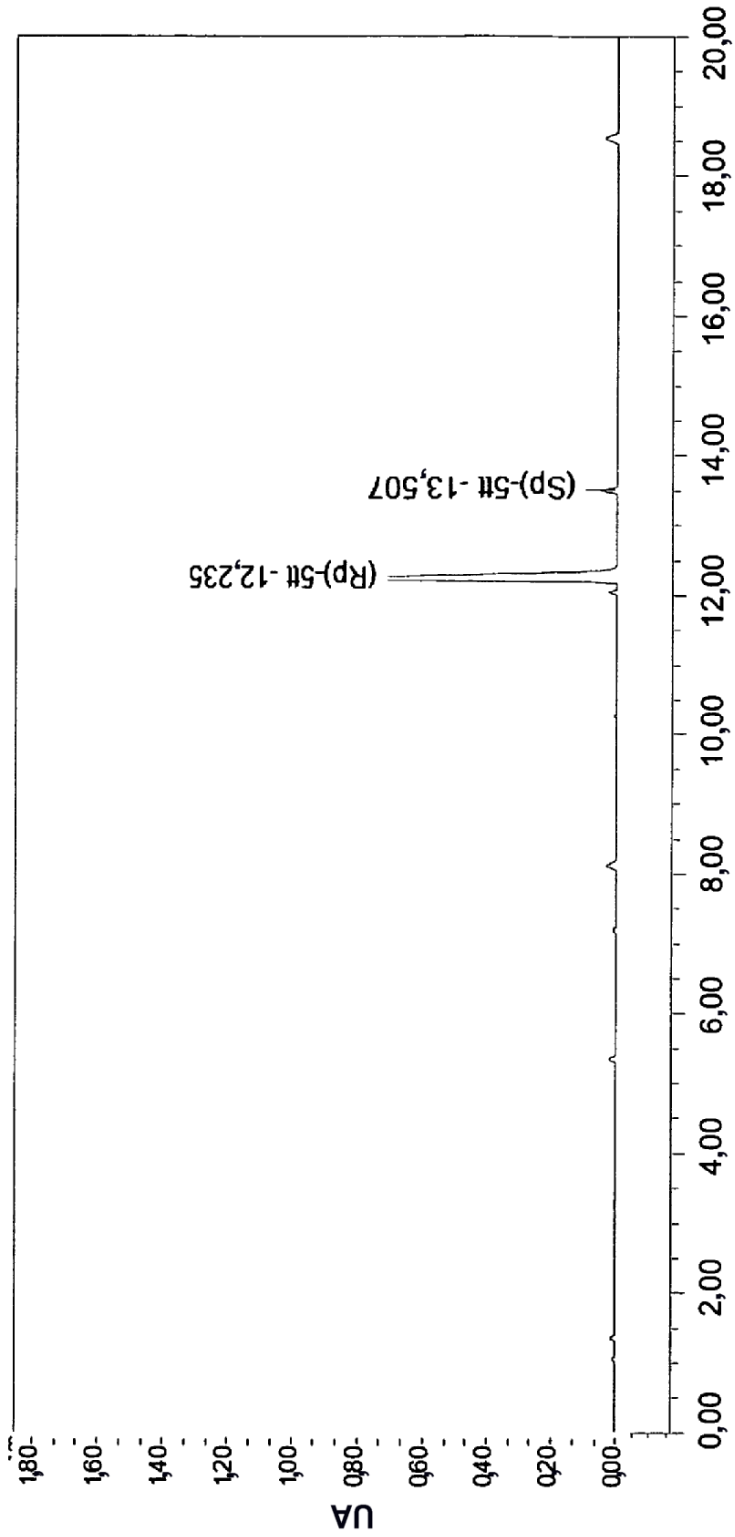
Perfil de UPLC® en bruto de (S<sub>P</sub>)-5tt usando BTC en lugar de Ph<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>



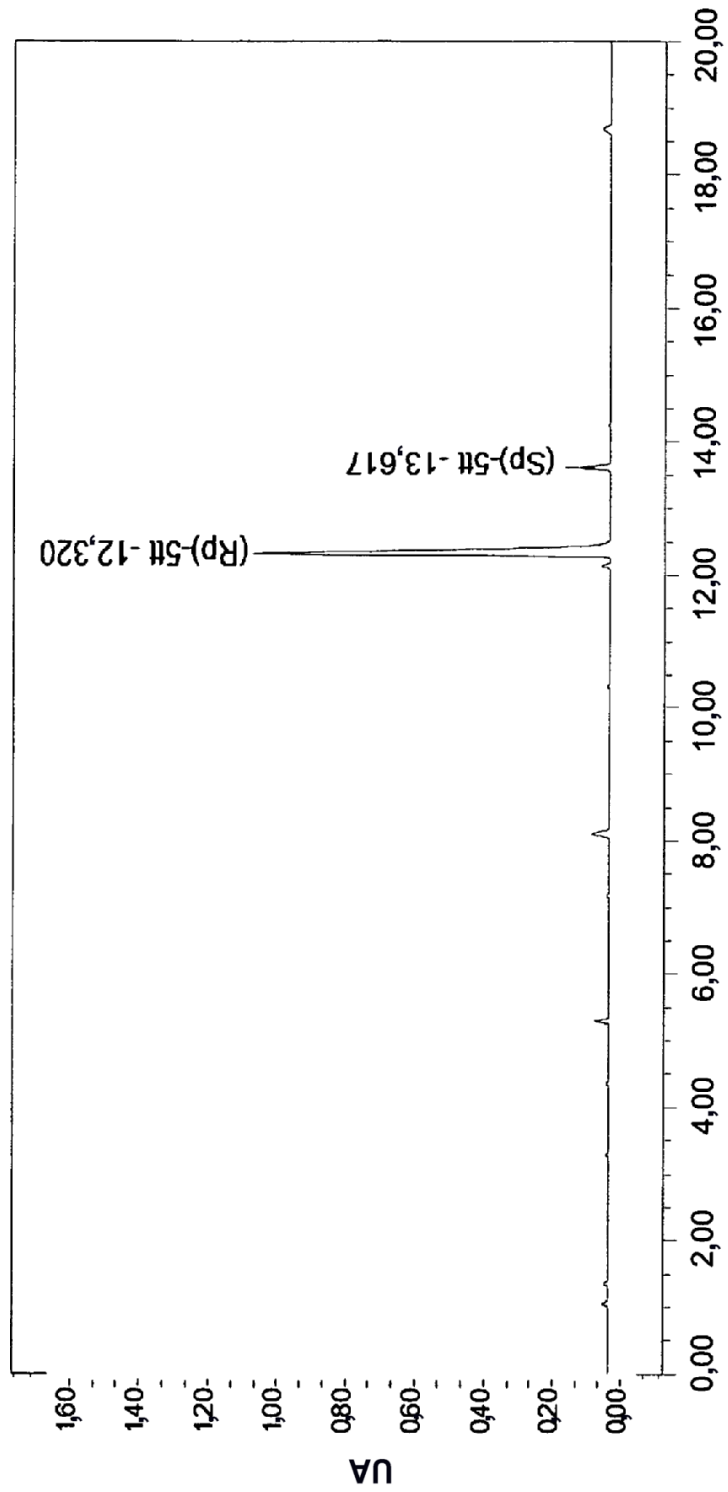


**FIGURA 7A**

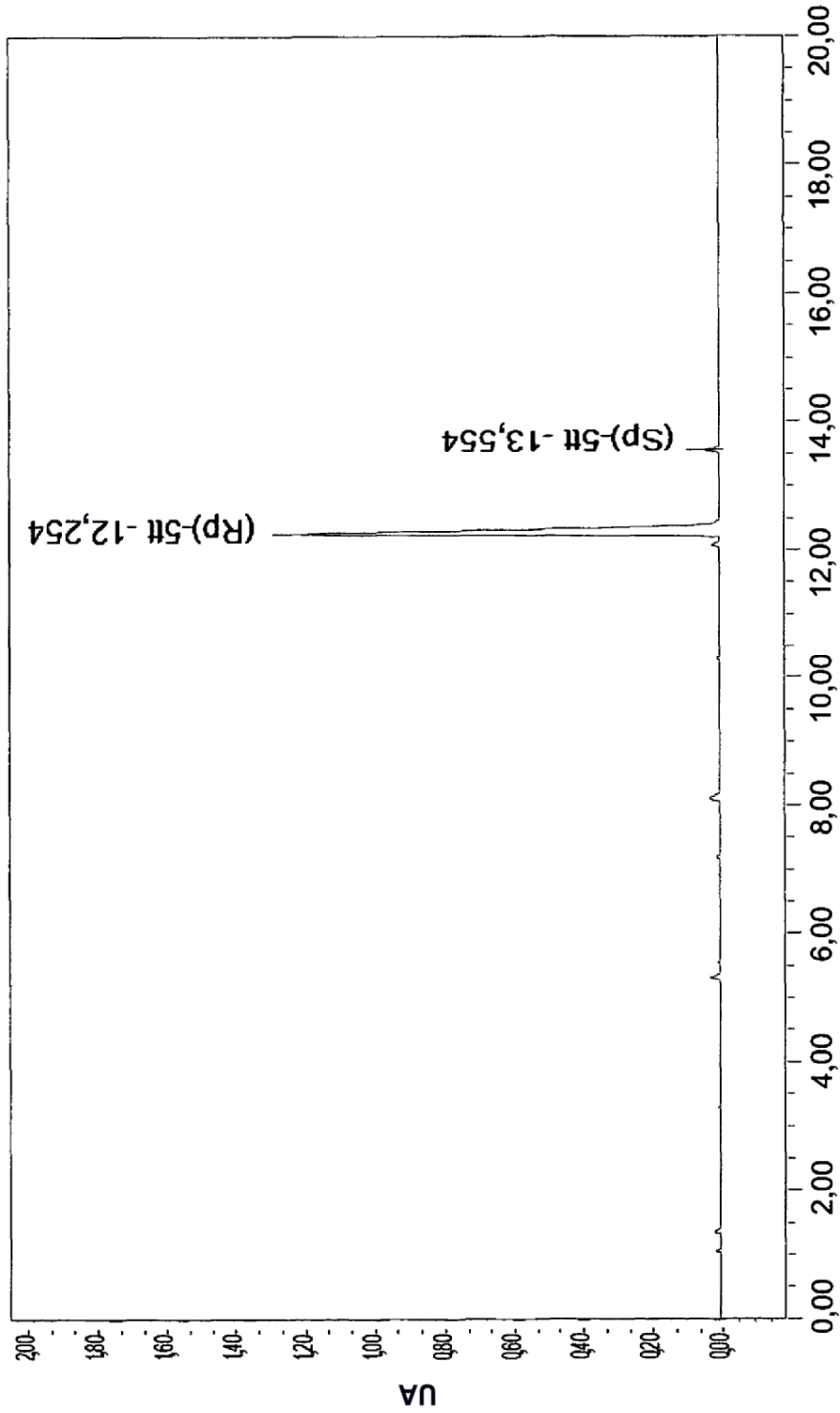
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5tt



**FIGURA 7B**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5tt



**FIGURA 8**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5tt



**FIGURA 9A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5ct

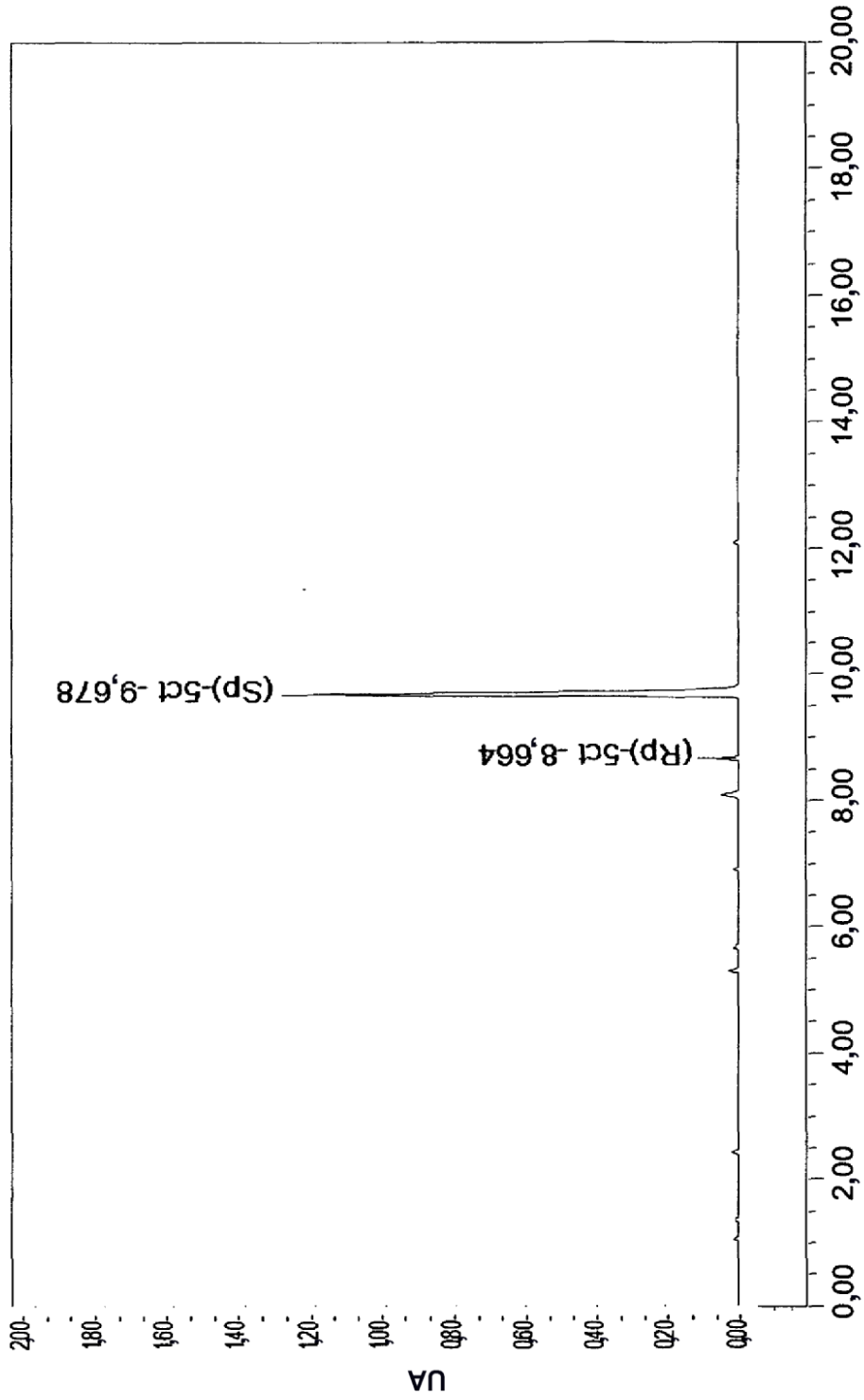


FIGURA 9B

Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5ct

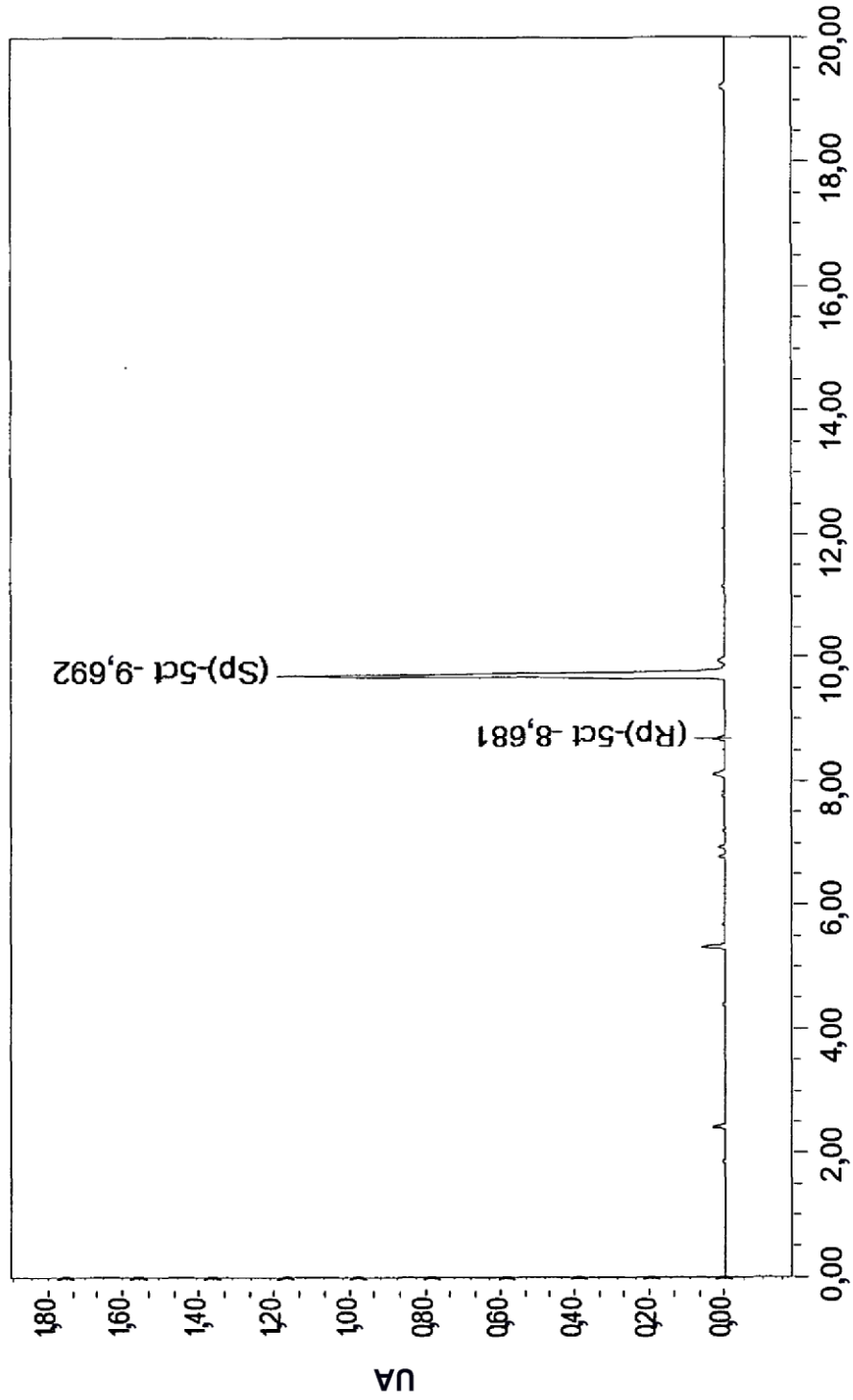


FIGURA 10A

Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5ct

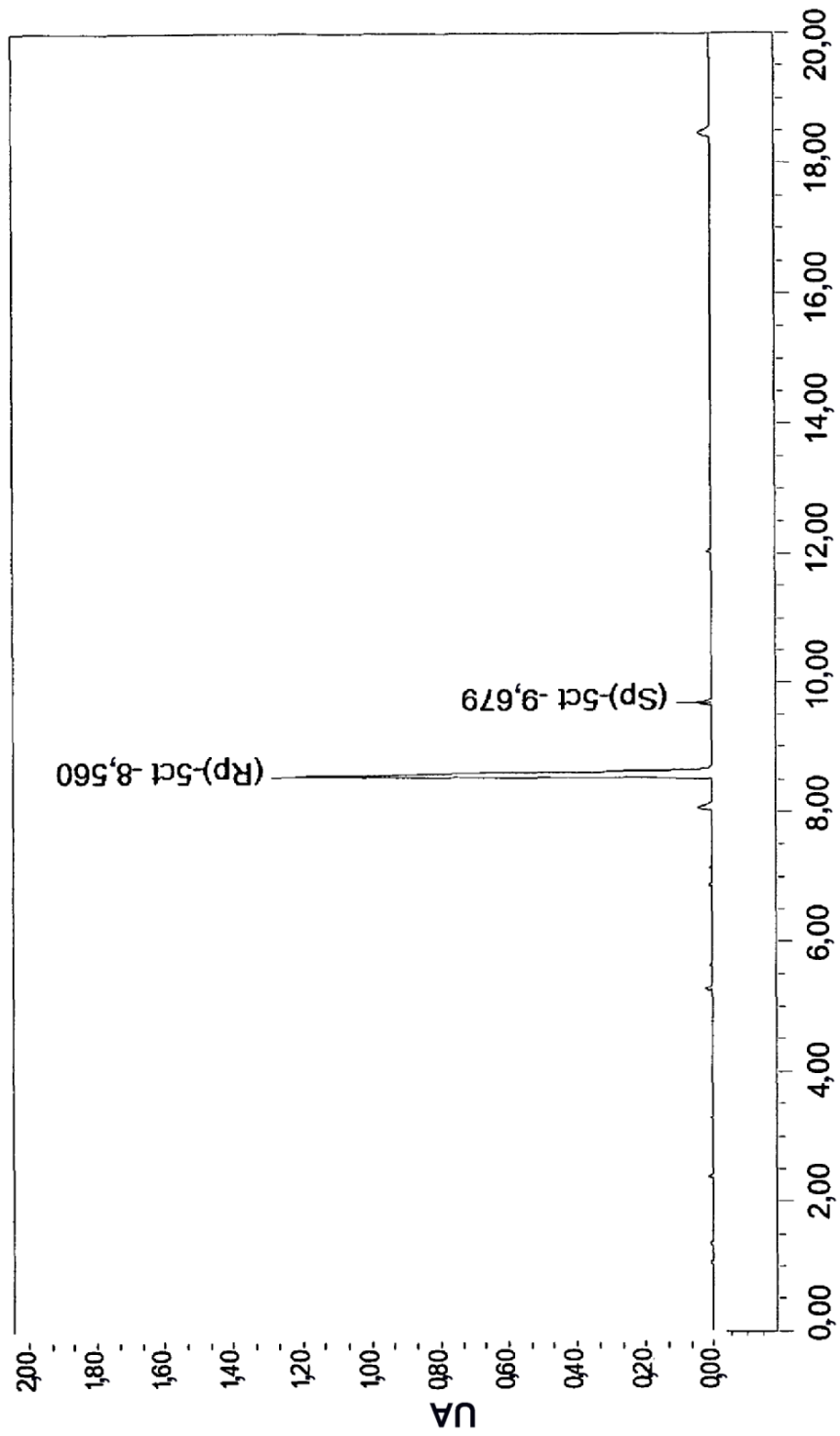
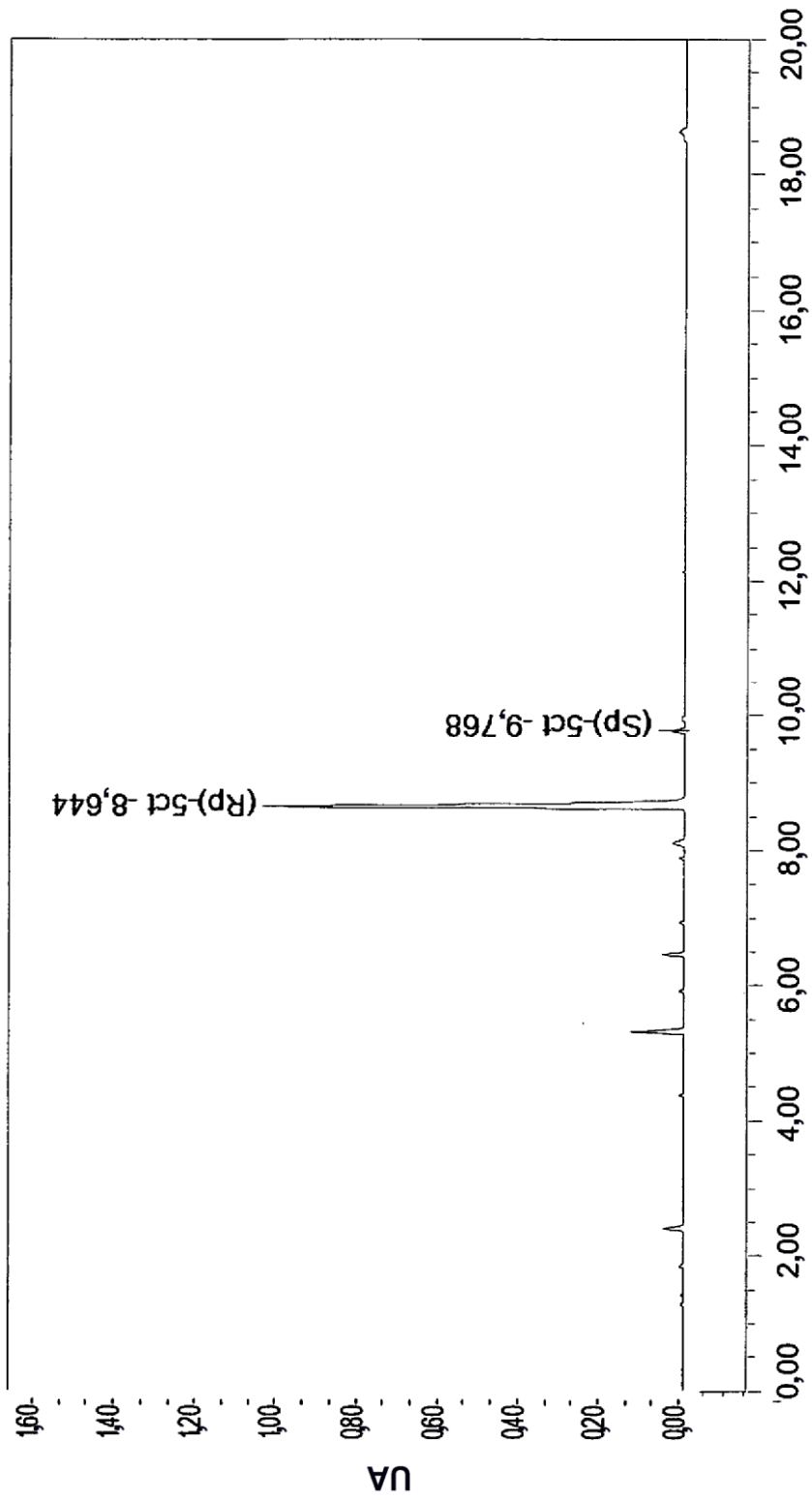
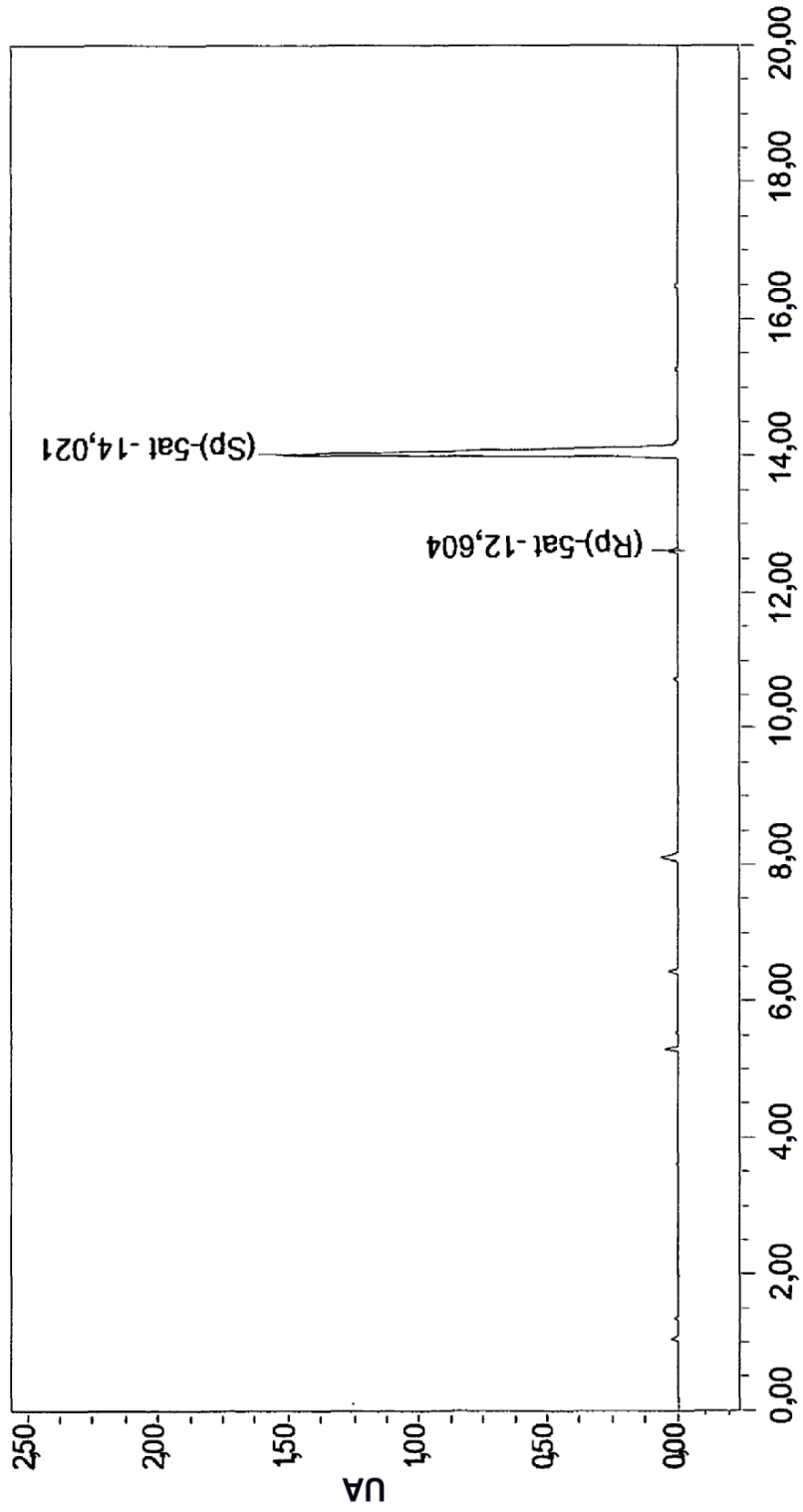


FIGURA 10B

Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5ct

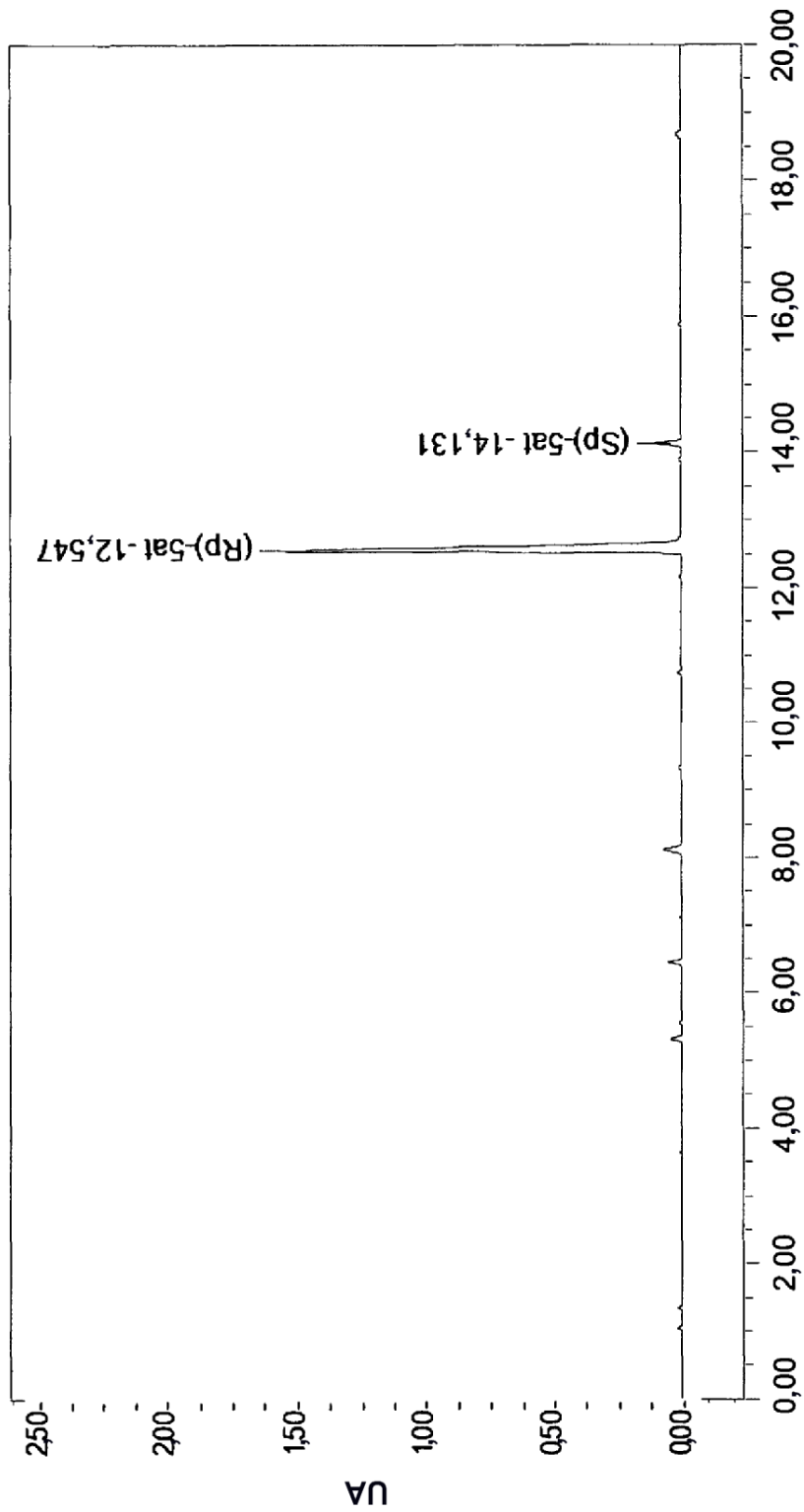


**FIGURA 11**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5at

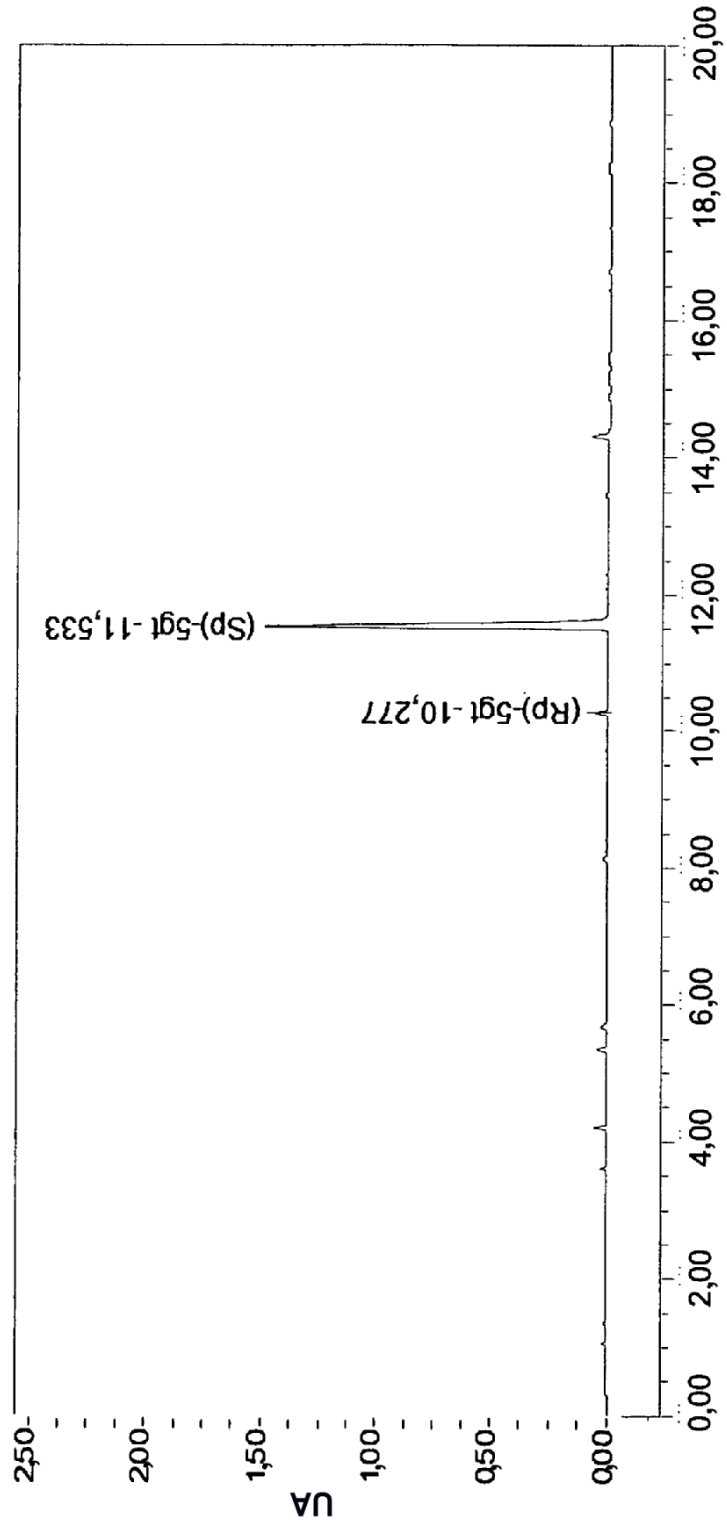




**FIGURA 12**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5at



**FIGURA 13**  
Perfil de UPLC® en bruto de (S<sub>P</sub>)-5gt



**FIGURA 14**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5gt

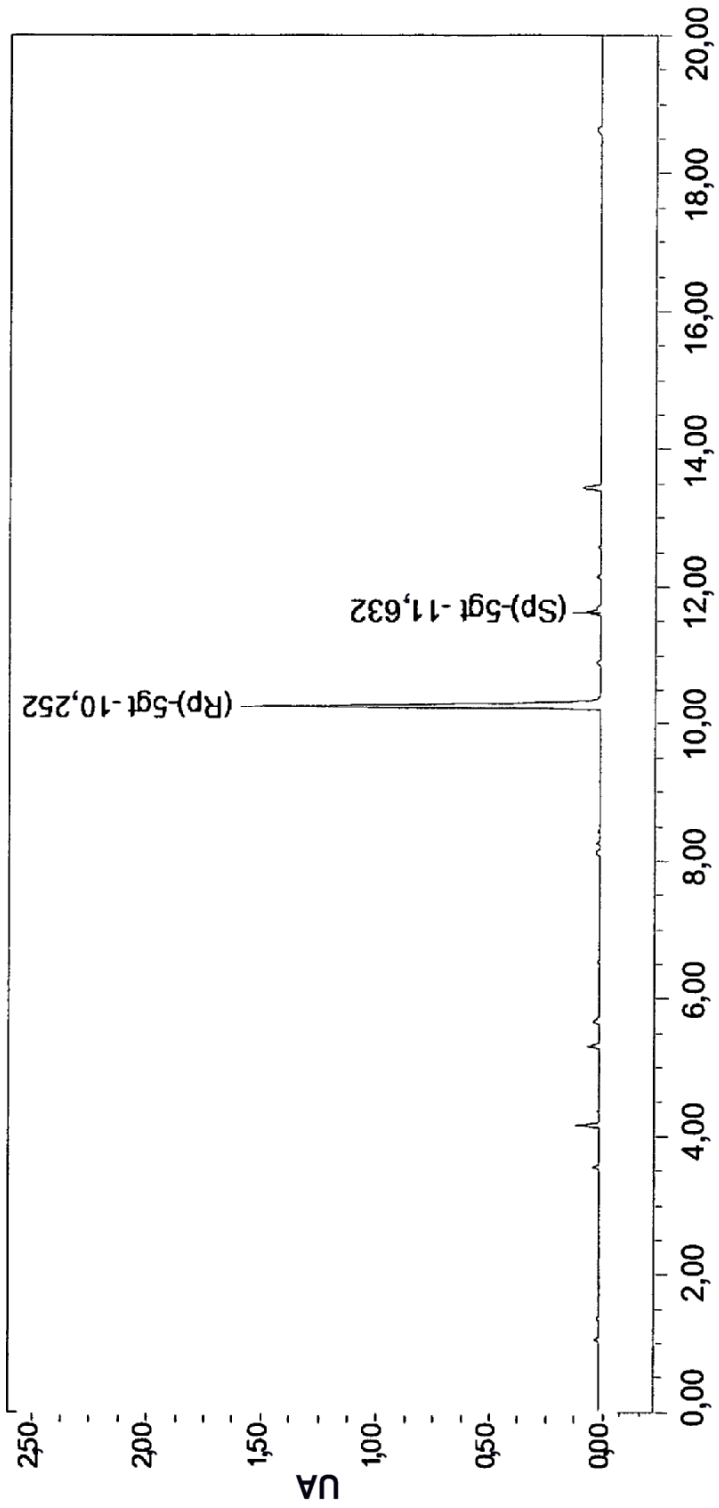


FIGURA 15A

Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5tt

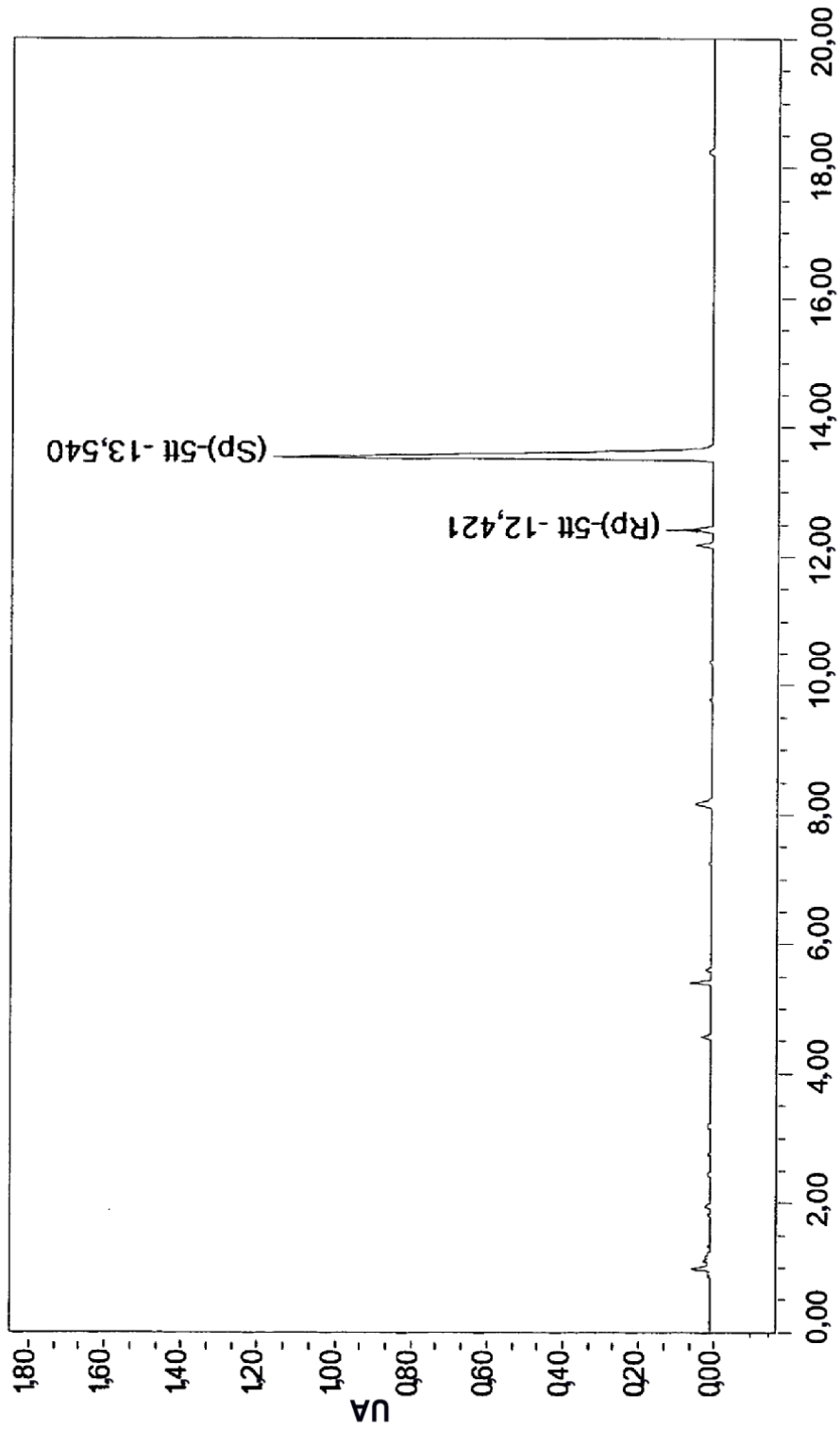


FIGURA 15B

Perfil de UPLC® en bruto de (S<sub>p</sub>)-5tt

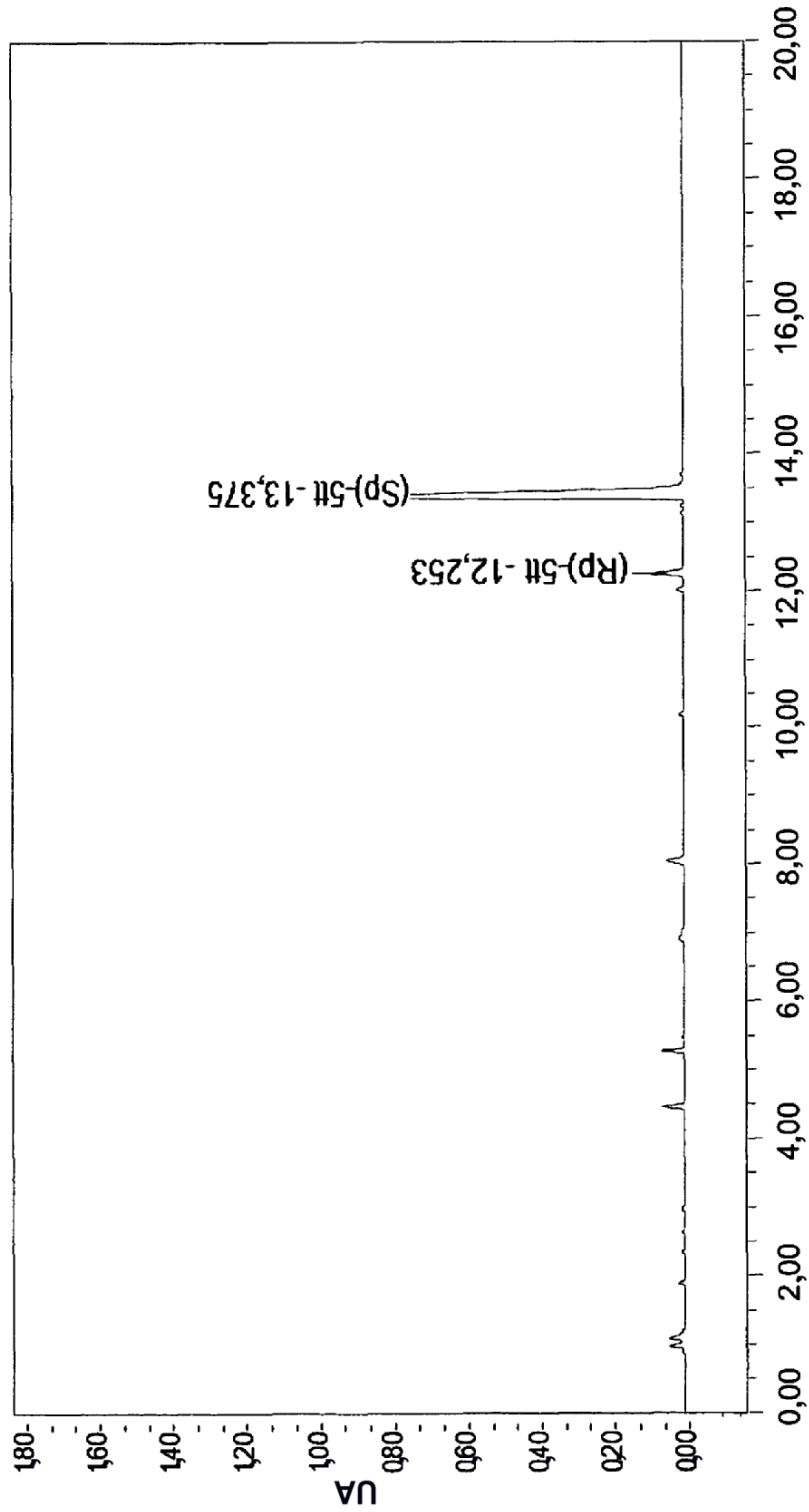
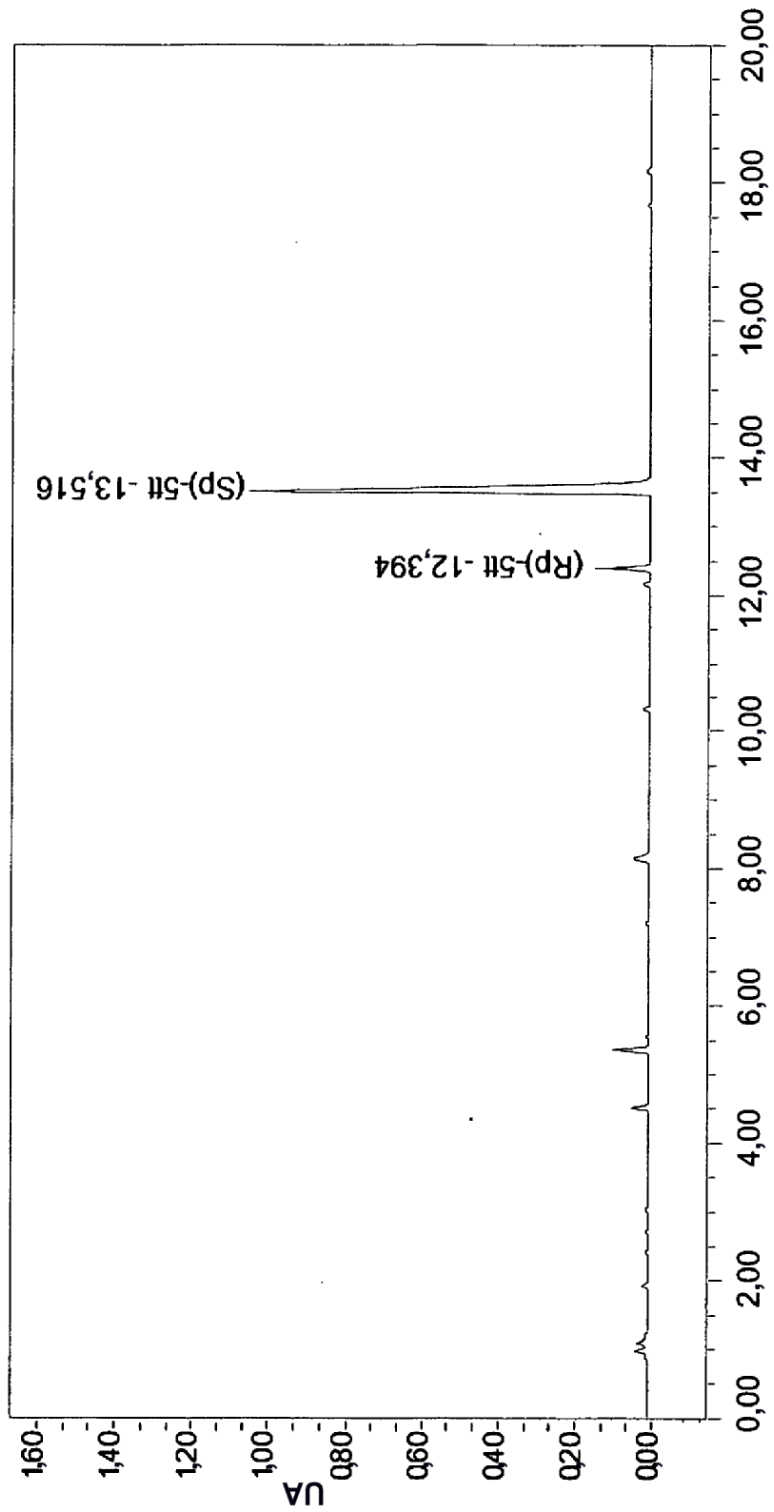
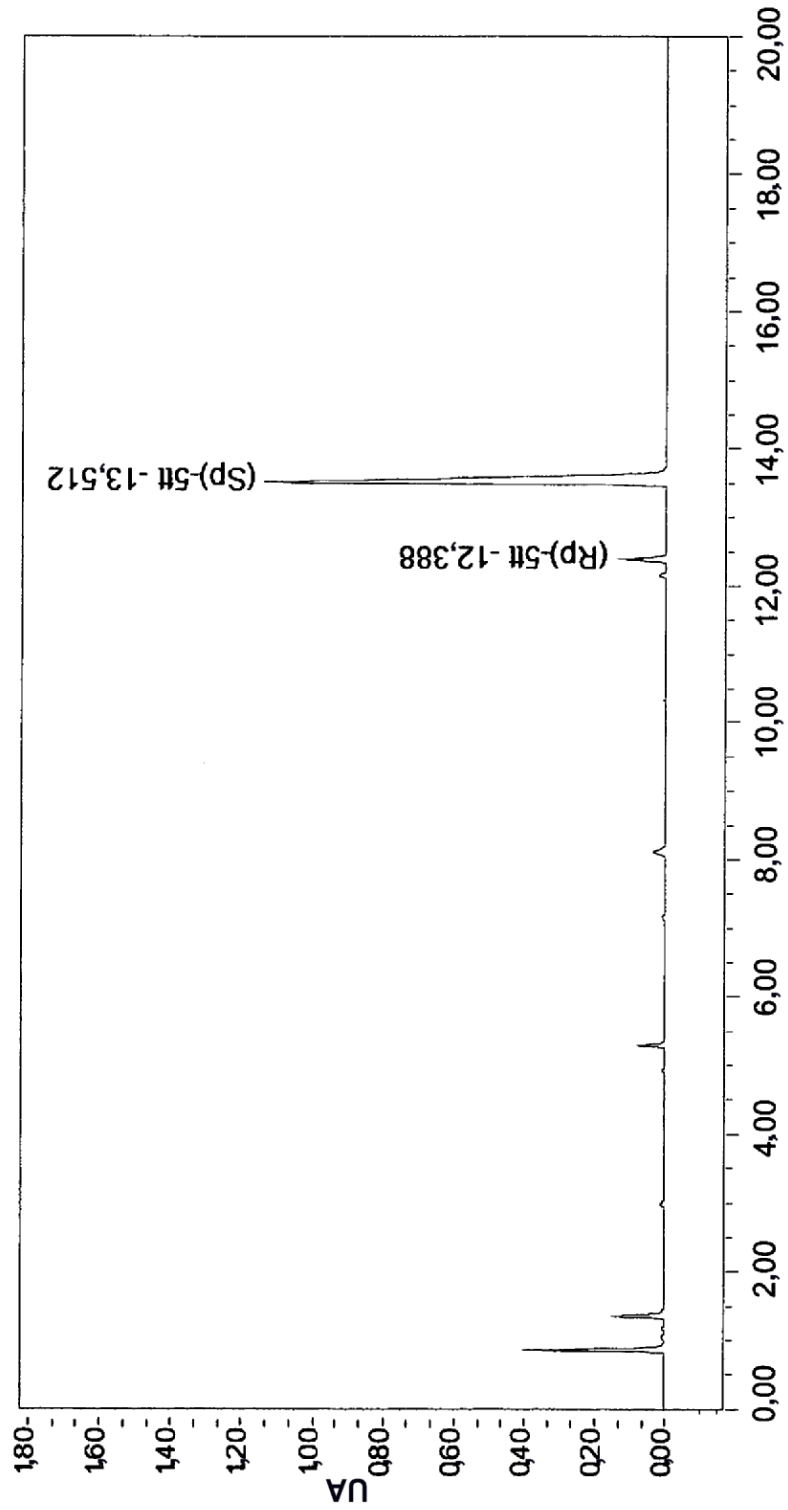


FIGURA 16A

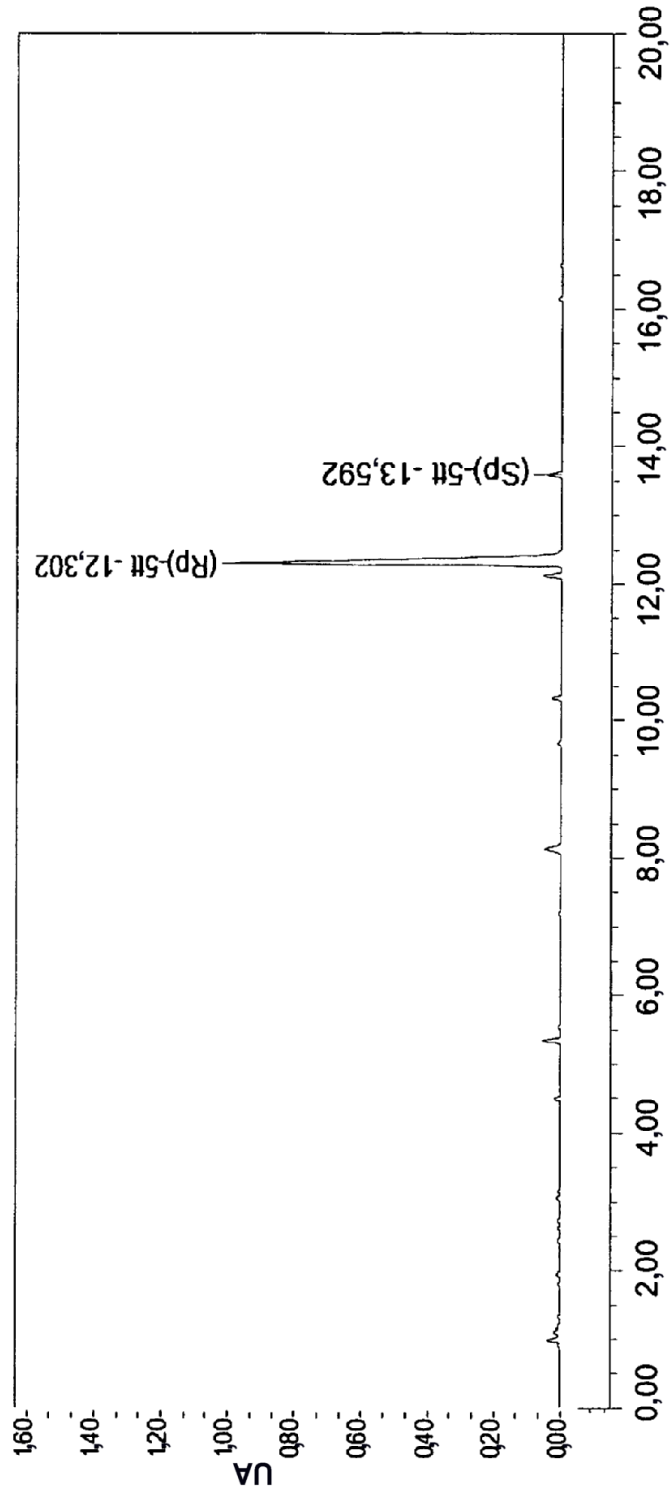
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5tt



**FIGURA 16B**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5tt

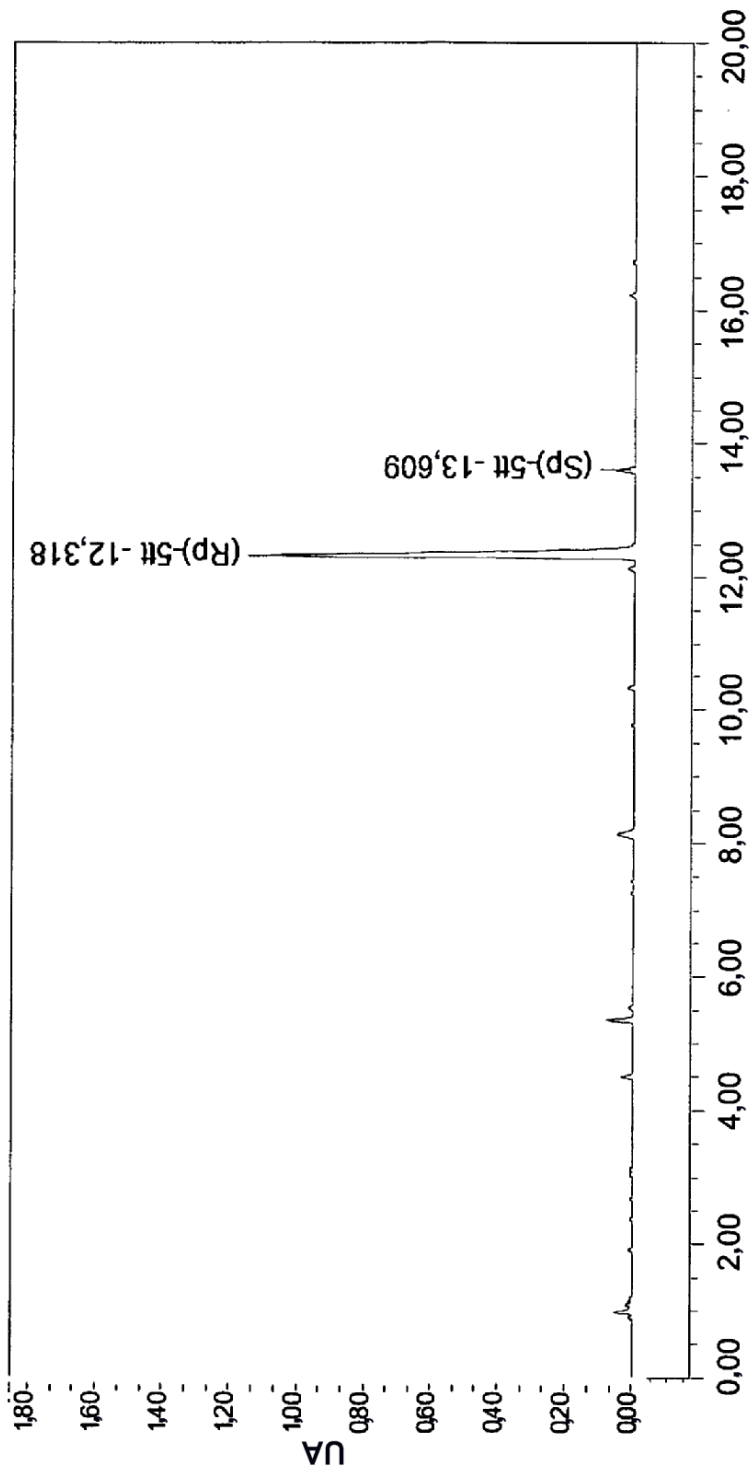


**FIGURA 17A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5tt

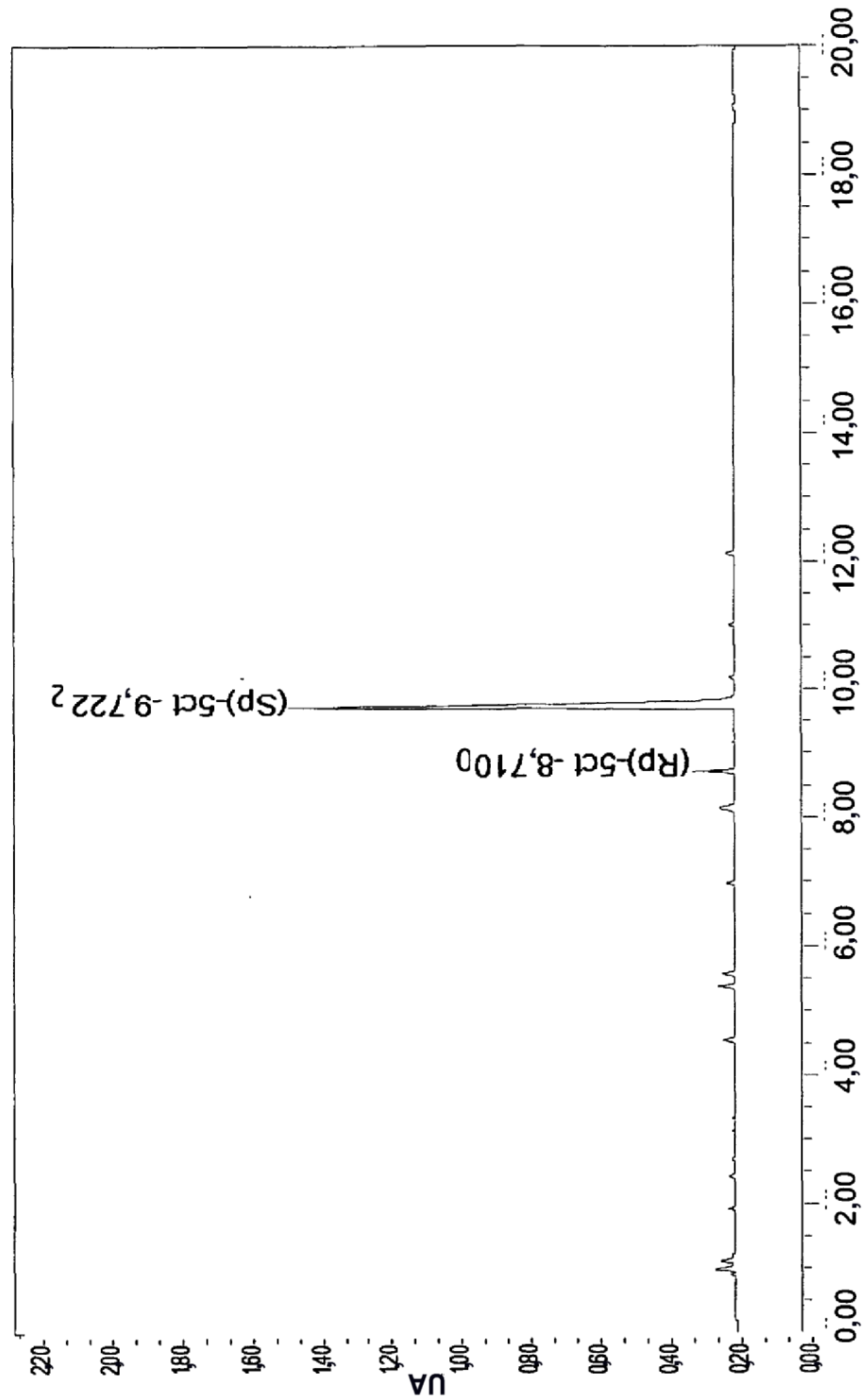




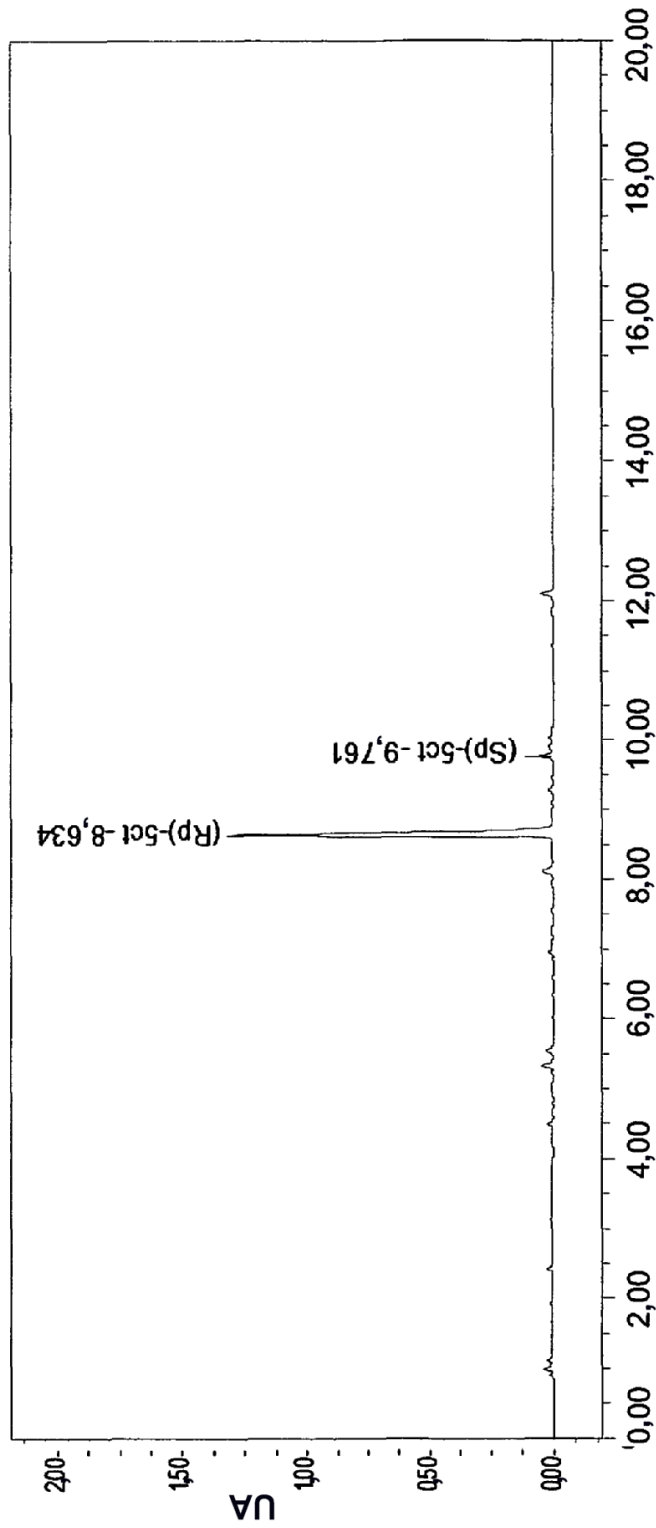
**FIGURA 17B**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5tt



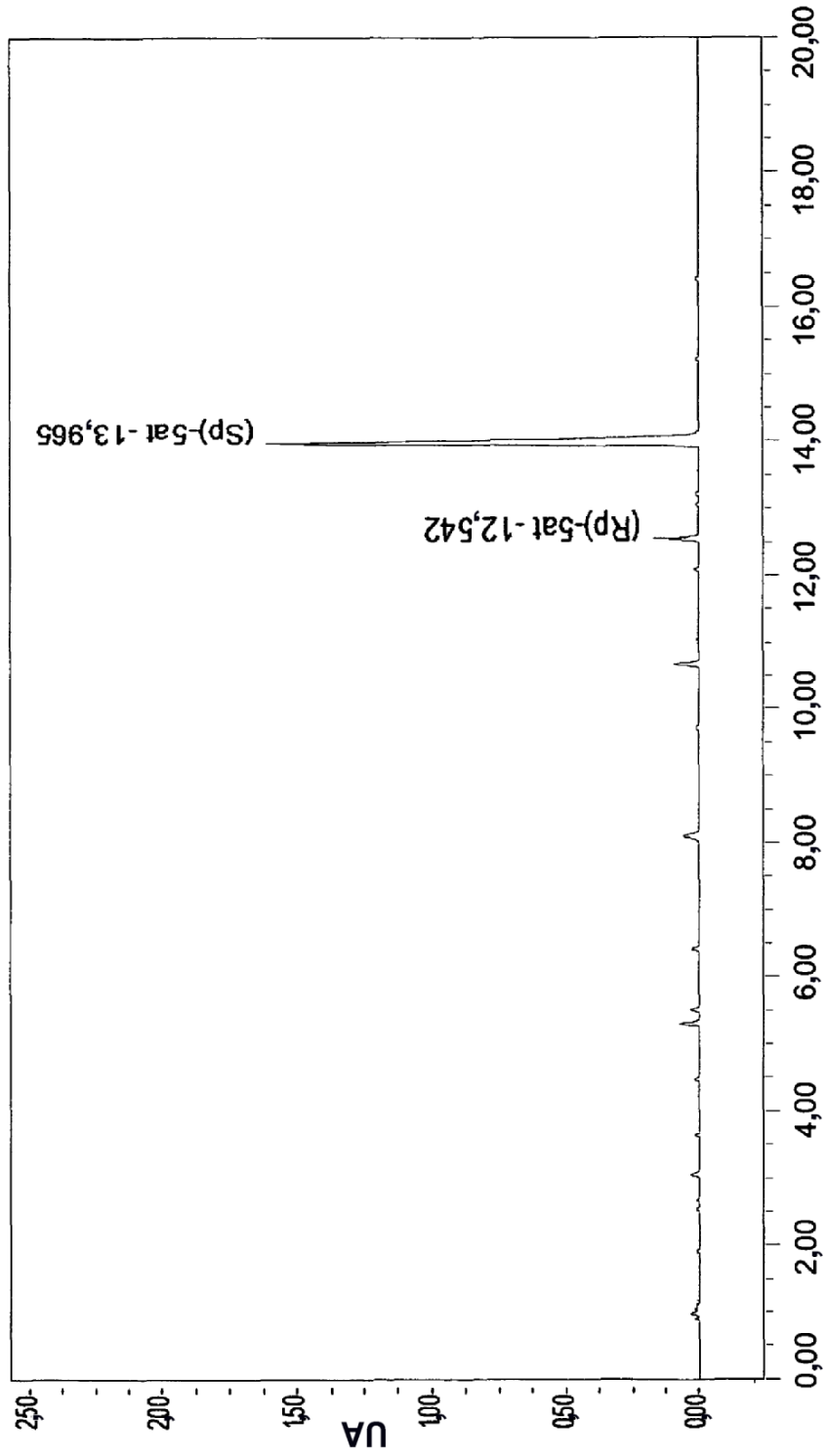
**FIGURA 18**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5ct



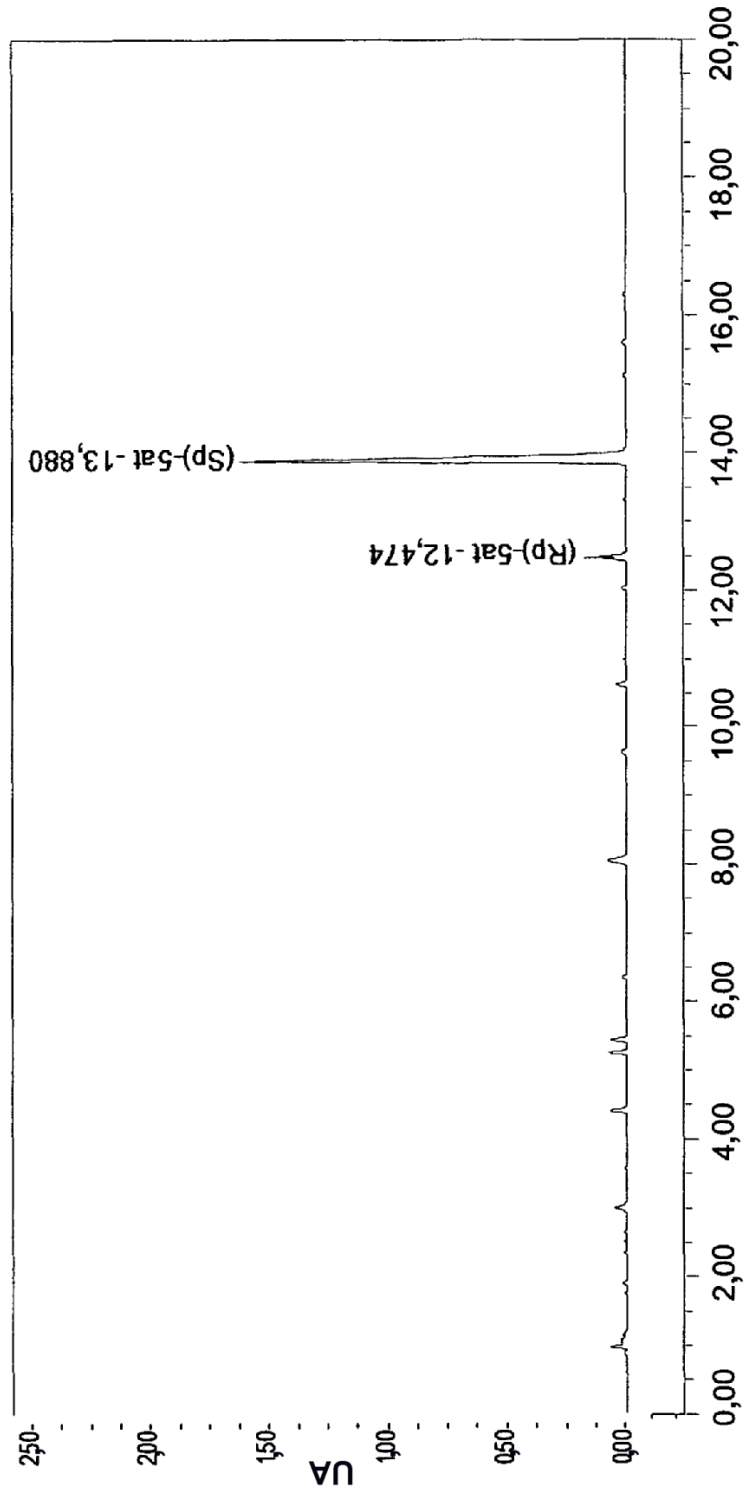
**FIGURA 19**  
Perfil de UPLC® en bruto de (R<sub>p</sub>)-5ct



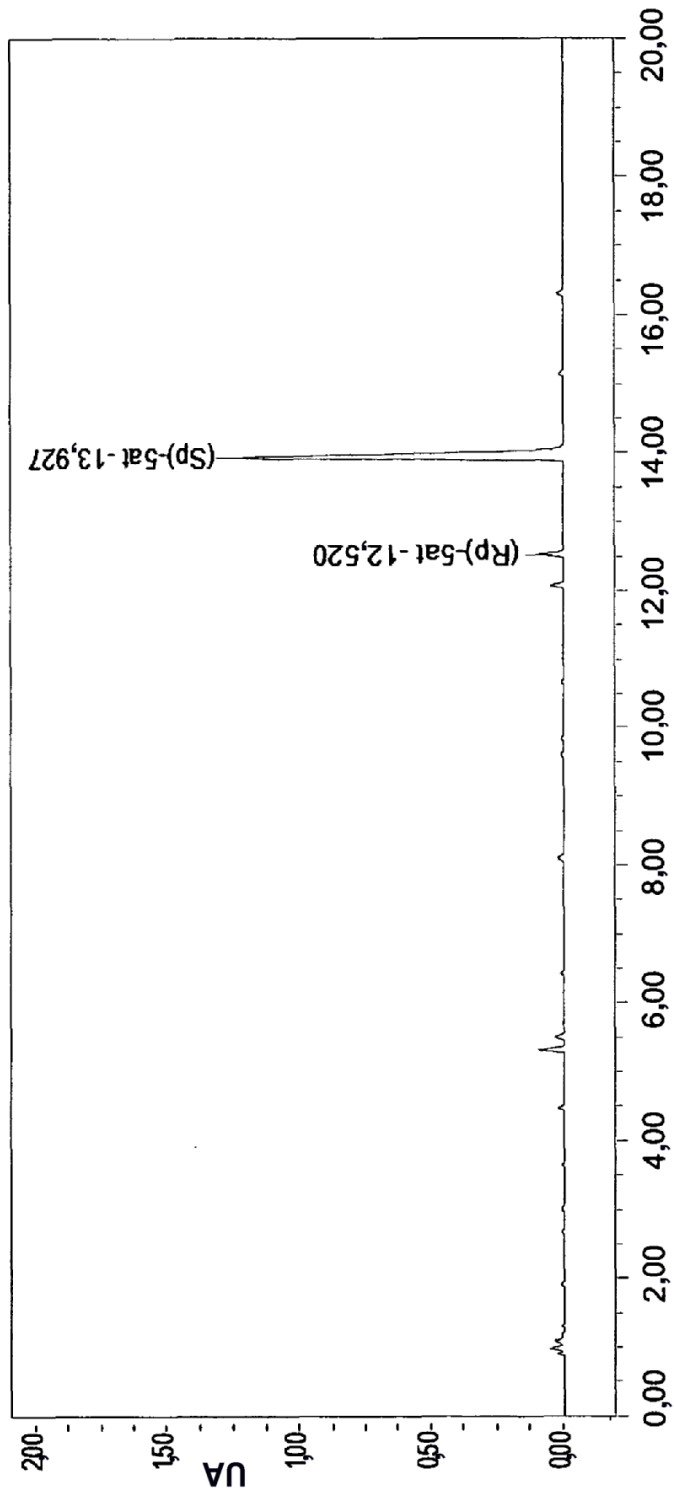
**FIGURA 20A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (S)-5at



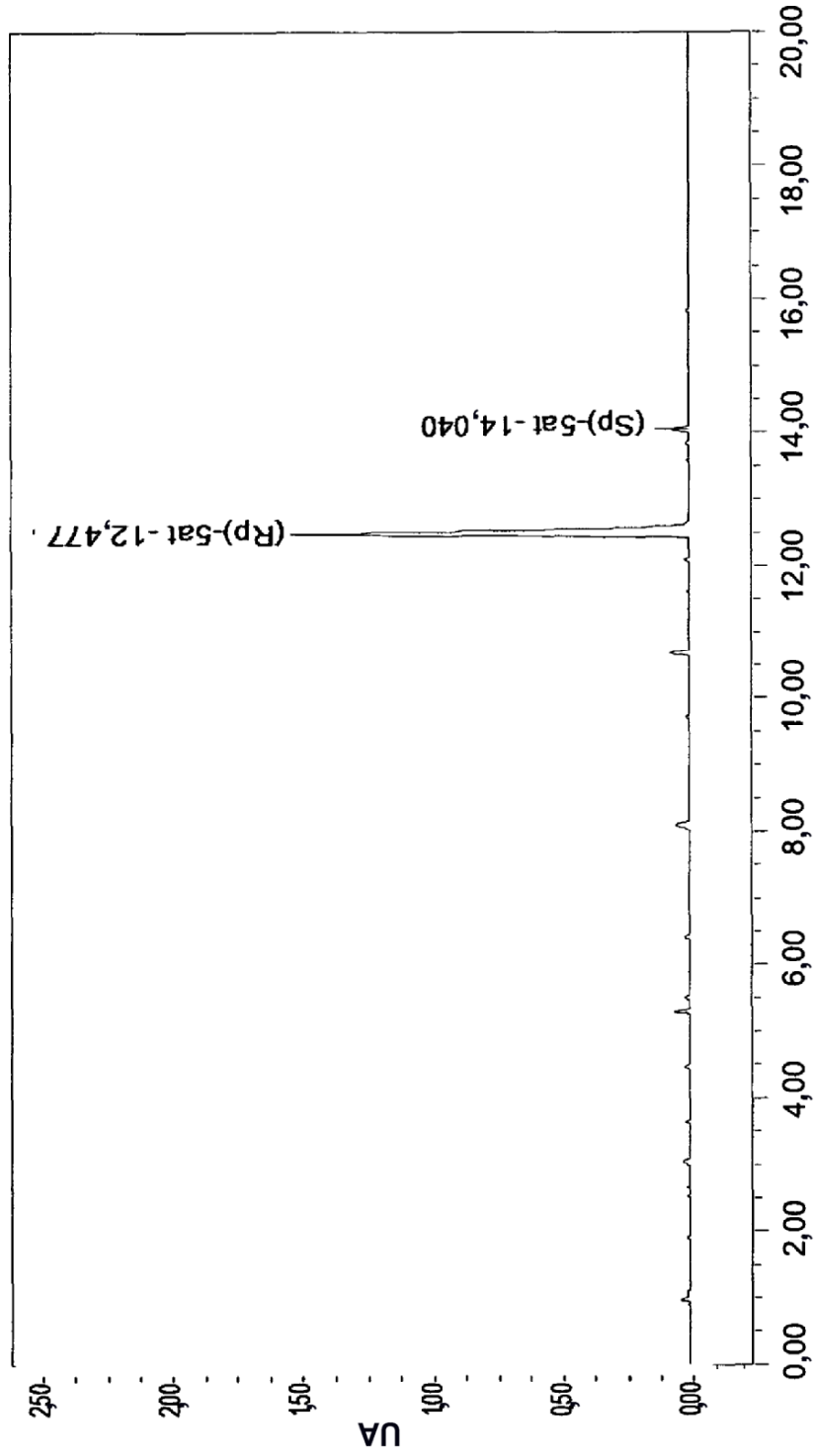
**FIGURA 20B**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5at



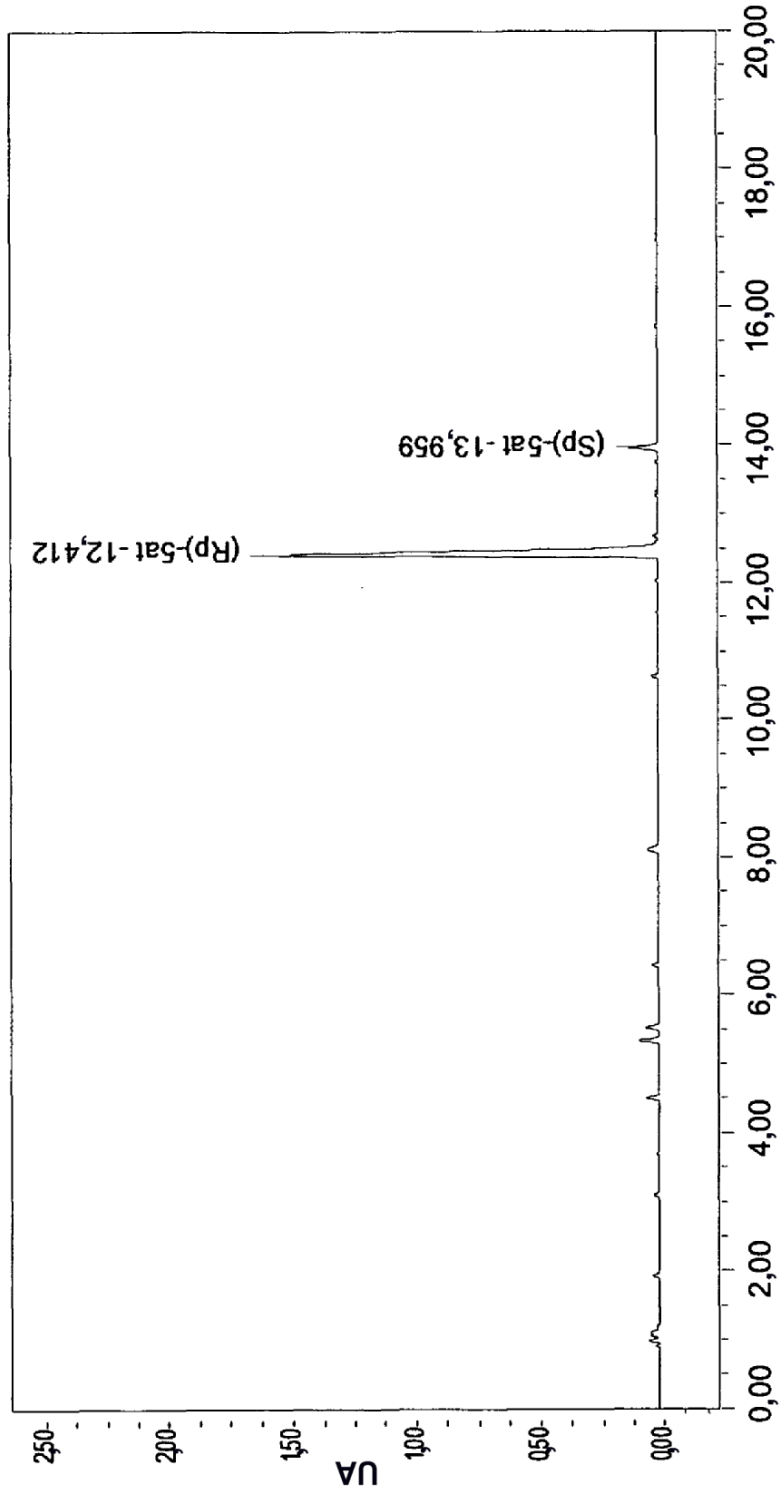
**FIGURA 21**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5at



**FIGURA 22A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5at

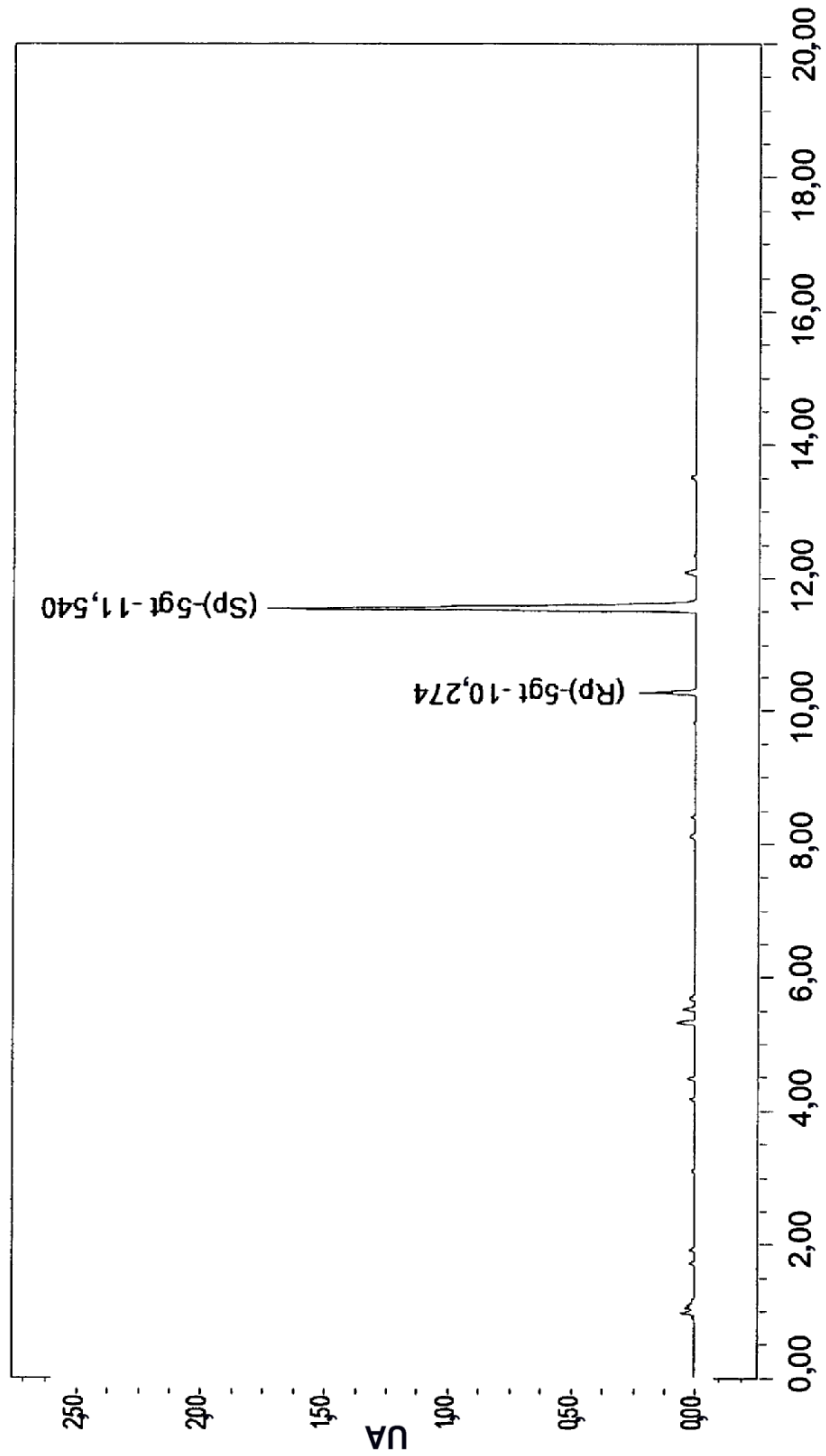


**FIGURA 22B**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5at

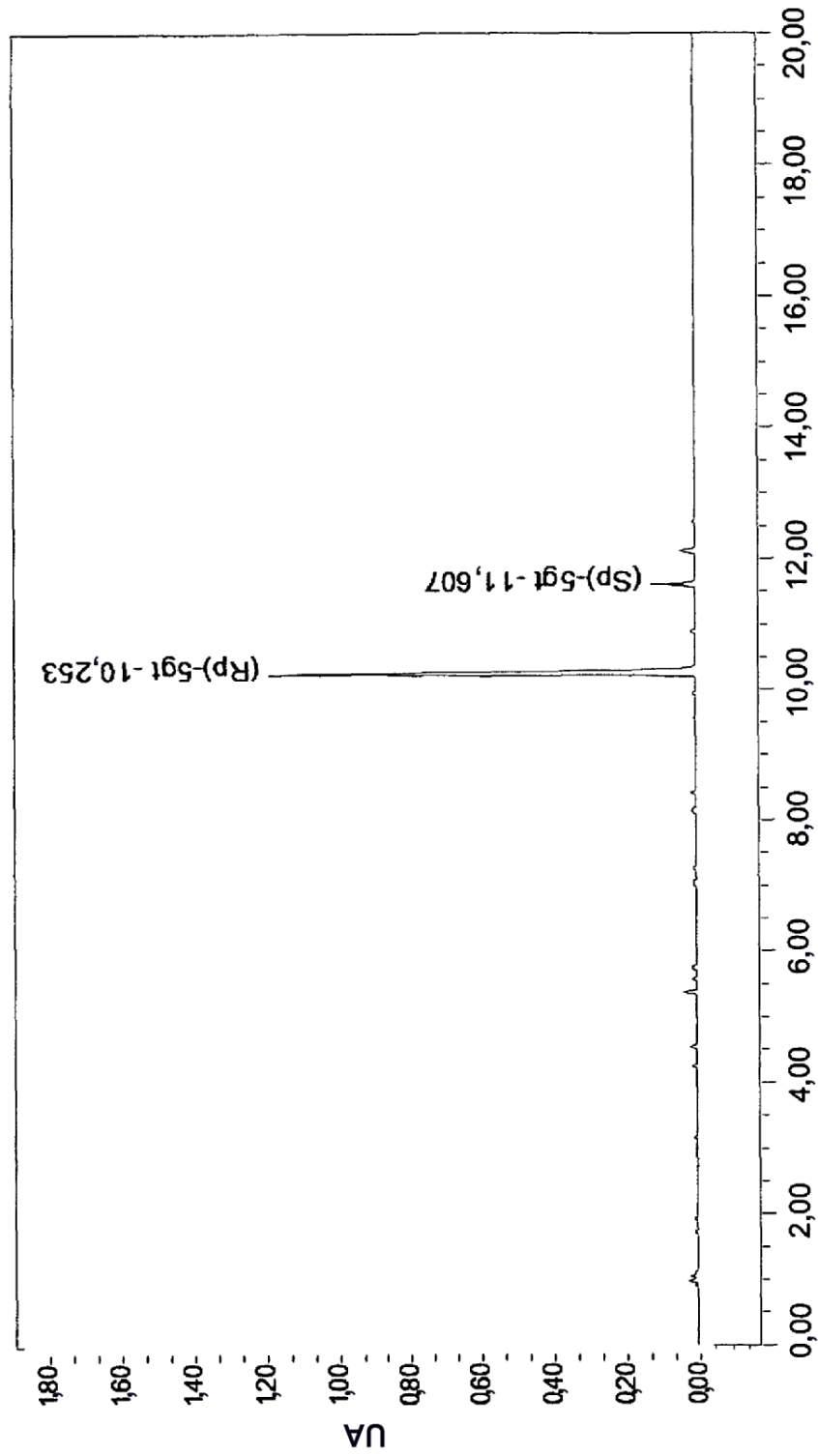




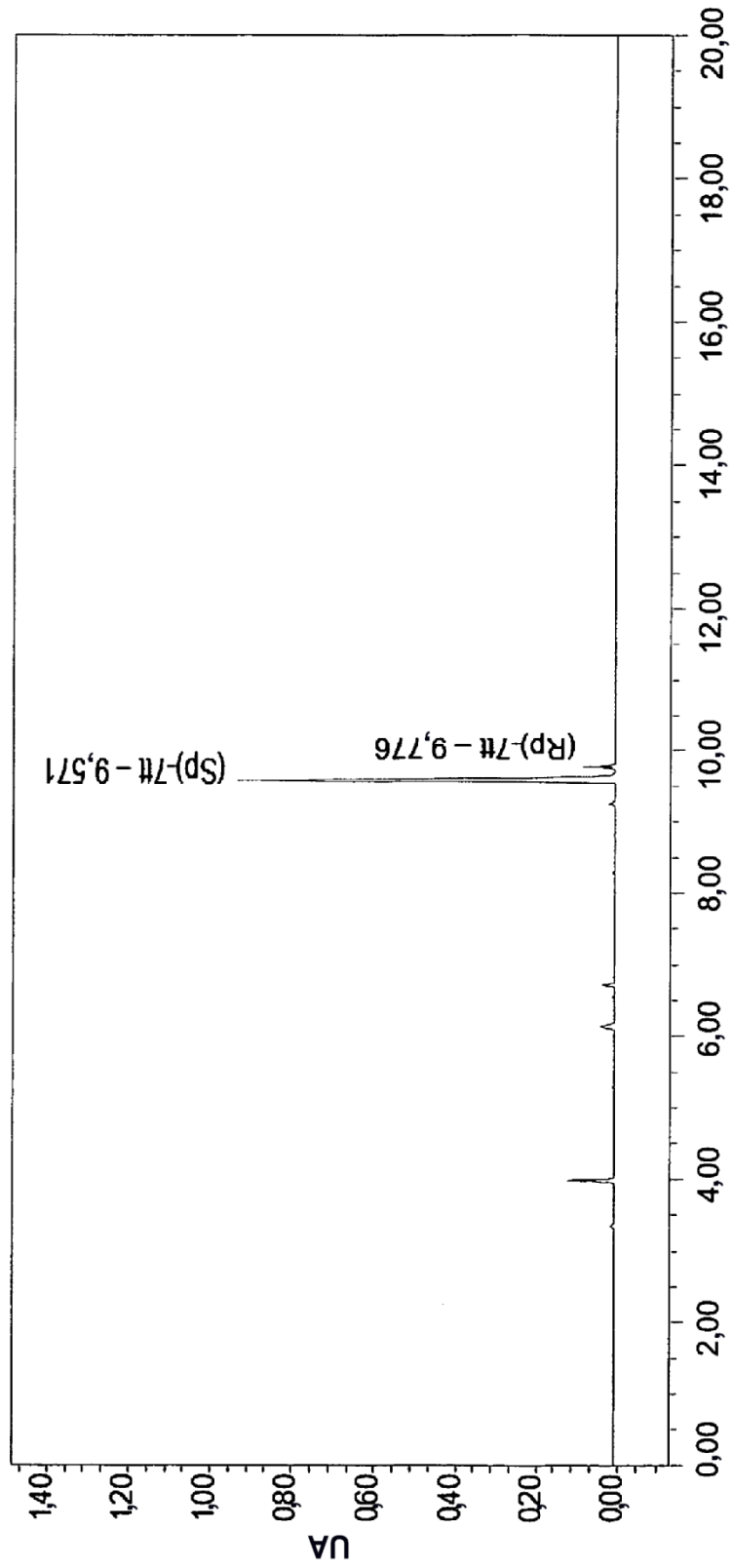
**FIGURA 23**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-5gt



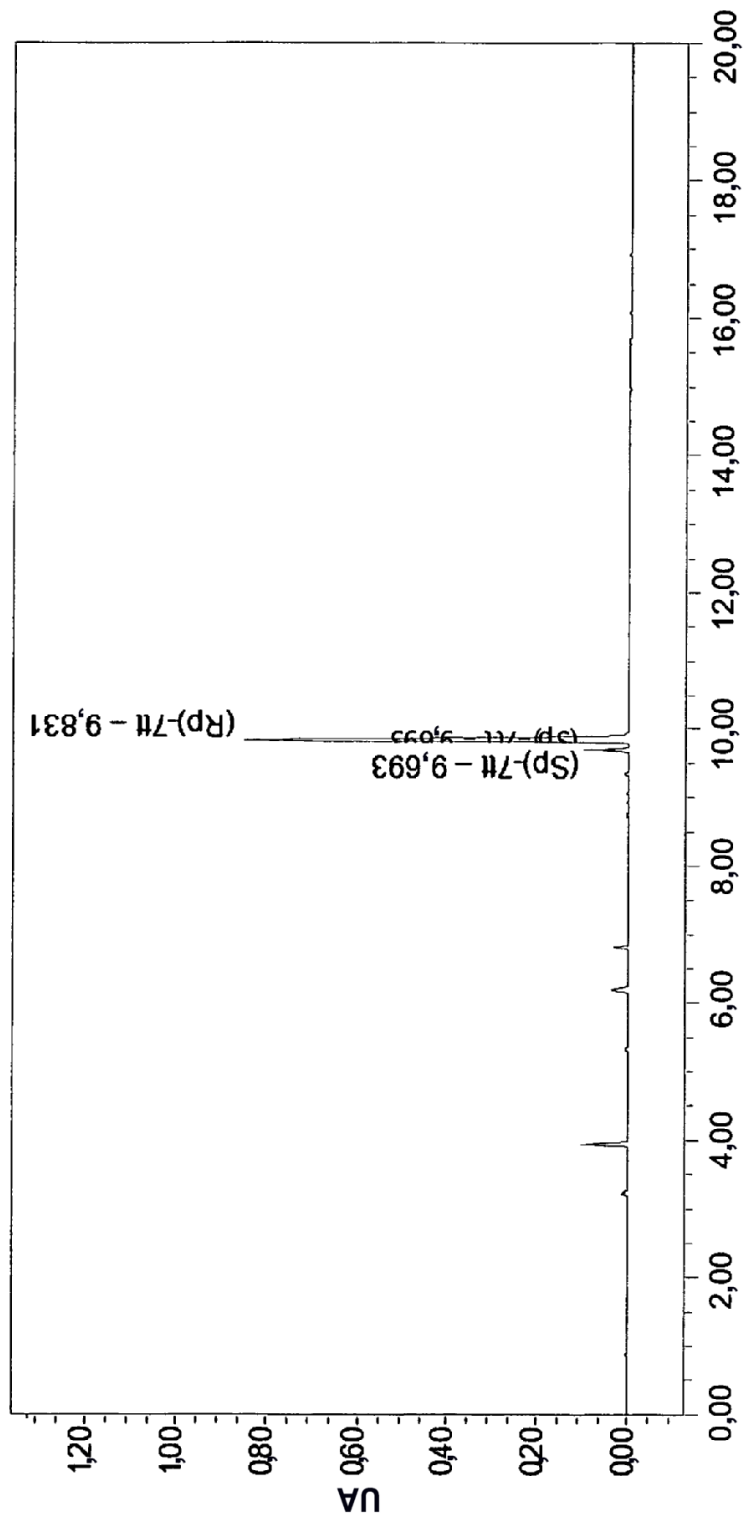
**FIGURA 24**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-5gt



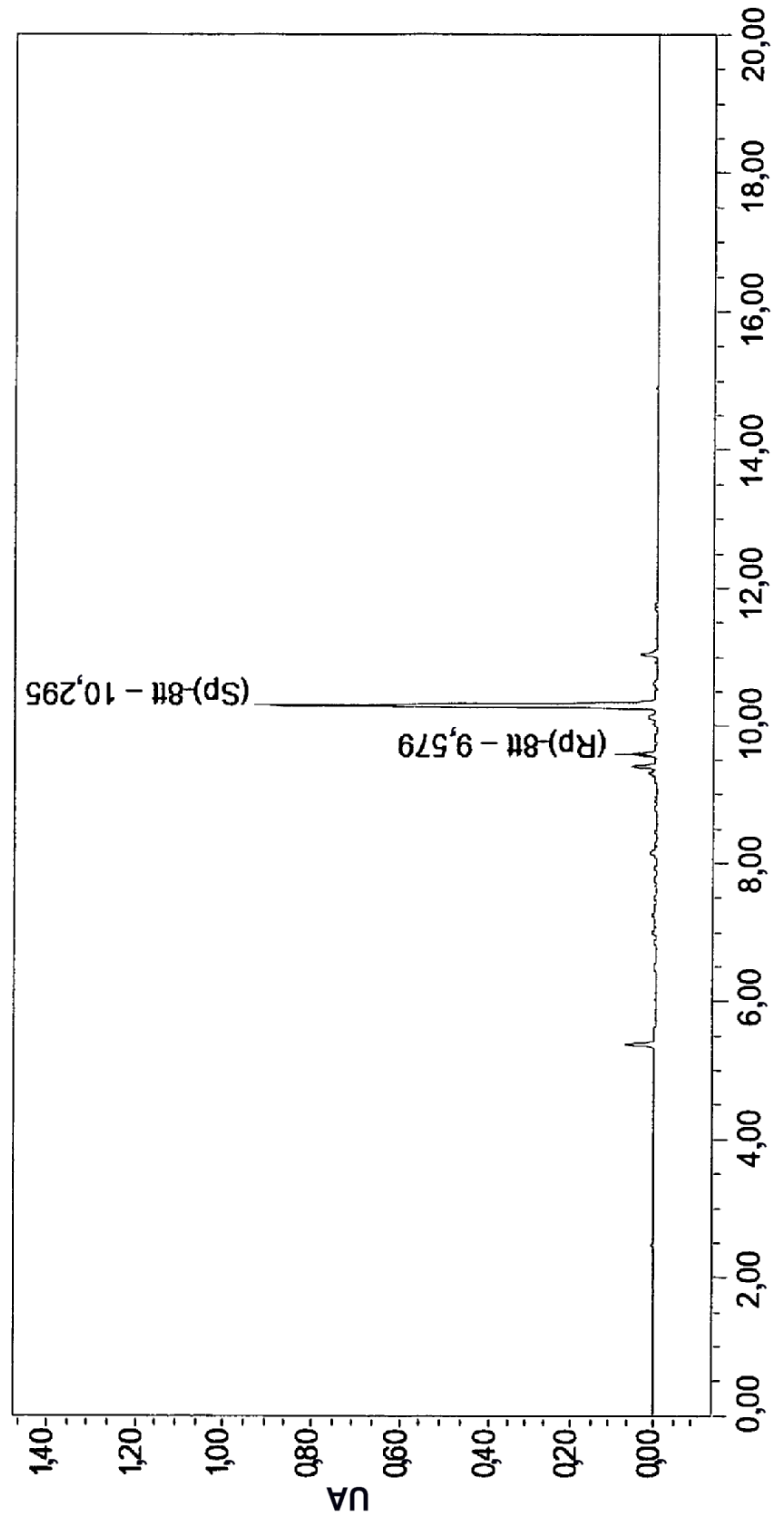
**FIGURA 25**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-7tt



**FIGURA 26**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-7tt



**FIGURA 27**  
Perfil de UPLC® en bruto de (S<sub>p</sub>)-8tt



**FIGURA 28**  
Perfil de UPLC® en bruto de (R<sub>p</sub>)-8tt

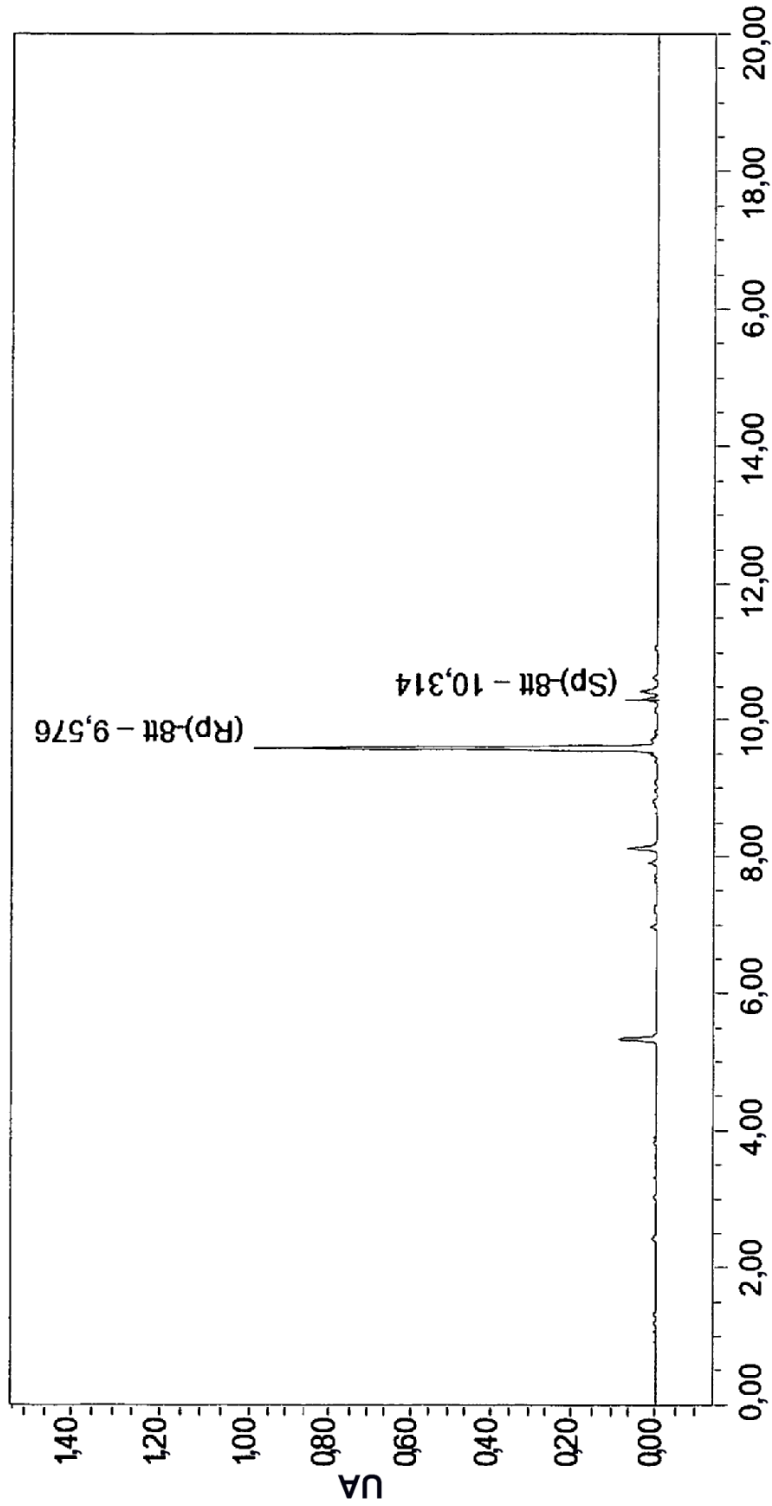
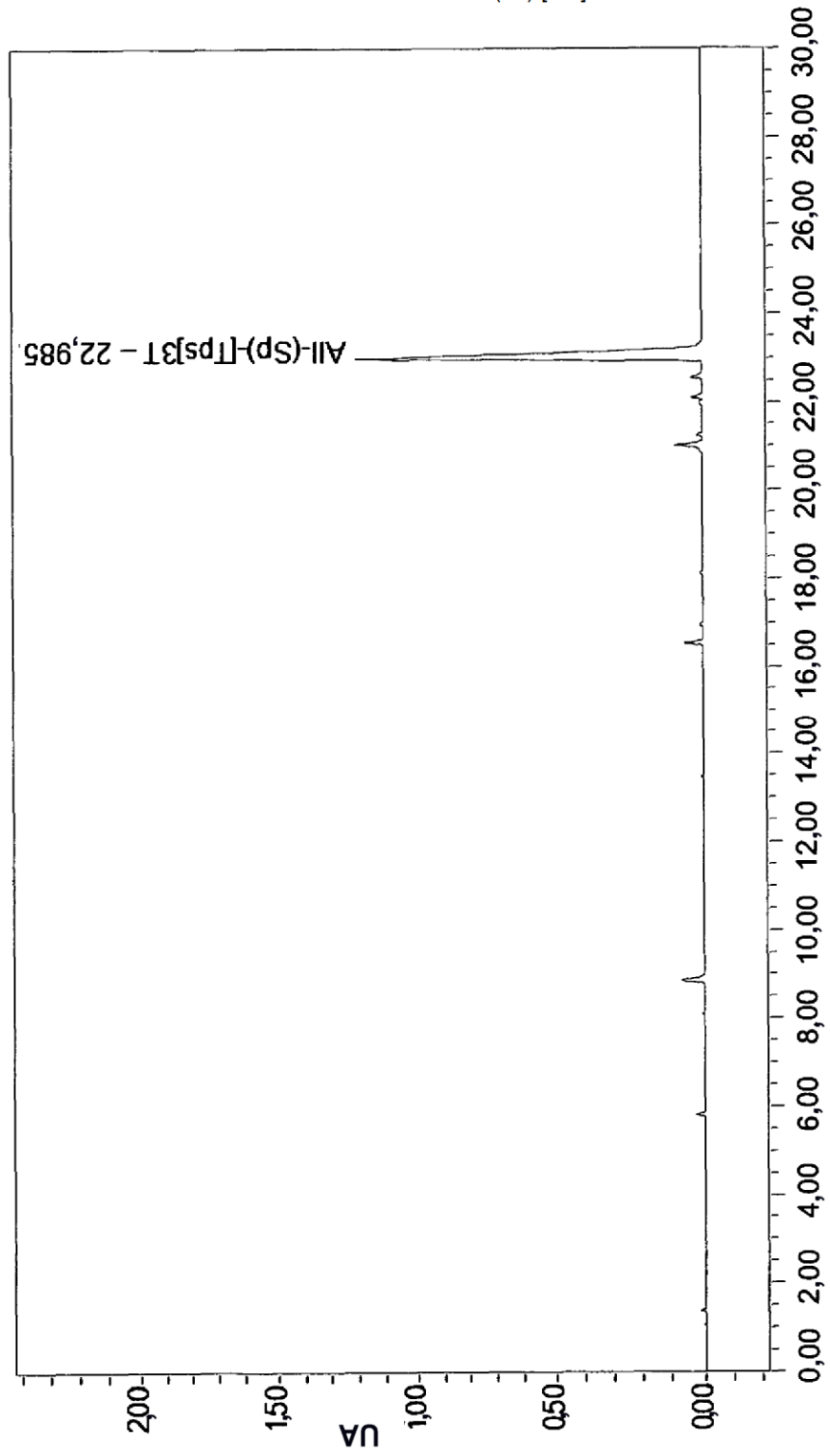
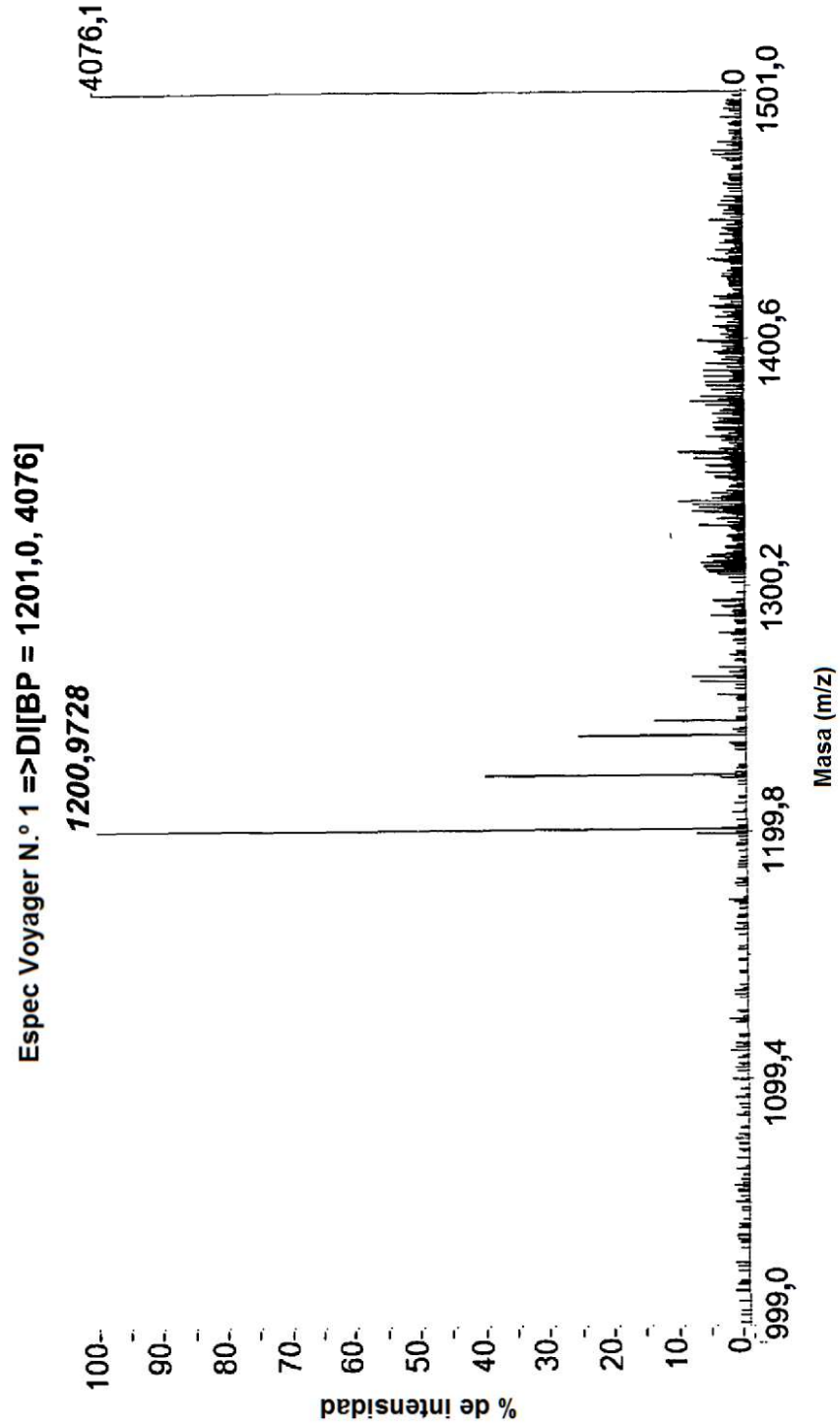


FIGURA 29A

Perfil de UPLC® en bruto de All-(Sp)-[TPs]<sub>3</sub>T

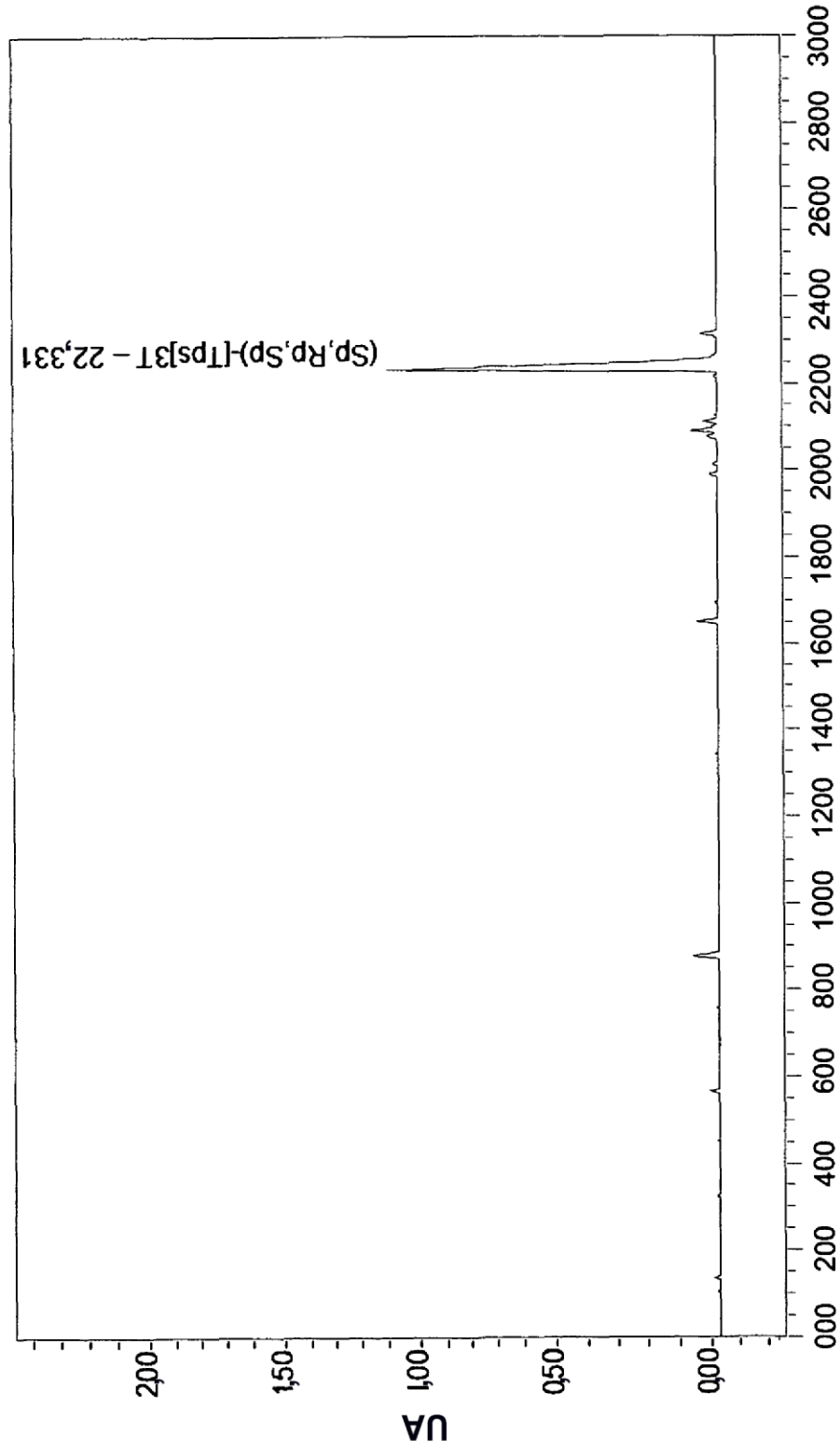


**FIGURA 29B**  
Espectro de EM-MALDI TOF de  $\text{AlI}-(\text{S}_P)-[\text{T}_{\text{PS}}]_3\text{T}$



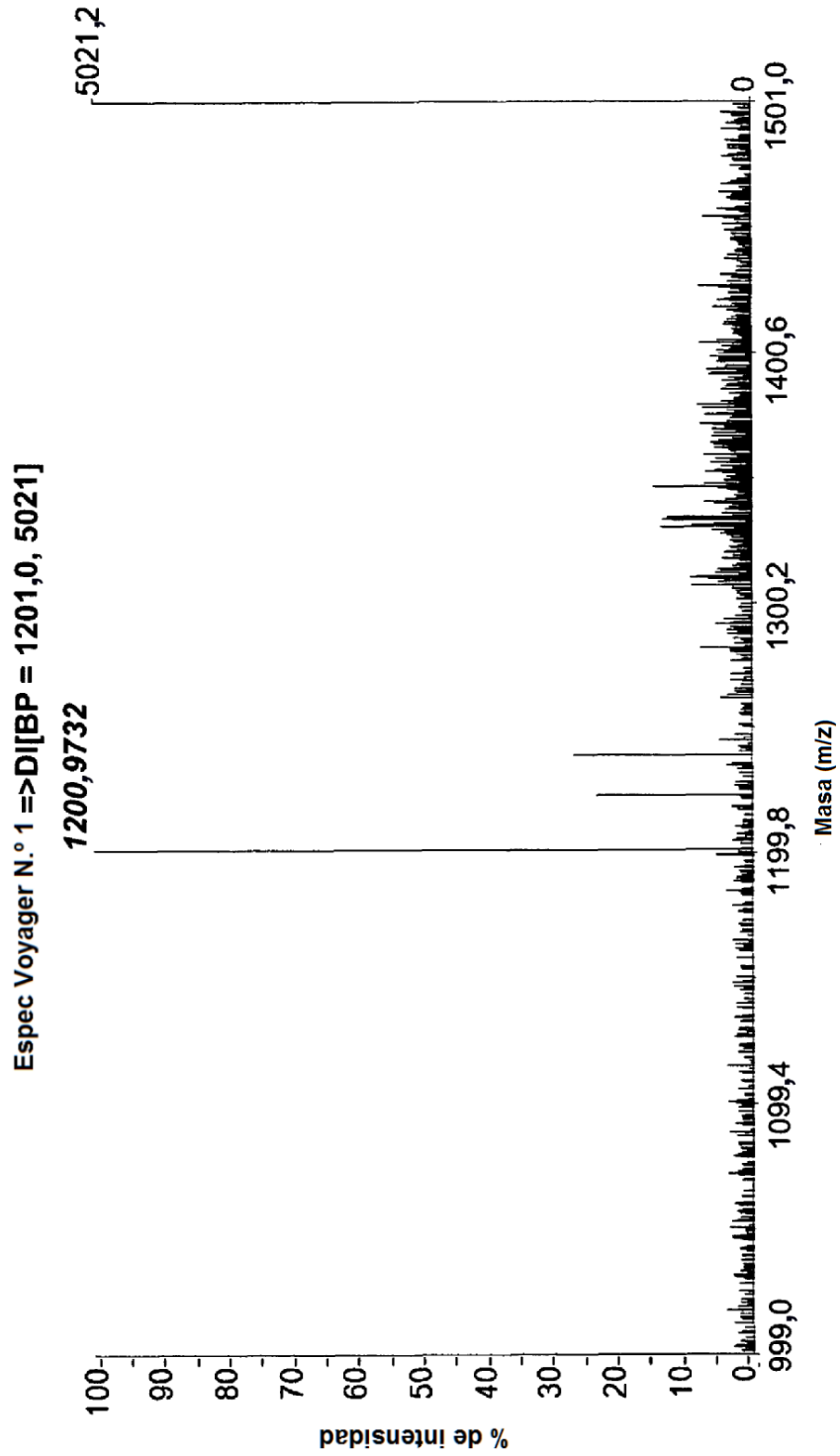


**FIGURA 30A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp, Rp, Sp)-[TPs]3T

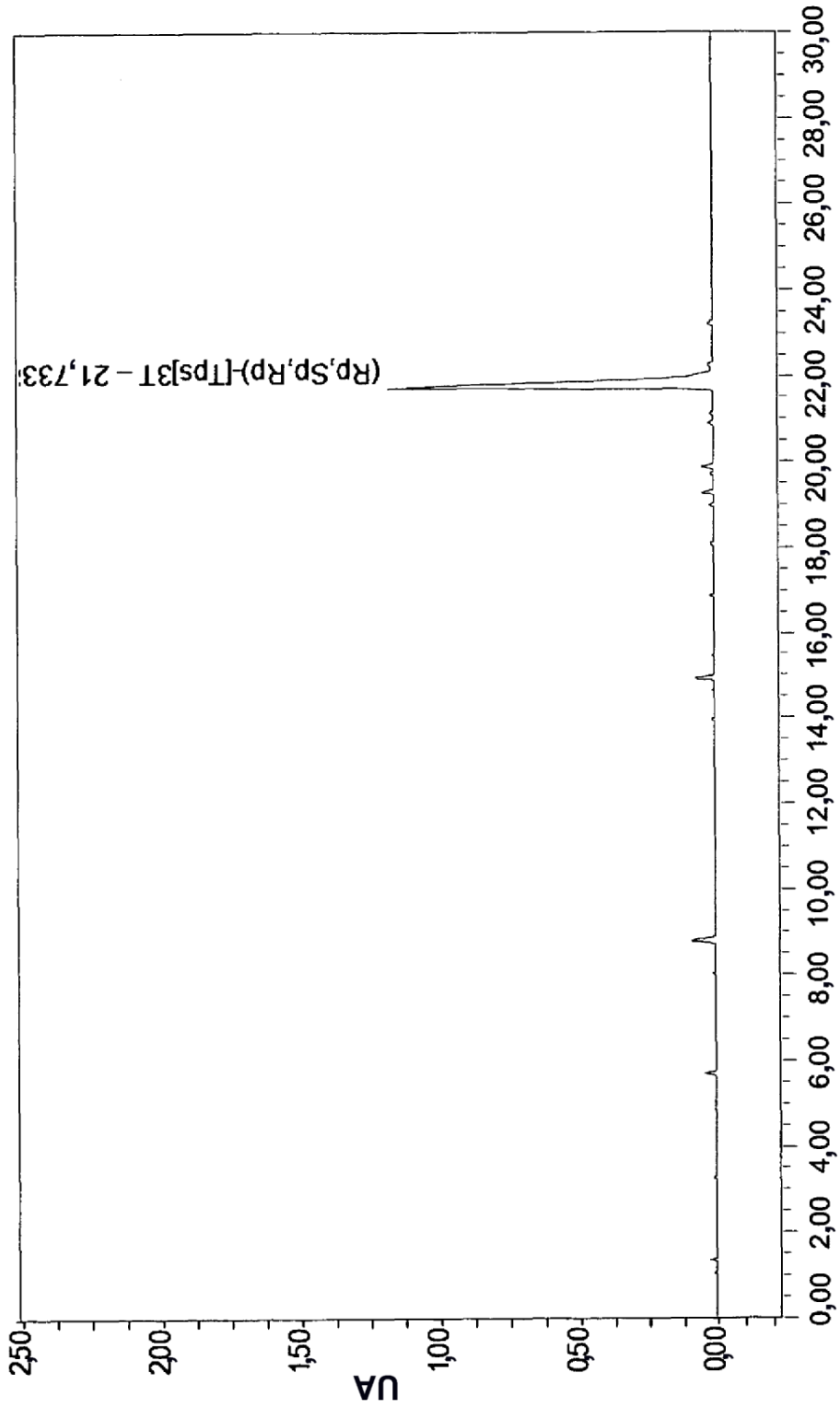


**FIGURA 30B**

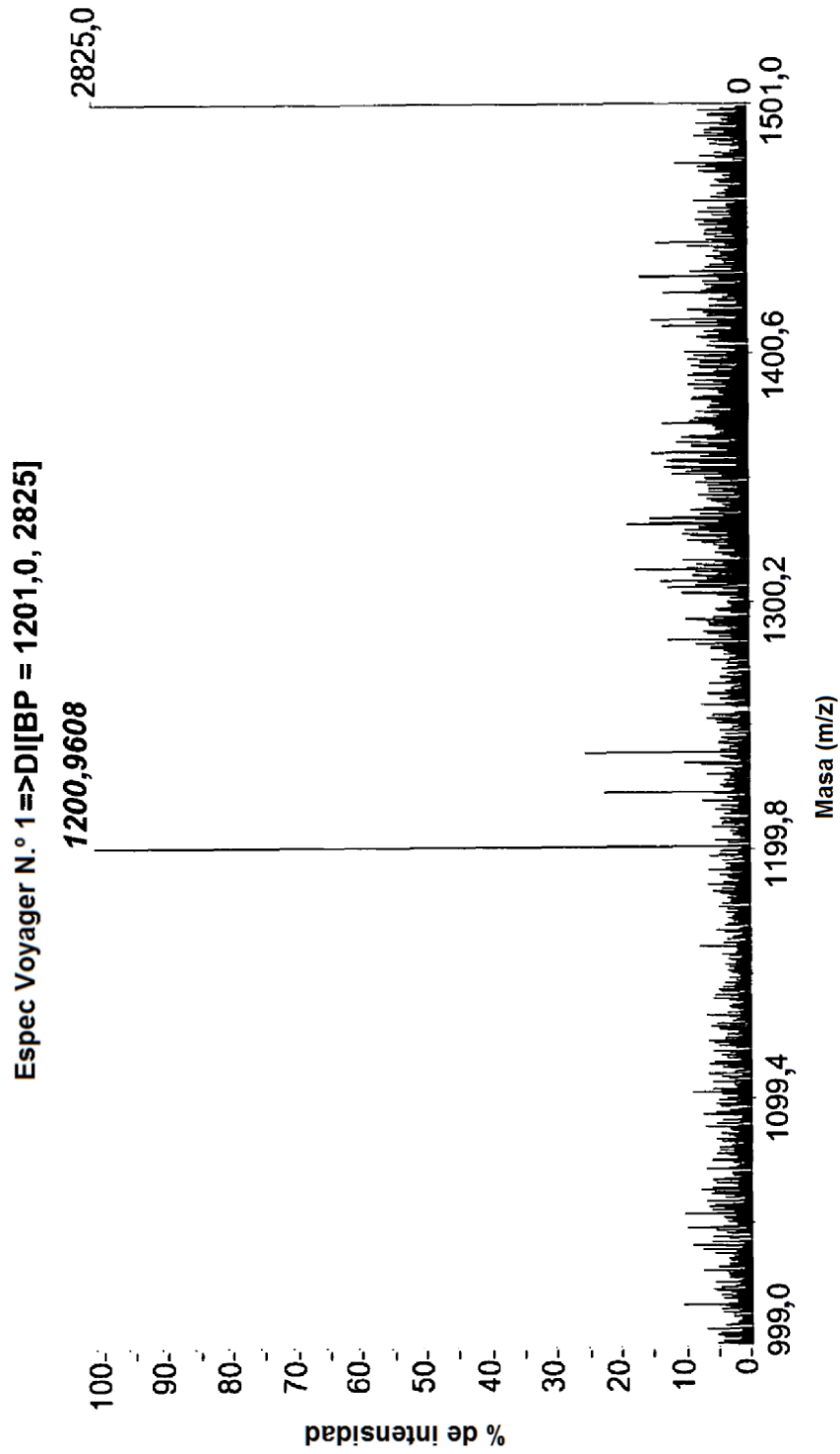
Espectro de EM-MALDI TOF de (S<sub>P</sub>, R<sub>P</sub>, S<sub>P</sub>)-[TPS]<sub>3</sub>T



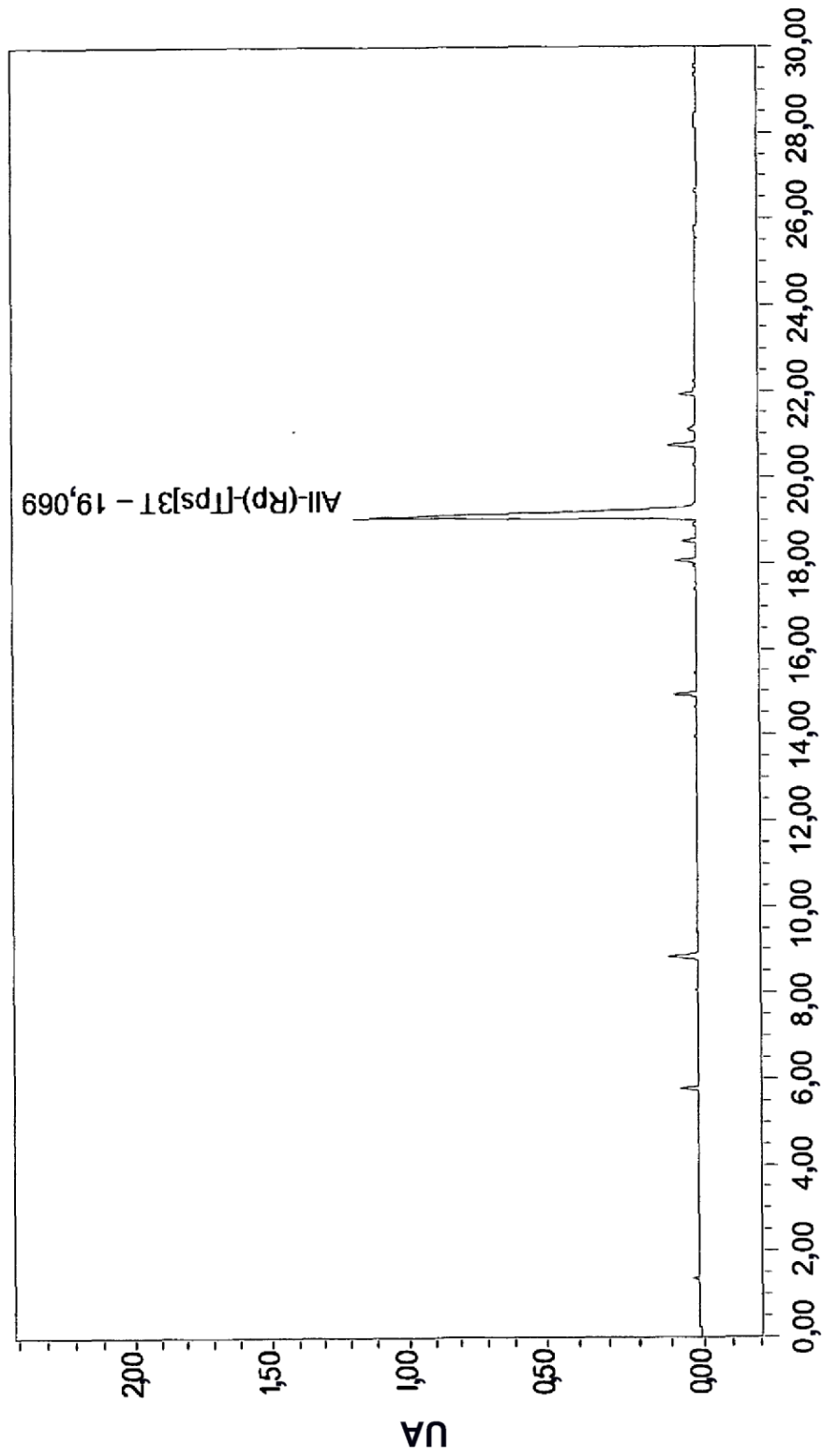
**FIGURA 31^**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp, Sp, Rp)- [TPs]3T



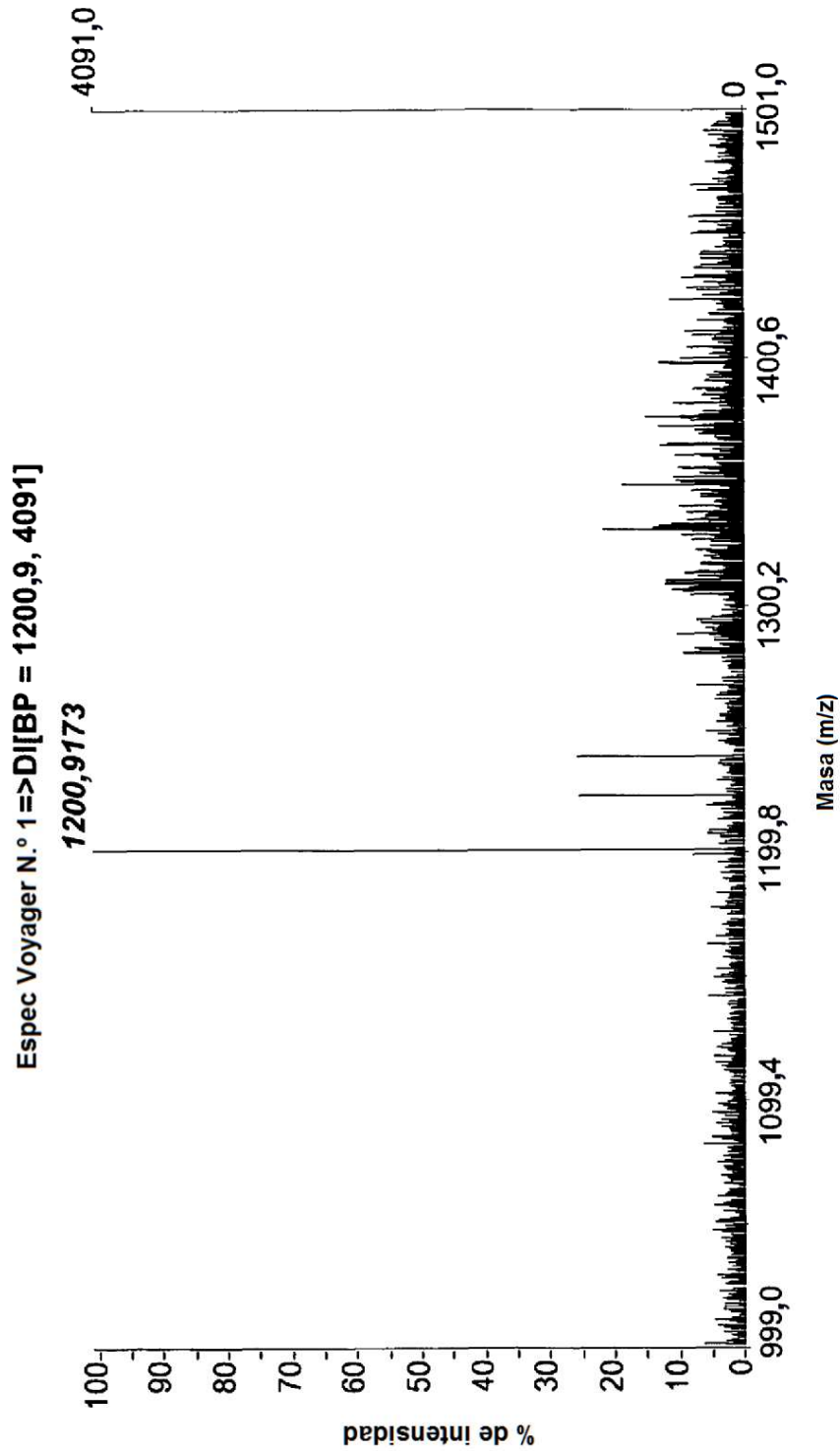
**FIGURA 31B**  
Espectro de EM-MALDI TOF de  $(R_P, S_P, R_P)$ -[TPs]<sub>3</sub>T



**FIGURA 32A**  
Perfil de UPLC® en bruto de All-(R<sub>p</sub>)-[TPS]<sub>3</sub>T



**FIGURA 32B**  
Espectro de EM-MALDI TOF de  $\text{AlI}-(R_p)-[\text{TPS}]_3\text{T}$



**FIGURA 33A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-9 $\mu$ MU

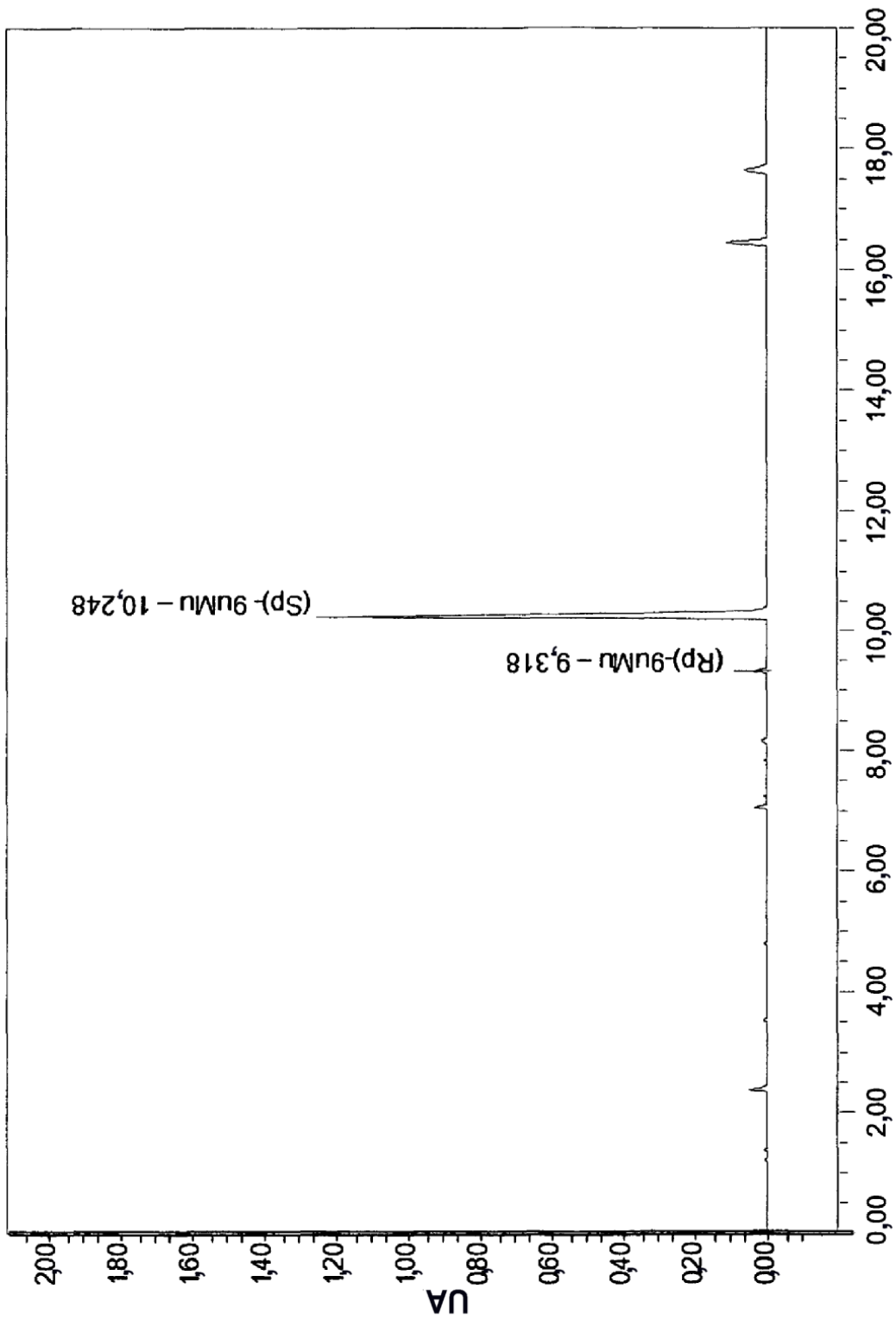
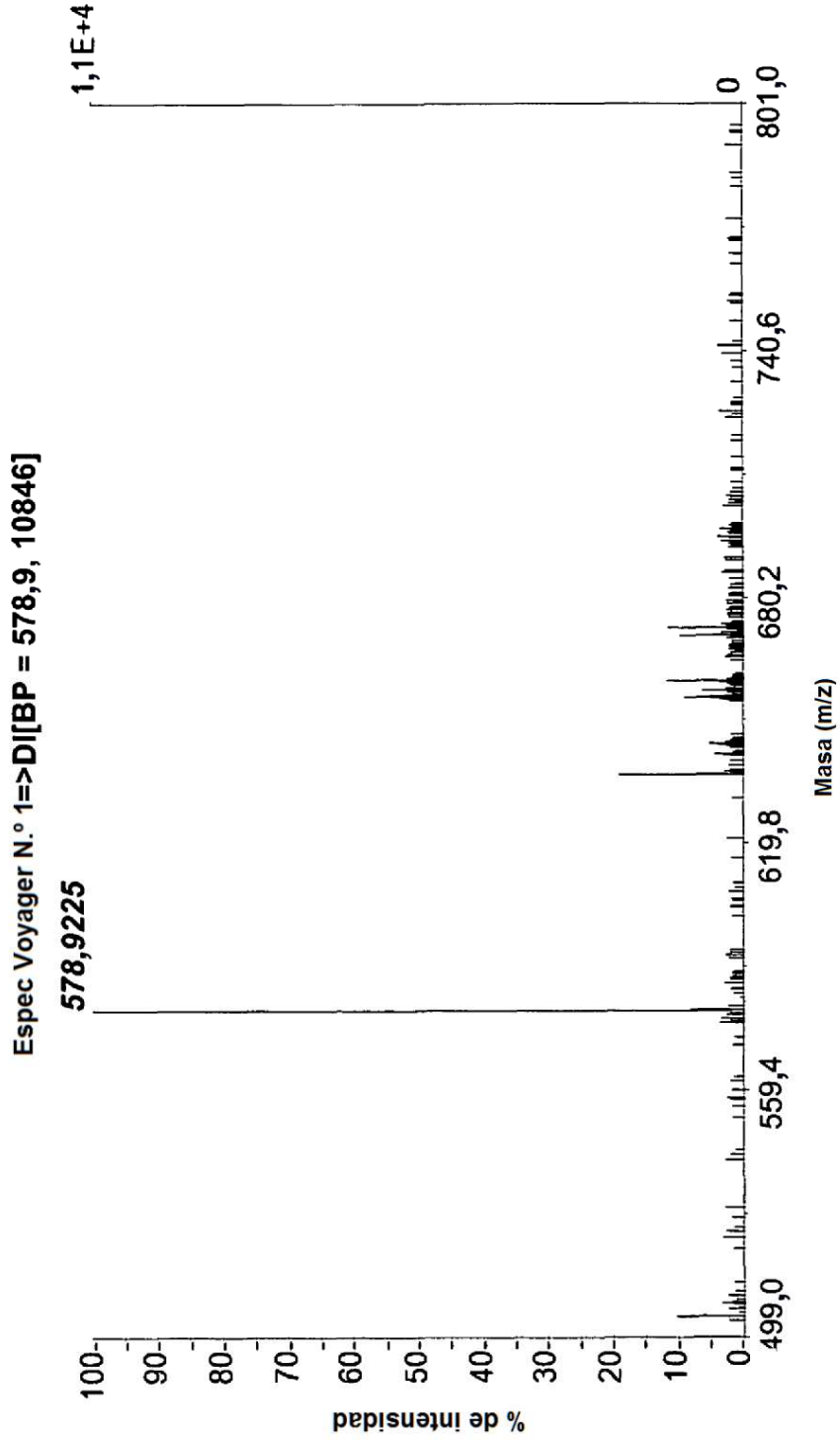


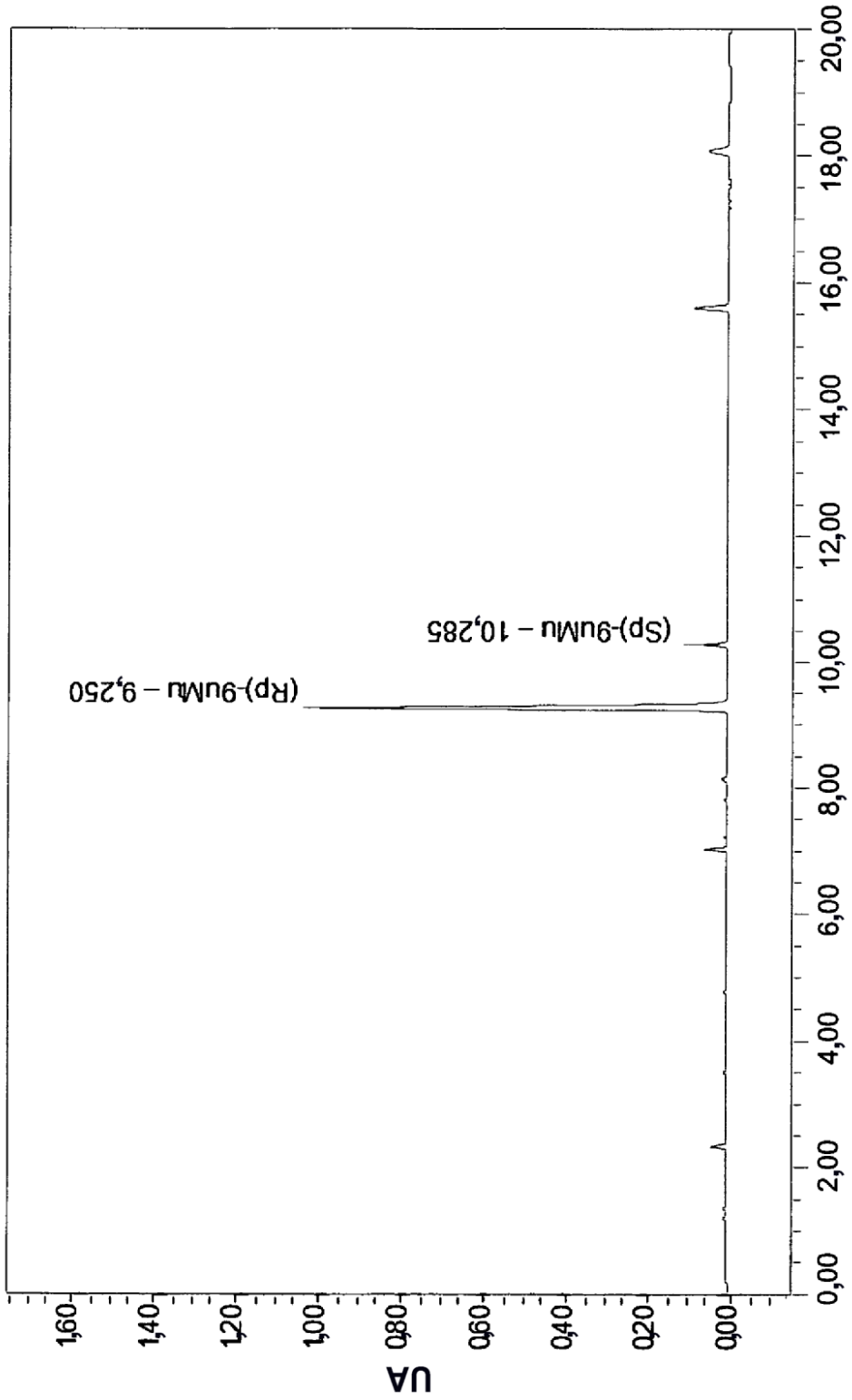
FIGURA 33B

Espectro de EM-MALDI TOF de (Sp)-9u<sub>MU</sub>

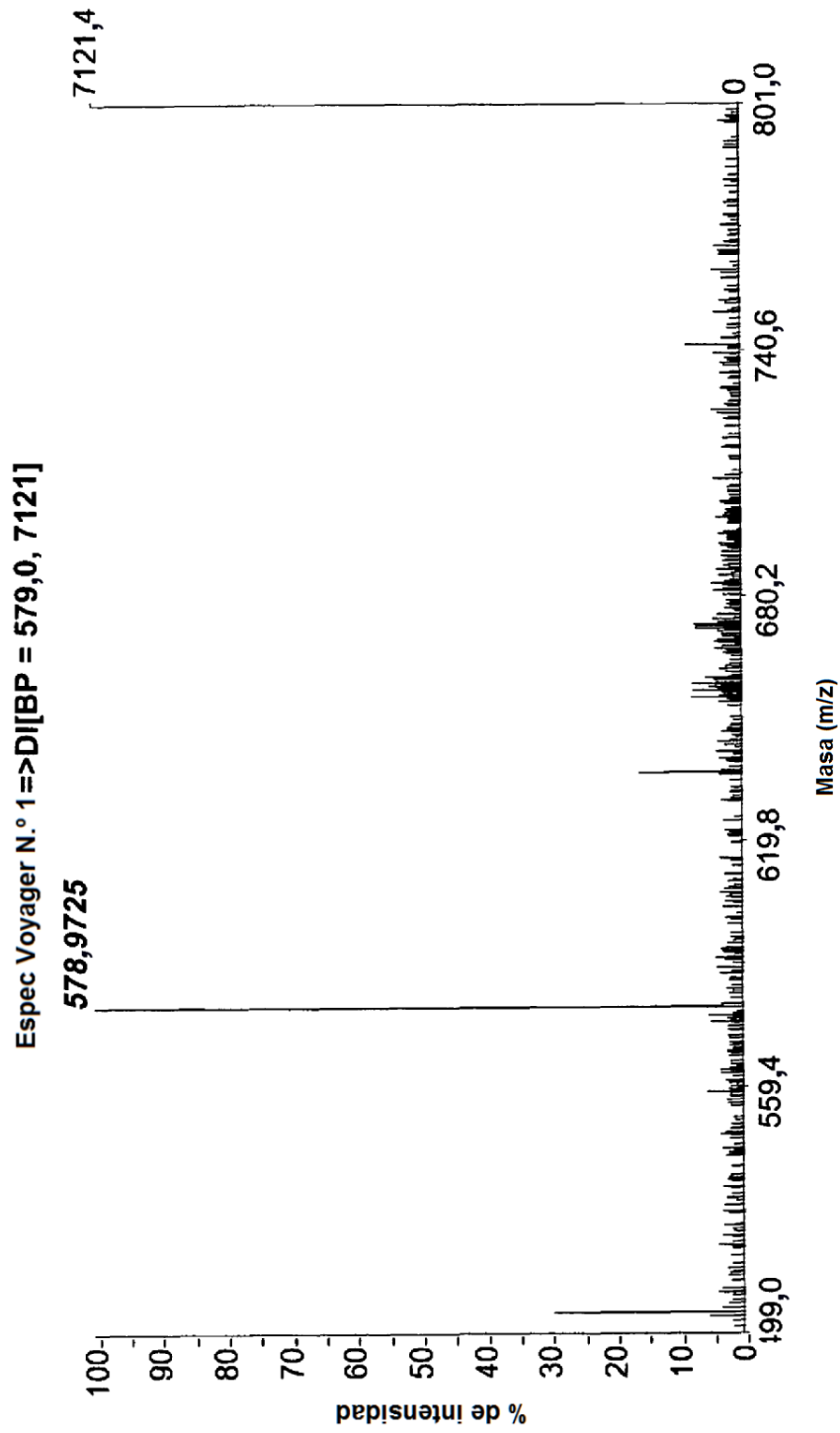




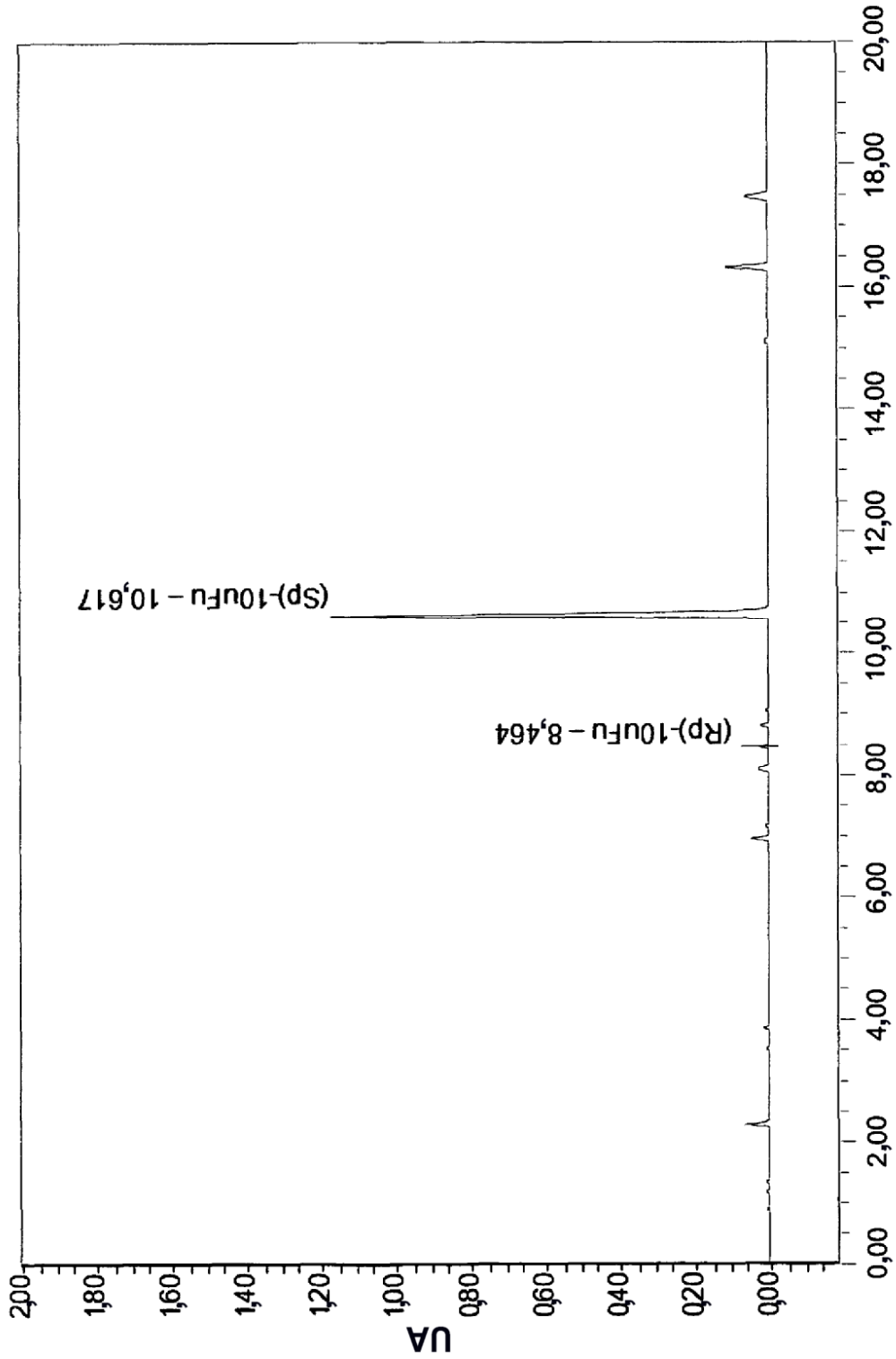
**FIGURA 34A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-9uMu



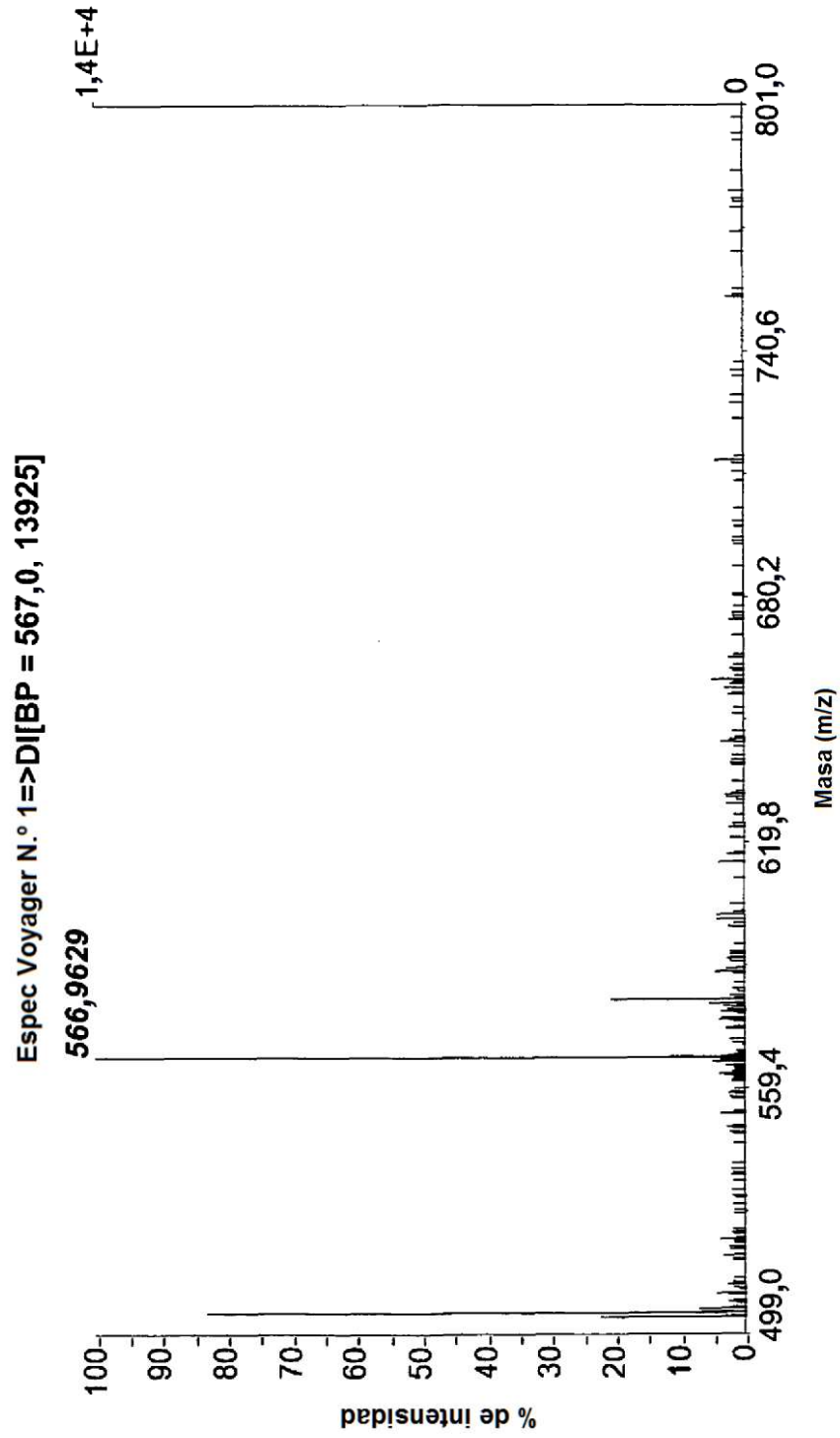
**FIGURA 34B**  
Espectro de EM-MALDI TOF de (R<sub>p</sub>)-9u<sub>MU</sub>



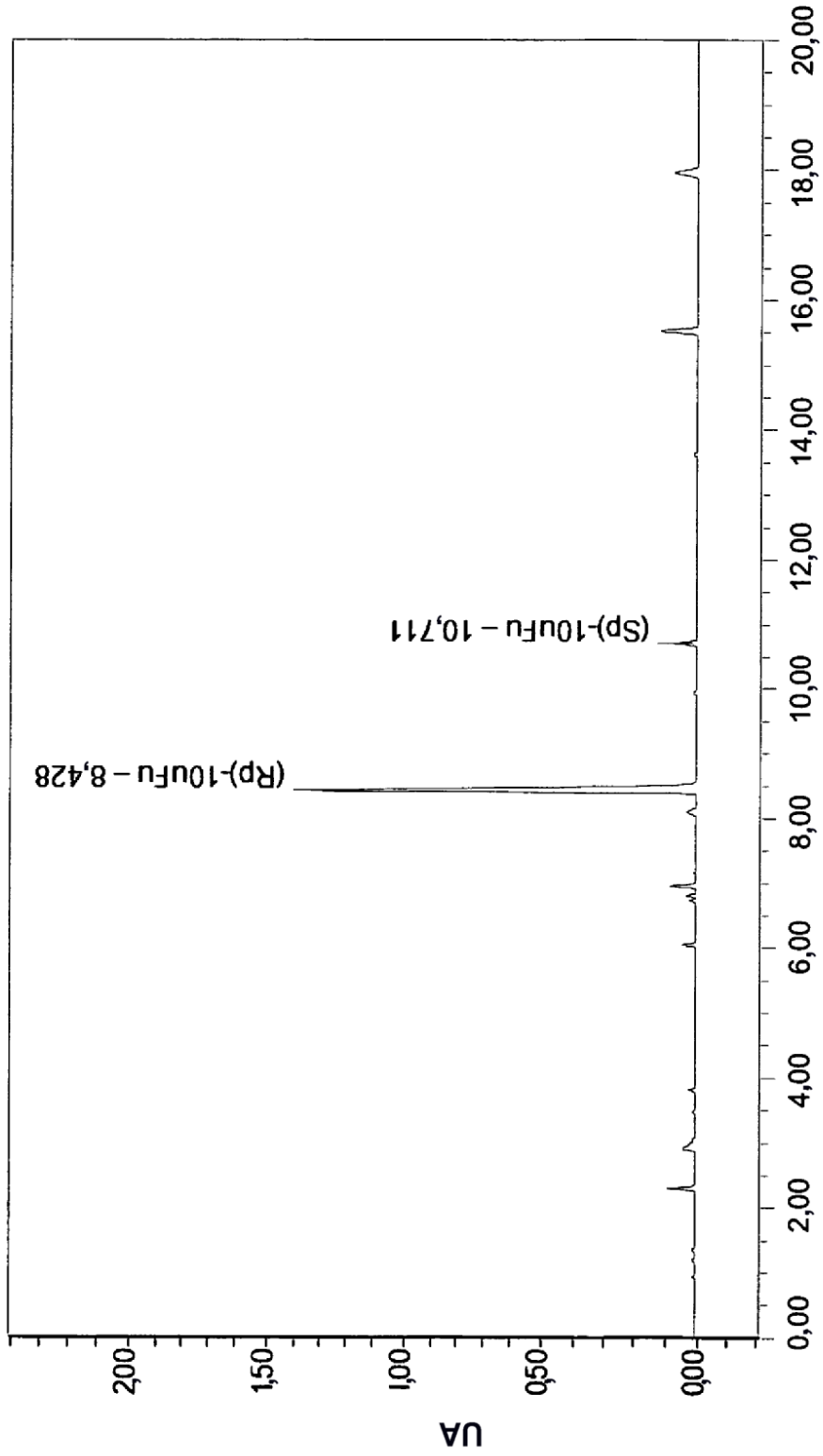
**FIGURA 35A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Sp)-10uFu



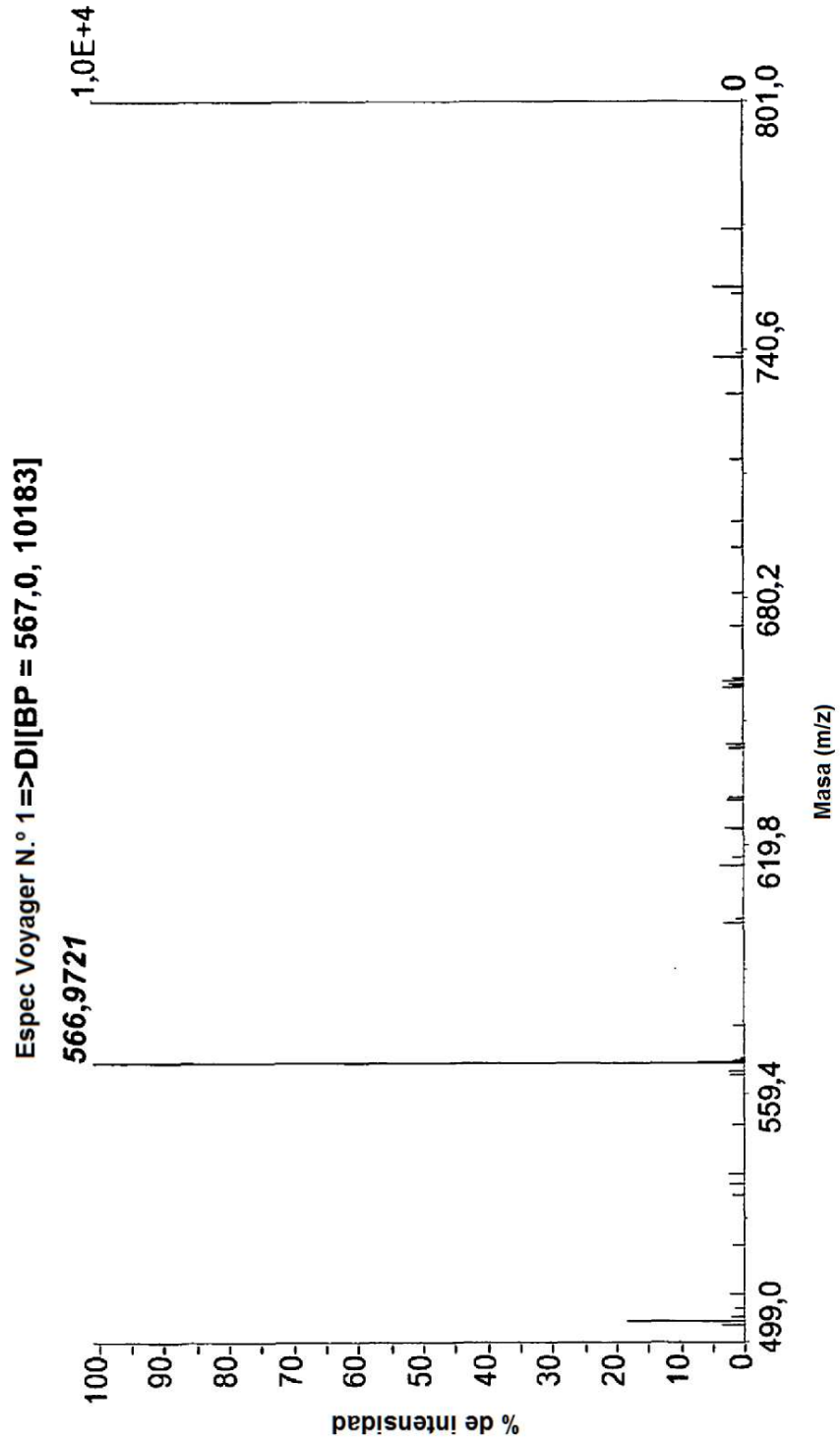
**FIGURA 35B**  
Espectro de EM-MALDI TOF de (S<sub>P</sub>)-10u<sub>F</sub>U



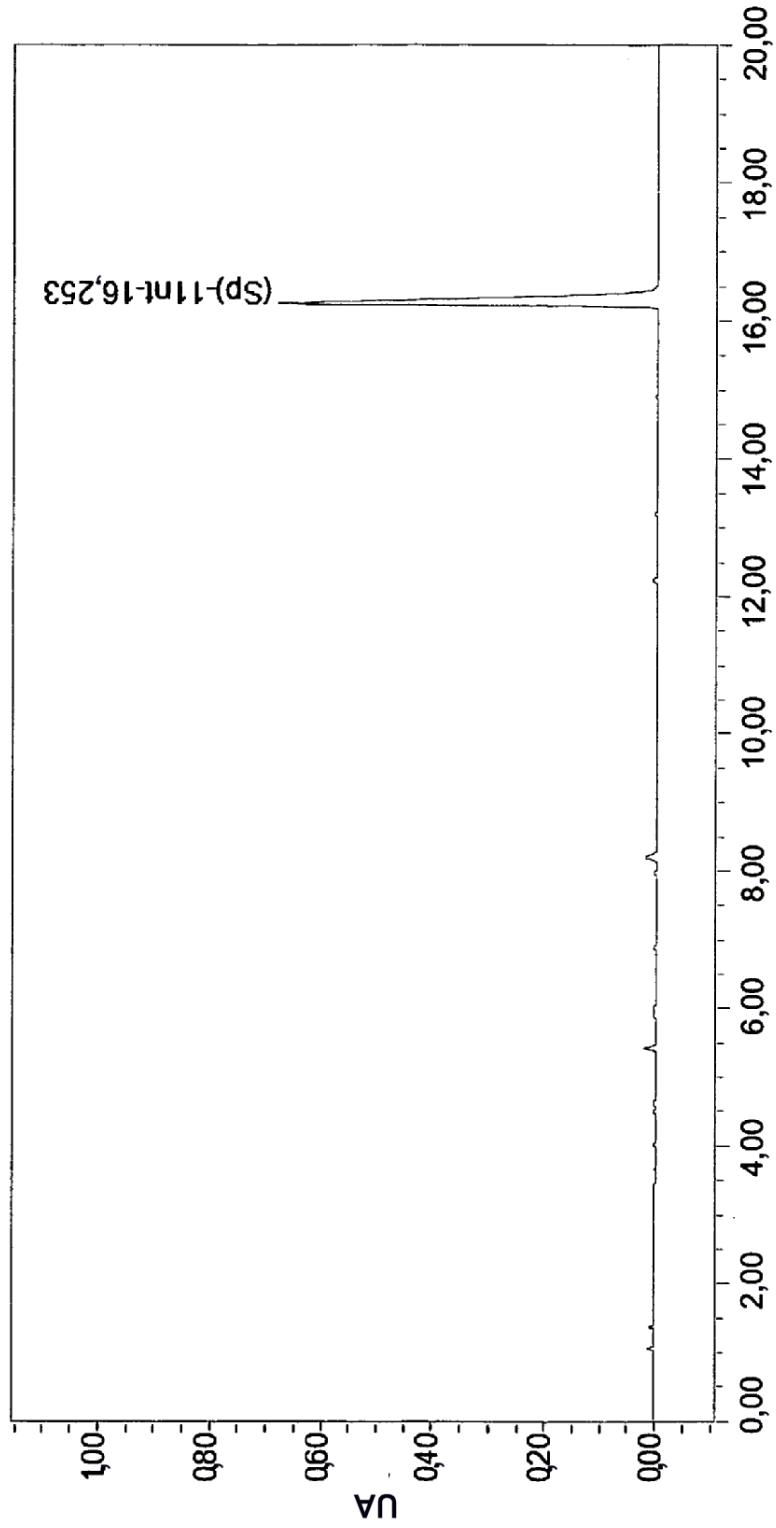
**FIGURA 36A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (Rp)-10uFu



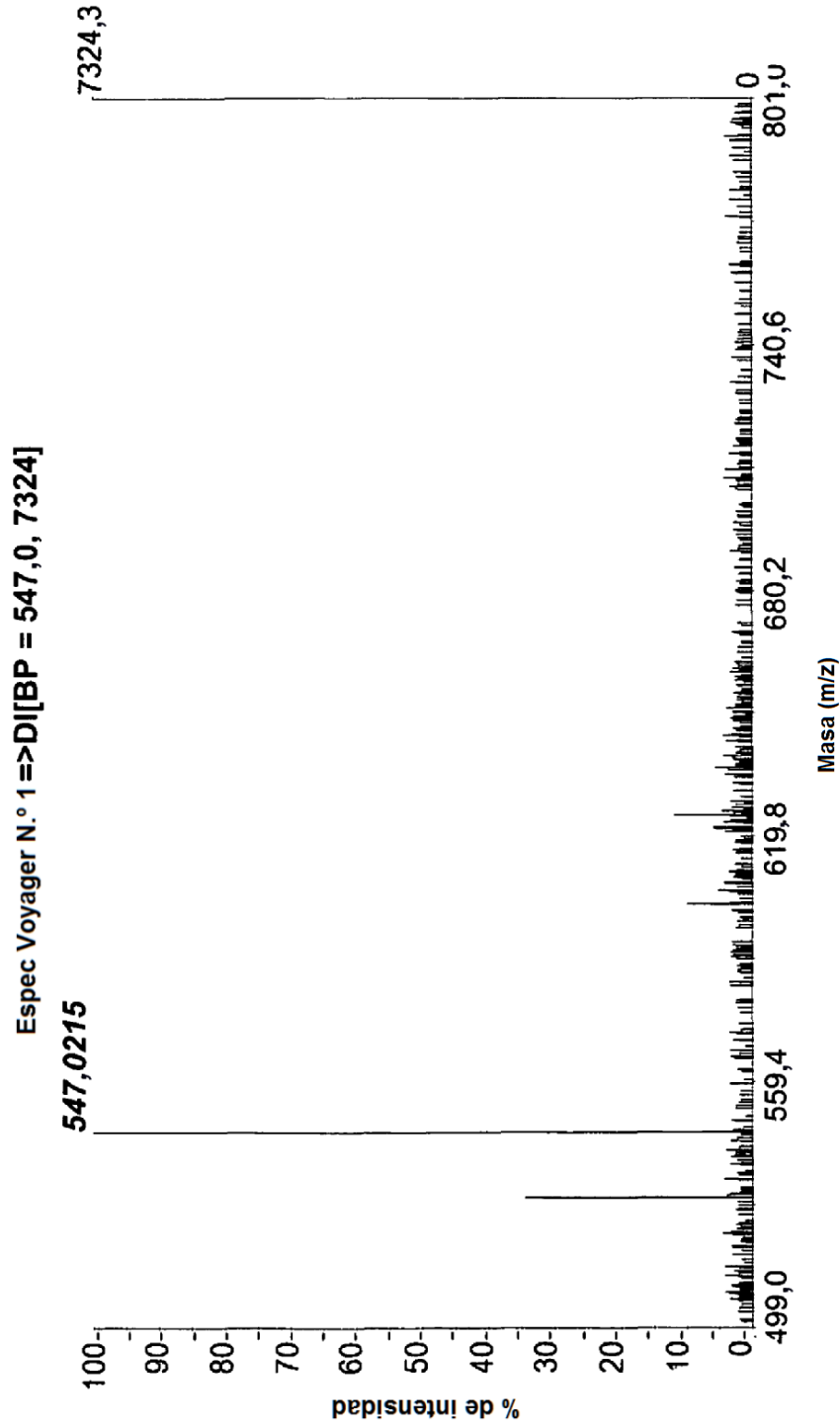
**FIGURA 36B**  
Espectro de EM-MALDI TOF de (R<sub>p</sub>)-10u<sub>F</sub>u



**FIGURA 37A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (S<sub>p</sub>)-11nt

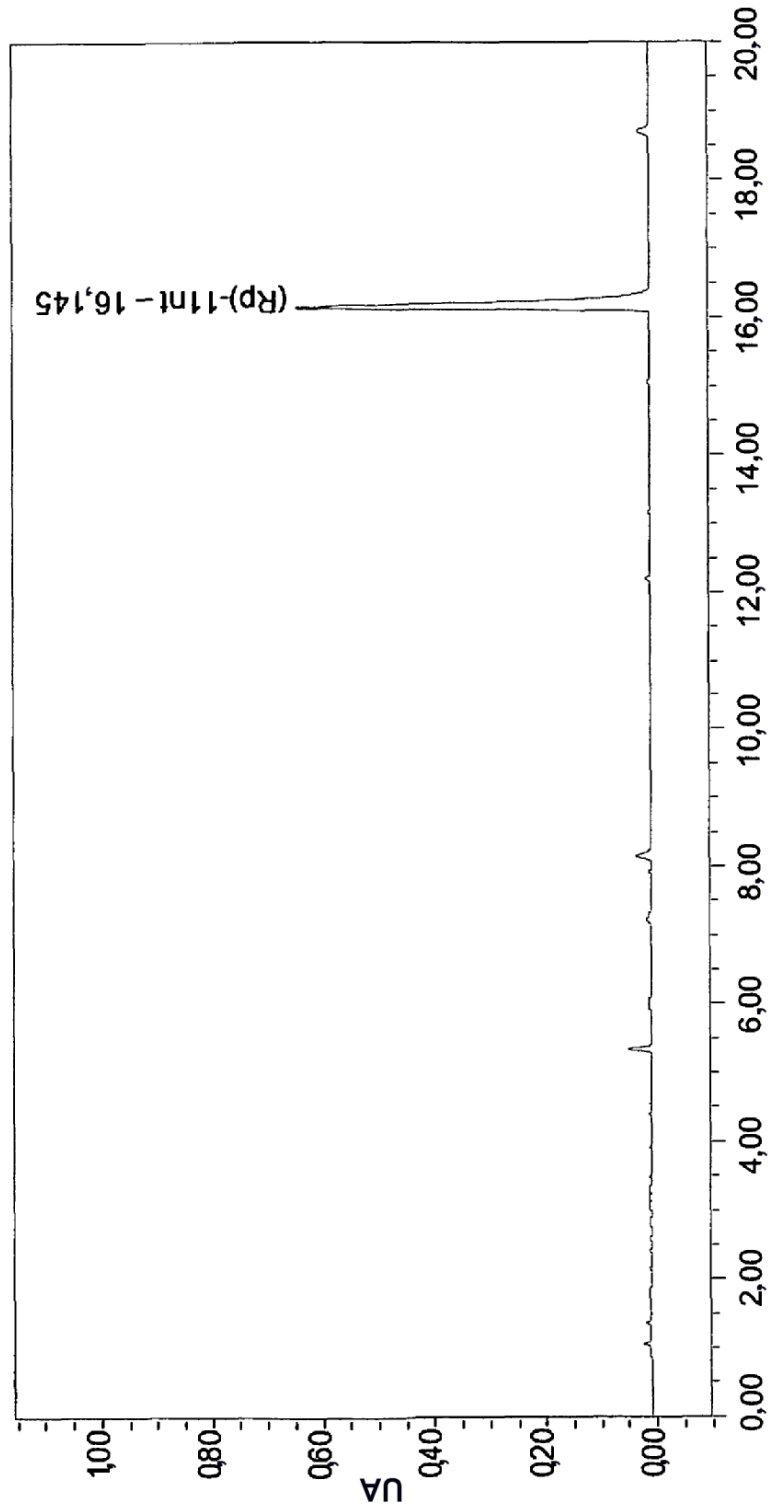


**FIGURA 37B**  
Espectro de EM-MALDI TOF de (S<sub>P</sub>)-11nt





**FIGURA 38A**  
Perfil de UPLC® en bruto de (R<sub>p</sub>)-11nt



**FIGURA 38B**  
Espectro de EM-MALDI TOF de (R<sub>p</sub>)-11nt

