

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 716**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/06** (2006.01)

**C07H 19/16** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2013 PCT/JP2013/075370**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14046212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2013 E 13838365 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2899197**

54 Título: **Oligonucleótido y nucleósido artificial en puente con guanidina**

30 Prioridad:

**21.09.2012 JP 2012208906**  
**07.02.2013 JP 2013022360**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2017**

73 Titular/es:

**OSAKA UNIVERSITY (100.0%)**  
**1-1 Yamadaoka**  
**Suita-shi, Osaka 565-0871, JP**

72 Inventor/es:

**OBIKA, SATOSHI;**  
**KOTOBUKI, YUTARO y**  
**WAKI, REIKO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 622 716 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**

Oligonucleótido y nucleósido artificial en puente con guanidina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nucleósidos y oligonucleótidos artificiales, y se refiere más específicamente a nucleósidos y oligonucleótidos artificiales en puente con guanidina.

Antecedentes de la técnica

10 Ejemplos de métodos para tratar enfermedades utilizando fármacos de ácido nucleico incluyen terapias antisentido, terapias antigénicas, terapias basadas en aptámeros, terapias basadas en ARNip, y similares. De éstos, las terapias antisentido son aproximaciones para tratar o prevenir enfermedades, que implican la inhibición de un proceso de traducción de ARN patógenos introduciendo externamente oligonucleótidos (hebras antisentido) que son complementarios a ARNm asociados a enfermedades para formar hebras dobles. Las terapias basadas en ARNpi son similares a las terapias antisentido, implicando la inhibición de la traducción de ARNm a proteínas mediante la administración de ARN de doble hebra en un cuerpo vivo. Mientras tanto, las terapias antigénicas suprimen la transcripción de ADN a ARN introduciendo externamente oligonucleótidos formadores de triplex correspondientes a sitios de ADN que han de transcribirse en ARN patógenos. Dado que los aptámeros son moléculas de ácido nucleico cortas (oligonucleótidos), funcionan como unidos a componentes biológicos tales como proteínas asociadas a la enfermedad.

20 Aunque se han desarrollado diversos ácidos nucleicos artificiales como materiales para tales fármacos de ácido nucleico, todavía no se ha encontrado ninguna molécula ideal. Ejemplos de los materiales desarrollados para fármacos de ácido nucleico hasta la fecha incluyen oligonucleótido (S-oligo) de fosforotioato (S-PO<sub>3</sub>), ácido nucleico 2',4'- en puente (BNA)/ácido nucleico 2',4'- bloqueado (LNA) (Documentos de patente 1 a 4 y Documentos no de patente 1 a 4), y similares. S-oligo está comercialmente disponible en los Estados Unidos como un fármaco antisentido para citomegalovirus. S-oligo tiene una alta resistencia a la nucleasa, pero es problemática y necesita mejoras en cuanto a que su afinidad de unión a las hebras de ácido nucleico diana es baja. 2',4'-BNA/LNA desarrollado hasta la fecha tiene una alta afinidad de unión a las hebras de ácido nucleico diana, y proporciona las moléculas más prometedoras como los materiales para los futuros fármacos de ácido nucleico. Sin embargo, todavía hay margen de mejora en que la resistencia a la nucleasa no es suficiente y la estabilidad en un cuerpo vivo es pobre.

Lista de citas bibliográficas

30 Literatura de Patentes

Literatura de Patente 1: WO 98/39352

Literatura de Patente 2: WO 2005/021570

Literatura de Patente 3: WO 2003/068795

Literatura de Patente 4: WO 2011/052436

35 Literatura de No Patente

Literatura de No Patente 1: C. Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, Vol. 97, No. 10, pp.5633-5638

Literatura de No Patente 2: Y. Hari et al., Bioorg. Med. Chem., 2006, Vol. 14, pp.1029-1038

Literatura de No Patente 3: K. Miyashita et al., Chem. Commun., 2007, pp.3765-3767

Literatura de No Patente 4: S.M.A. Rahman et al, J. Am. Chem. Soc., 2008, Vol., 130, No. 14, pp.4886-4896

40 Literatura de No Patente 5: M. Kuwahara et al., Nucleic Acids Res., 2008, Vol. 36, No. 13, pp.4257-4265

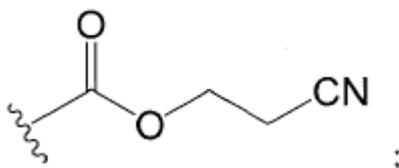
Literatura de No Patente 6: S. Obika et al., Bioorg. Med. Chem., 2001, Vol. 9, pp.1001-1011

En J. Synth. Org. Chem., 57, 11, 1999, 969-980, Takeshi Imanishi describe la síntesis y el análisis conformacional de diversos análogos de nucleósidos bicíclicos. Éstos se introdujeron en oligonucleótidos para proporcionar candidatos para moléculas antisentido/antigénico.



R<sup>1</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo protector para un grupo amino, o

[Producto químico 2]



y

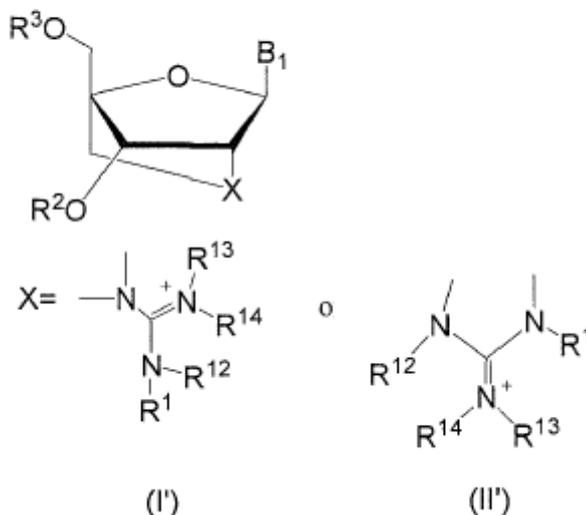
- 5 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo protector para un grupo hidroxilo en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener una cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$  y que puede tener un heteroátomo, un grupo aralquilo que tiene una unidad estructural arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$  y que puede tener un heteroátomo, un grupo acilo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$ , un grupo sililo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$ , un grupo fosfato que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$ , un grupo fosfato protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, o -P(R<sup>4</sup>)R<sup>5</sup> (en donde R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> cada uno independientemente representan un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo amino, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, un grupo alquiltio C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, un grupo cianoalcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y/o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>)).

- 20 En una realización, en la fórmula I o II anterior, B<sub>1</sub> representa un grupo 6-aminopurina-9-ilo, un grupo 2,6-diaminopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-bromopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-hidroxipurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-metoxipurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-cloropurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2,6-dimetoxipurina-9-ilo, un grupo 2,6-dicloropurina-9-ilo, un grupo 6-mercaptipurina-9-ilo, un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-fluoro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-cloro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-metoxi-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-mercapto-1, 2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, o un grupo 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.

En una realización, en la fórmula I o II anterior, B<sub>1</sub> representa un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.

- 30 La presente invención también proporciona un oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representadas por la fórmula I' o II' a continuación o una sal farmacológicamente aceptable del mismo:

[Producto químico 3]

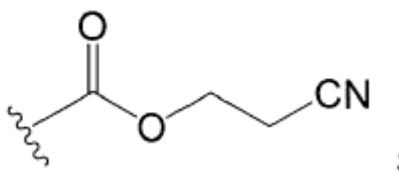


5

(en donde B<sub>1</sub> representa un grupo purina-9-ilo o un grupo 2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados de un grupo α, en donde el grupo α consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquilo lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo alcoxi lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquiltio lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo amino, un grupo alquilamino lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo amino protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, y un átomo de halógeno;

R<sup>1</sup>, R<sup>12</sup>, y R<sup>13</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo protector para un grupo amino, o

[Producto químico 4]



10

R<sup>14</sup> representa un átomo de hidrógeno; y

15

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo protector para un grupo hidroxilo en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α y que puede tener un heteroátomo, un grupo aralquilo que tiene una unidad estructural arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo acilo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo sililo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo fosfato que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo fosfato protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, o -P(R<sup>4</sup>)R<sup>5</sup> (en donde R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> cada uno independientemente representan un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo amino, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, un grupo alquiltio C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, un grupo cianoalcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y/o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>)).

25

En una realización, en la fórmula I' o II' anterior, B<sub>1</sub> representa un grupo 6-aminopurina-9-ilo, un grupo 2,6-diaminopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-bromopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-hidroxipurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-metoxipurina-9-ilo, un grupo 6-

5 amino-2-cloropurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2,6-dimetoxipurina-9-ilo, un grupo 2,6-dicloropurina-9-ilo, un grupo 6- mercaptopurina-9-ilo, un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-fluoro-1,2-dihidropirimidina- 1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-cloro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-metoxi-1, 2-dihidropirimidina- 1-ilo, un grupo 2-oxo-4-mercapto-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, o un grupo 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.

En una realización, en la fórmula I' o II' anterior, B<sub>1</sub> representa un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.

#### Efectos de la invención

10 La presente invención puede proporcionar una molécula de ácido nucleico para un oligonucleótido que tiene una elevada afinidad de unión y una alta especificidad para un ácido nucleico diana y que muestra una alta resistencia a la nucleasa.

#### Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 es un gráfico que muestra un cambio en el tiempo en el porcentaje de oligonucleótidos sin reaccionar cuando diversos oligonucleótidos que tienen la secuencia 5'-d(TTTTTTTXT)-3' se trataron con 3' exonucleasa.

La figura 2 es un gráfico que muestra un cambio en el tiempo en el porcentaje de oligonucleótidos sin reaccionar cuando se trataron diversos oligonucleótidos que tienen la secuencia 5'-d(TTTTTTTTX)-3' con 3' exonucleasa.

20 La figura 3 es un gráfico que muestra las curvas de T<sub>m</sub> de un análogo de oligonucleótido que contiene un ácido nucleico artificial en puente con guanidina y un oligonucleótido que contiene un LNA, con respecto a las hebras diana de ADN que tienen una cadena totalmente complementaria (coincidencia completa) y hebras diana de ADN que tienen apareamiento erróneo de base única (apareamiento erróneo).

25 La figura 4 muestra microfotografías de penetración celular del compuesto 57 (A a D) y del compuesto 61 (E a H) en células HuH-7: donde A y E son imágenes de contraste de fase; B y F son imágenes de fluorescencia utilizando Alexa Fluor 488 (oligonucleótidos); C y G son imágenes de fluorescencia de Hoechst 33342 (núcleos); y D y H son imágenes de fluorescencia utilizando LysoTracker (lisosomas).

La figura 5 muestra microfotografías de penetración celular del compuesto 57 en células HuH-7, mostrando fotografías (A a D) obtenidas agrandando la región indicada por la flecha en la figura 4B, en las Figs. 4A a 4D.

#### Modos para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, se definirán los términos utilizados en esta memoria descriptiva.

30 En esta memoria descriptiva, el término "grupo alquilo lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>" se refiere a cualquier grupo alquilo lineal con 1 a 6 átomos de carbono, y ejemplos específicos de los mismos incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo *n*-propilo, un grupo *n*-butilo, un grupo *n*-pentilo y un grupo *n*-hexilo.

35 En esta memoria descriptiva, el término "grupo alcoxi lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>" abarca un grupo alcoxi que tiene cualquier grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Ejemplos de los mismos incluyen un grupo metoxi, un grupo etoxi y un grupo *n*-propoxi.

En esta memoria descriptiva, el término "grupo alquiltio lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>" abarca un grupo alquiltio que tiene cualquier grupo alquilo lineal con 1 a 6 átomos de carbono. Ejemplos de los mismos incluyen un grupo metiltio, un grupo etiltio y un grupo *n*-propiltio.

40 En esta memoria descriptiva, el término "grupo alquilamino lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>" abarca un grupo amino que tiene uno cualquiera del grupo alquilo lineal con 1 a 6 átomos de carbono o cualquiera de dos grupos alquilo lineales idénticos o diferentes con 1 a 6 átomos de carbono. Ejemplos de los mismos incluyen un grupo metilamino, un grupo dimetilamino, un grupo etilamino, un grupo metiletilamino y un grupo dietilamino.

45 En esta memoria descriptiva, el término "grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo" abarca cualquier grupo alquilo lineal con 1 a 7 átomos de carbono, cualquier grupo alquilo ramificado con 3 a 7 átomos de carbono que tiene cadenas ramificadas idénticas o diferentes, cualquier grupo alquilo cíclico con 3 a 7 átomos de carbono y cualquier combinación de los mismos con 4 a 7 átomos de carbono. Ejemplos de cualquier grupo alquilo lineal con 1 a 7 átomos de carbono incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo *n*-propilo, un grupo *n*-butilo, un grupo *n*-pentilo, un grupo *n*-hexilo y un grupo *n*-heptilo. Ejemplos de cualquier grupo alquilo ramificado con 3 a 7 átomos de carbono que tienen cadenas ramificadas idénticas o diferentes incluyen un grupo isopropilo, un grupo

isobutilo, un grupo *tert*-butilo y un grupo isopentilo. Ejemplos de cualquier grupo alquilo cíclico con 3 a 7 átomos de carbono incluyen un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo y un grupo ciclohexilo.

5 En esta memoria descriptiva, el término "grupo alquenilo C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo" abarca cualquier grupo alquenilo lineal con 2 a 7 átomos de carbono, cualquier grupo alquenilo ramificado con 2 a 7 átomos de carbono, cualquier grupo alquenilo cíclico con 3 a 7 átomos de carbono, y cualquier combinación de los mismos con 4 a 7 átomos de carbono. Ejemplos de cualquier grupo alquenilo lineal con 2 a 7 átomos de carbono incluyen un grupo etenilo, un grupo 1-propenilo, un grupo 2-propenilo, un grupo 1-butenilo, un grupo 2-butenilo, un grupo 1-pentenilo, un grupo 2-pentenilo, un grupo 3-pentenilo, un grupo 4-pentenilo y un grupo 1-hexenilo. Ejemplos de cualquier grupo alquenilo ramificado con 3 a 7 átomos de carbono incluyen un grupo isopropenilo, un grupo 1-metil-1-propenilo, un grupo 1-metil-2-propenilo, un grupo 2-metil-1-propenilo, un grupo 2-metil-2-propenilo, y un grupo 1-metil-2-butenilo. Ejemplos de cualquier grupo alquenilo cíclico con 3 a 7 átomos de carbono incluyen un grupo ciclobutenilo, un grupo ciclopentenilo y un grupo ciclohexenilo.

15 En esta memoria descriptiva, el término "grupo arilo que puede tener un heteroátomo" abarca cualquier compuesto hidrocarburo aromático con 6 a 12 átomos de carbono que consiste solo en hidrocarburo, y cualquier compuesto heteroaromático que tenga cualquier estructura de anillo con 6 a 12 átomos de carbono en el que uno o más átomos de carbono que forman la estructura de anillo están sustituidos con heteroátomos idénticos o diferentes (por ejemplo, un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre). Ejemplos del compuesto de hidrocarburo aromático con 6 a 12 átomos de carbono que consiste sólo en hidrocarburo incluyen un grupo fenilo, un grupo naftilo, un grupo indenilo y un grupo azulenilo. Ejemplos del compuesto heteroaromático incluyen un anillo de piridina, un anillo de pirrolina, un anillo de quinolina, un anillo de indolina, un anillo de imidazolina, un anillo de purina y un anillo de tiofeno. Ejemplos del anillo de piridina incluyen un anillo de pirimidina, un anillo de piperidina, un anillo de quinolina y un anillo de acridina.

25 En esta memoria descriptiva, el término "grupo aralquilo que tiene una unidad estructural heteroarilo que puede tener un heteroátomo" abarca cualquier compuesto hidrocarburo aromático con 5 a 12 átomos de carbono que consiste solo en hidrocarburo, y cualquier compuesto heteroaromático que tenga cualquier estructura de anillo con 5 a 12 átomos de carbono en los que uno o más átomos de carbono que forman la estructura de anillo están sustituidos con heteroátomos idénticos o diferentes (por ejemplo, átomo de nitrógeno, átomo de oxígeno o átomo de azufre). Ejemplos del término "grupo aralquilo que tiene una unidad estructural heteroarilo que puede tener un heteroátomo" incluyen un grupo bencilo, un grupo fenetilo, un grupo naftilmetilo, un grupo 3-fenilpropilo, un grupo 2-fenilpropilo, un grupo 4-fenilbutilo, un grupo 2-fenilbutilo, un grupo piridilmetilo, un grupo indolilmetilo, un grupo furilmetilo, un grupo tienilmetilo, un grupo pirrolilmetilo, un grupo 2-piridiletilo, un grupo 1-piridiletilo y un grupo 3-tienilpropilo.

35 En esta memoria descriptiva, los ejemplos del término "grupo acilo" incluyen un grupo acilo alifático y un grupo acilo aromático. Ejemplos específicos del grupo acilo alifático incluyen: grupos alquilcarbonilo tales como un grupo formilo, un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo butirilo, un grupo isobutirilo, un grupo pentanoilo, un grupo pivaloilo, un grupo valerilo, un grupo isovalerilo, un grupo isovalerilo, un grupo octanoilo, un grupo nonanoilo, un grupo decanoilo, un grupo 3-metilnonanoilo, un grupo 8-metilnonanoilo, un grupo 3-etiloctanoilo, un grupo 3,7-dimetiloctanoilo, un grupo undecanoilo, un grupo dodecanoilo, un grupo tridecanoilo, un grupo tetradecanoilo, un grupo pentadecanoilo, un grupo hexadecanoilo, un grupo 1-metilpentadecanoilo, un grupo 14-metilpentadecanoilo, un grupo 13,13-dimetiltetradecanoilo, un grupo heptadecanoilo, un grupo 15-metilhexadecanoilo, un grupo octadecanoilo, un grupo 1-metilheptadecanoilo, un grupo nonadecanoilo, un grupo eicosanoilo y un grupo heneicosanoilo; grupos alquilcarbonilo carboxilados tales como un grupo succinilo, un grupo glutarilo y un grupo adipilo; grupos carbonilo sustituidos con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con un átomo de halógeno tal como un grupo cloroacetilo, un grupo dicloroacetilo, un grupo tricloroacetilo, y un grupo trifluoroacetilo; grupos alcóxialquilcarbonilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> tales como un grupo metoxiacetilo; y grupos alquilcarbonilo insaturados tales como un grupo (E)-2-metil-2-butenilo. Ejemplos del grupo acilo aromático incluyen: grupos arilcarbonilo tales como un grupo benzoilo, un grupo  $\alpha$ -naftoilo y un grupo  $\alpha$ -naftoilo; grupos halogenoarilcarbonilo tales como un grupo 2-bromobenzoilo y un grupo 4-clorobenzoilo; grupos arilcarbonilo sustituidos con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> tal como un grupo 2,4,6-trimetilbenzoilo y un grupo 4-toluilo; grupos arilcarbonilo sustituidos con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> tal como un grupo 4-anisoilo; grupos arilcarbonilo carboxilados tales como un grupo 2-carboxibenzoilo, un grupo 3-carboxibenzoilo y un grupo 4-carboxibenzoilo; grupos arilcarbonilo nitrados tales como un grupo 4-nitrobenzoilo y un grupo 2-nitrobenzoilo; grupos arilcarbonilo carbonilados sustituidos con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> tal como un grupo 2-(metoxicarbonil) benzoilo; y grupos arilcarbonilo arilados tales como un grupo 4-fenilbenzoilo.

55 En esta memoria descriptiva, los ejemplos del término "grupo sililo" incluyen: grupos sililo sustituidos con tres grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> tales como un grupo trimetilsililo, un grupo trietilsililo, un grupo isopropildimetilsililo, un grupo *t*-butildimetilsililo, un grupo metildiisopropilsililo, un grupo metil di-*t*-butilsililo, y un grupo triisopropilsililo; y grupos sililo sustituidos con tres grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituidos con uno o dos grupos arilo tales como un grupo difenilmetilsililo, un grupo butildifenilbutilsililo, un grupo difenilisopropilsililo y un grupo fenildisopropilsililo.

En esta memoria descriptiva, los ejemplos del término "átomo de halógeno" incluyen un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo.

En esta memoria descriptiva, no hay ninguna limitación en el término "grupo protector" en "un grupo protector para un grupo amino en la síntesis del ácido nucleico", "un grupo protector para un grupo hidroxilo en la síntesis del ácido nucleico", "un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico", "un grupo fosfato protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico", y "un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico", siempre que pueda proteger de manera estable un grupo amino, un grupo hidroxilo, un grupo fosfato o un grupo mercapto en la síntesis del ácido nucleico. Específicamente, el grupo protector se refiere a aquellos que son estables en condiciones ácidas o neutras y se pueden escindir por métodos químicos tales como hidrogenólisis, hidrólisis, electrólisis y fotólisis. Ejemplos del grupo protector incluyen: un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; un grupo alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; un grupo acilo; un grupo tetrahidropirano y un grupo tetrahidrotiopirano; un grupo tetrahidrofuranilo y un grupo tetrahidrotiofuranilo; un grupo sililo; un grupo metilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; un grupo metilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; un grupo metilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con un átomo de halógeno; un grupo etilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; un grupo etilo sustituido con un átomo de halógeno; un grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo; un grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un átomo de halógeno, y/o un grupo ciano; un grupo carbonilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; un grupo arilo sustituido con un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y/o un grupo nitro; un grupo carbonilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con un grupo sililo sustituido con un átomo de halógeno y/o tres grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; un grupo alquenoiloxycarbonilo; y un grupo aralquenoiloxycarbonilo que puede estar sustituido con un grupo arilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> y/o un grupo nitro.

Ejemplos más específicos del grupo tetrahidropirano o del grupo tetrahidrotiopirano incluyen un grupo tetrahidropirano-2-ilo, un grupo 3-bromotetrahidropirano-2-ilo, un grupo 4-metoxitetrahidropirano-4-ilo, un grupo tetrahidrotiopirano-4-ilo, y un grupo 4-metoxitetrahidrotiopirano-4-ilo. Ejemplos del grupo tetrahidrofuranilo o del grupo tetrahidrotiofuranilo incluyen un grupo tetrahidrofuran-2-ilo y un grupo tetrahidrotiofuran-2-ilo. Ejemplos del grupo metilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> incluyen un grupo metoximetilo, un grupo 1,1-dimetil-1-metoximetilo, un grupo etoximetilo, un grupo propoximetilo, un grupo isopropoximetilo, un grupo butoximetilo y un grupo *t*-butoximetilo. Ejemplos del grupo metilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> incluyen un grupo 2-metoxietoximetilo. Ejemplos del grupo metilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con un átomo de halógeno incluyen un grupo 2,2,2-tricloroetoximetilo, un grupo bis (2-cloroetoxi) metilo. Ejemplos del grupo etilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> incluyen un grupo 1-etoxietilo y un grupo 1- (isopropoxi) etilo. Ejemplos del grupo etilo sustituido con un átomo de halógeno incluyen un grupo 2,2,2-tricloroetilo. Ejemplos del grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo incluyen un grupo bencilo, un grupo  $\alpha$ -naftilmetilo, un grupo  $\beta$ -naftilmetilo, un grupo difenilmetilo, un grupo trifenilmetilo, un grupo  $\alpha$ -naftildifenilmetilo y un grupo 9-antrilmetilo. Ejemplos del "grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo sustituidos con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un átomo de halógeno y/o un grupo ciano" incluyen un grupo 4-metilbencilo, un grupo 2,4,6-trimetilbencilo, un grupo 3,4,5-trimetilbencilo, un grupo 4-metoxibencilo, un grupo 4-metoxifenildifenilmetilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritifenilmetilo, un grupo 2-nitrobencilo, un grupo 4-nitrobencilo, un grupo 4-clorobencilo, un grupo 4-bromobencilo y un grupo 4-cianobencilo. Ejemplos del grupo carbonilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> incluyen un grupo metoxicarbonilo, un grupo etoxicarbonilo, un grupo *t*-butoxicarbonilo y un grupo isobutoxicarbonilo. Ejemplos del "grupo arilo sustituido con un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> y/o un grupo nitro" incluyen un grupo 4-clorofenilo, un grupo 2-fluorofenilo, un grupo 4-metoxifenilo, un grupo 4-nitrofenilo, y un grupo 2,4-dinitrofenilo. Ejemplos del "grupo carbonilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con un grupo sililo sustituido con un átomo de halógeno y/o tres grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>" incluyen un grupo 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo y un grupo 2-trimetilsililetoxicarbonilo. Ejemplos del grupo alquenoiloxycarbonilo incluyen un grupo viniloxycarbonilo y un grupo ariloxycarbonilo. Ejemplos del "grupo aralquenoiloxycarbonilo que puede estar sustituido con un grupo arilo sustituido con un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> y/o un grupo nitro" incluyen un grupo benciloxycarbonilo, un grupo 4-metoxibenciloxycarbonilo, un grupo 3,4-dimetoxibenciloxycarbonilo, un grupo 2-nitrobenciloxycarbonilo y un grupo 4-nitrobenciloxycarbonilo.

Ejemplos del "grupo protector para un grupo hidroxilo en la síntesis del ácido nucleico" incluyen un grupo acilo alifático; un grupo acilo aromático; un grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo; un grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un átomo de halógeno, y/o un grupo ciano; y un grupo sililo. Ejemplos del grupo protector en el "grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico" incluyen: un grupo acilo alifático; un grupo acilo aromático; un grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo; un grupo arilo sustituido con un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y/o un grupo nitro; un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>; y un grupo alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>. Ejemplos del "grupo protector para un grupo amino en la síntesis del ácido nucleico" incluyen un grupo acilo y un grupo benzoilo. Ejemplos del "grupo protector" en el "grupo fosfato protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico" incluyen: un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> y/o un grupo ciano; un grupo aralquilo; un grupo aralquilo sustituido con un grupo arilo sustituido con un grupo nitro y/o un átomo de halógeno; un grupo arilo sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un átomo de halógeno, o un grupo nitro; un grupo 2-cianoetilo; un grupo 2,2,2-tricloroetilo; un grupo bencilo; un grupo 2-clorofenilo; y un grupo 4-clorofenilo. Ejemplos del "grupo protector" en el "grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico" incluyen un grupo acilo alifático, un grupo acilo aromático, y un grupo benzoilo.

5 En esta memoria descriptiva, entre los grupos representados por  $-P(R^4)R^5$  (en donde  $R^4$  y  $R^5$  cada uno independientemente representan un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo amino, un grupo alcoxi  $C_1$  a  $C_5$ , un grupo alquiltio  $C_1$  a  $C_6$ , un grupo cianoalcoxi  $C_1$  a  $C_6$ , o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo  $C_1$  a  $C_6$ ), grupos en los cuales  $R^4$  se puede representar por  $OR^{4a}$  y  $R^5$  se puede representar por  $NR^{5a}$  se denominan como "grupo fosforamidito". Ejemplos del grupo fosforamidito incluyen un grupo representado por la fórmula  $-P(OC_2H_4CN)(N(iPr)_2)$  y un grupo representado por la fórmula  $-P(OCH_3)(N(iPr)_2)$ . En estas fórmulas,  $iPr$  representa un grupo isopropilo.

10 En esta memoria descriptiva, los términos "nucleósido artificial" y "análogo de nucleósido" se refieren a un nucleósido de origen no natural en el cual una base de purina o pirimidina está unida a un azúcar (esto es, un nucleósido que no es un nucleósido de origen natural y que sólo se puede producir artificialmente), y un nucleósido en el cual un anillo heteroaromático o un anillo de hidrocarburo aromático que no es ni purina ni pirimidina y que se puede utilizar en lugar de una base de purina o pirimidina (por ejemplo, no hay limitación particular, pero sus ejemplos incluyen piridona, hidroxibenceno y aminopiridina) está unido a un azúcar.

15 En esta memoria descriptiva, los términos "oligonucleótido artificial" y "análogo de oligonucleótido" se refieren a un derivado de origen no natural de "oligonucleótido" en los cuales 2 a 50 "nucleósidos" o "análogos de nucleósidos" idénticos o diferentes están unidos entre sí a través de enlace fosfodiéster. Ejemplos de tales análogos incluyen: un derivado de azúcar en los cuales se modifica la unidad estructural de azúcar; un derivado de tioato en los cuales la unidad estructural de diéster de fosfato es tioato; un éster en los cuales la unidad estructural fosfato terminal está esterificado; una amida en los cuales el grupo amino de la base de purina está amidado; y un derivado de azúcar en los cuales se modifica la unidad estructural de azúcar.

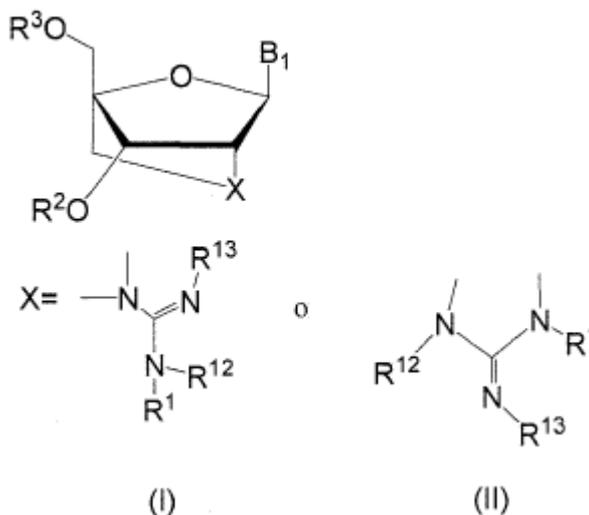
25 En esta memoria descriptiva, el término "una sal de un compuesto representado por la fórmula I o II" se refiere a una sal de un compuesto representado por la fórmula I o II de la presente invención. Ejemplos de dicha sal incluyen: sales metálicas tales como sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio y sales de litio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio y sales de magnesio), sales de aluminio, sales de hierro, sales de zinc, sales de cobre, sales de níquel y sales de cobalto del compuesto representado por la fórmula I o II; sales de amina tales como sales inorgánicas (por ejemplo, sales de amonio) y sales orgánicas (por ejemplo, sales de *t*-octilamina, sales de dibencilamina, sales de morfolina, sales de glucosamina, sales de éster de alquilo de fenilglicina, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de guanidina, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de dicitohexilamina, sales de N,N'-dibenciletilendiamina, sales de cloroprocaína, sales de procaína, sales de dietanolamina, sales de N-bencil-fenetilamina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio, y sales de tris (hidroximetil) aminometano) del compuesto representado por la fórmula I o II; sales de ácidos inorgánicos tales como hidroháluros (por ejemplo, fluorhidrato, clorhidrato, bromhidrato y yodhidrato), nitrato, perclorato, sulfato y fosfato del compuesto representado por la fórmula I o II; sales de ácidos orgánicos tales como alcanosulfonato con 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo metanosulfonato, trifluorometanosulfonato y etanosulfonato), arilsulfonato (por ejemplo, bencenosulfonato y p-toluenosulfonato), acetato, malato, fumarato, succinato, citrato, tartrato, oxalato y maleato del compuesto representado por la fórmula I o II; y sales de aminoácidos tales como sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina, sales de ornitina, glutamato y aspartato del compuesto representado por la fórmula I o II.

40 En esta memoria descriptiva, el término "una sal farmacológicamente aceptable de un oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representadas por la fórmula I' o II'" se refiere a una sal de un análogo de oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representado por la fórmula I' o II' de la presente invención. Ejemplos de tales sales incluyen: sales metálicas tales como sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio y sales de litio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio y sales de magnesio), sales de aluminio, sales de hierro, sales de zinc, sales de cobre, sales de níquel y sales de cobalto de un oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representadas por la fórmula I' o II'; sales de amina tales como sales inorgánicas (por ejemplo, sales de amonio) y sales orgánicas (por ejemplo, sales de *t*-octilamina, sales de dibencilamina, sales de morfolina, sales de glucosamina, sales de éster de alquilo de fenilglicina, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de guanidina, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de dicitohexilamina, sales de N,N'-dibenciletilendiamina, sales de cloroprocaína, sales de procaína, sales de dietanolamina, sales de N-bencil-fenetilamina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio y sales de tris (hidroximetil) aminometano) de un oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representadas por la fórmula I' o II'; sales de ácidos inorgánicos tales como hidroháluros (por ejemplo, fluorhidrato, clorhidrato, bromhidrato e yodhidrato), nitrato, perclorato, sulfato y fosfato de un oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representadas por la fórmula I' o II'; sales de ácido orgánico tales como sulfonato sustituido con alcano con 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, metanosulfonato, trifluorometanosulfonato y etanosulfonato), arilsulfonato (por ejemplo, bencenosulfonato y p-toluenosulfonato), acetato, malato, fumarato, succinato, citrato, tartrato, oxalato, y maleato de un oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representadas por la fórmula I' o II'; y sales de aminoácidos tales como sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina, sales de ornitina, glutamato y aspartato de un oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representadas por la fórmula I' o II'.

A continuación, se describirá en detalle la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, los nucleósidos y nucleótidos artificiales 2',4' en puente, o sus sales, tienen las estructuras representadas por la fórmula I o II a continuación:

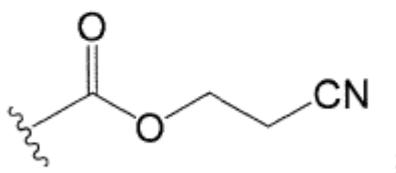
[Producto químico 5]



- 5 (en donde B<sub>1</sub> representa un grupo purina-9-ilo o un grupo 2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados de un grupo α, en donde el grupo α consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquilo lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo alcoxi lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquiltio lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo amino, un grupo alquilamino lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo amino protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, y un átomo de halógeno;
- 10

R<sup>1</sup>, R<sup>12</sup>, y R<sup>13</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo protector para un grupo amino, o

[Producto químico 6]



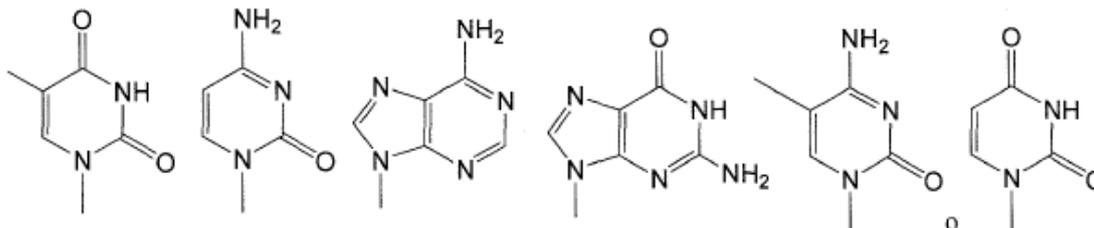
- 15 y, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo protector para un grupo hidroxilo en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α y que puede tener un heteroátomo, un grupo aralquilo que tiene una unidad estructural arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α y que puede tener a heteroátomo, un grupo acilo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo sililo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo fosfato que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo fosfato protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, o -P(R<sup>4</sup>)R<sup>5</sup> (en donde R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> cada uno independientemente representan un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo amino, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, un grupo alquiltio C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, un grupo cianoalcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y/o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>)).
- 20
- 25

5 En la fórmula I o II anterior, B<sub>1</sub> representa una base de purina (esto es, grupo purina-9-ilo) o una base de pirimidina (esto es, grupo 2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo). Estas bases pueden tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados de un grupo α que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo alquilo lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo alcoxi lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo mercapto, un grupo alquiltio lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo amino, un grupo alquilamino lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y un átomo de halógeno.

10 Ejemplos específicos de la base (B<sub>1</sub>) incluyen un grupo 6-aminopurina-9-ilo (grupo adeninilo), un grupo 2,6-diaminopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-bromopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-hidroxipurina-9-ilo (grupo guaninilo), un grupo 6-amino-2-metoxipurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-cloropurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2,6-dimetoxipurina-9-ilo, un grupo 2,6-dicloropurina-9-ilo, un grupo 6-mercaptapurina-9-ilo, un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidina-1-ilo (grupo citosinilo), un grupo 4-amino-2-oxo-5-fluoro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-cloro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-metoxi-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-mercapto-1, 2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-1,2-dihidropirimidina-1-ilo (grupo uracililo), un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo (grupo timinilo), y un grupo 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.

15 De éstos, con el fin de una aplicación segura y eficaz a fármacos de ácido nucleico, B<sub>1</sub> es preferiblemente uno de los compuestos que tienen las fórmulas estructurales representadas de la siguiente manera:

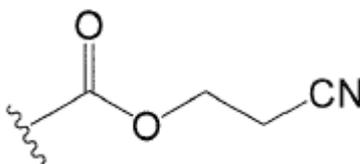
[Producto químico 7]



20 tal como un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo (grupo timinilo), un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidina-1-ilo (grupo citosinilo), un grupo 6-aminopurina-9-ilo (grupo adeninilo), un grupo 2-amino-6-hidroxipurina-9-ilo (grupo guaninilo), un grupo 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, y un grupo 2-oxo-4-hidroxi-1,2-dihidropirimidina-1-ilo (grupo uracililo), y se prefiere particularmente un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo (grupo timinilo). Durante la síntesis de los oligonucleótidos, el grupo hidroxilo es preferiblemente protegido por el grupo protector.

25 En la fórmula I o II anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>12</sup>, y R<sup>13</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo protector para un grupo amino, o

[Producto químico 8]



y preferiblemente representan un átomo de hidrógeno o un grupo metilo. Ejemplos del "grupo protector para un grupo amino" incluyen un grupo acetilo, un grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc), y un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc).

30 En la fórmula I o II anterior, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo protector para un grupo hidroxilo en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo alquenilo C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α y que puede tener un heteroátomo, un grupo aralquilo que tiene una unidad estructural arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α y que puede tener un heteroátomo, un grupo acilo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo sililo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo α, un grupo fosfato que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes



descritas anteriormente contenidas en un oligonucleótido, y se pueden diseñar según sea apropiado de acuerdo con el propósito. A medida que aumenta el número de estructuras, el oligonucleótido tiene una mayor afinidad de unión y una mayor especificidad al ácido nucleico diana, muestra mayores velocidades en la formación de dobles hebras y triples hebras, y muestra una mayor resistencia a las nucleasas. En esta memoria descriptiva, las estructuras de nucleósidos descritas anteriormente contenidas en el nucleósido artificial 2',4' en puente de la presente invención y el oligonucleótido de la presente invención se pueden denominar colectivamente como un "ácido nucleico artificial en puente con guanidina" o un "ácido nucleico en puente con guanidina".

El oligonucleótido que contiene dicha estructura de nucleósido y un análogo del mismo tiene una estructura fija debido a un puente de la unidad estructural de azúcar y, de este modo, son resistentes a ser degradados por diversas nucleasas, y pueden permanecer en un cuerpo vivo durante un largo periodo de tiempo después de la administración. Además, dicho oligonucleótido o un análogo del mismo, con la acción electrostática de la guanidina catiónica existente en el puente de la unidad estructural de azúcar del mismo, por ejemplo, forma un dúplex estable con un ARNm para inhibir la biosíntesis de la proteína patógena, o forma un triplex con un dúplex de ADN en el genoma para inhibir la transcripción en un ARNm. También, permite suprimir la proliferación de un virus que ha infectado un cuerpo vivo.

De acuerdo con lo anterior, se espera que el oligonucleótido y un análogo del mismo sintetizado a partir del nucleósido artificial 2',4' en puente de acuerdo con la presente invención sean útiles como productos farmacéuticos (moléculas antisentido, etc.) para tratar enfermedades mediante la inhibición de la acción de un gen específico, tal como un agente antitumoral o un agente antiviral.

En particular, en las terapias antisentido, tanto la afinidad de unión a ARN de hebra de sentido directo complementario como la resistencia a desoxirribonucleasa in vivo son necesarias. Se sabe que, por lo general, un ácido nucleico en forma de una hebra única tiene constantemente una fluctuación estructural de una unidad estructural de azúcar entre la forma cercana a una unidad estructural de azúcar en un dúplex de ADN y la forma cercana a una unidad estructural de azúcar en un fragmento de ADN-ARN dúplex o un ARN dúplex. Cuando un ácido nucleico monocatenario forma una hebra doble con la hebra de ARN complementario, se fija la estructura de la unidad estructural de azúcar. El nucleósido artificial 2',4' en puente de la presente invención forma fácilmente una hebra doble con una hebra diana de ARN y puede permanecer estable, porque la unidad estructural de azúcar se ha fijado de antemano en el estado de formación de una doble hebra. También se sabe que un ácido nucleico bicatenario se estabiliza con agua hidratada con una estructura en forma de cadena denominada red de moléculas de agua. Puesto que el nucleósido artificial 2',4' en puente de la presente invención contiene guanidina, por ejemplo, se espera que la capacidad de formación de doble hebra se mejore debido a la interacción electrostática y al efecto de hidratación y que se mejore la resistencia enzimática. Además, se espera que, cuando se introduce guanidina en el puente, se fijan las posiciones de los cationes y se potencian la interacción electrostática y el efecto de hidratación. Se espera que el nucleósido artificial 2',4' en puente de la presente invención pueda ser tomado más eficientemente en células y pueda hibridarse más eficientemente con ácidos nucleicos diana, en comparación con ácidos nucleicos de origen natural y ácidos nucleicos artificiales conocidos convencionalmente, debido a que el nucleósido artificial 2',4' en puente tiene carga eléctrica positiva derivada de grupos guanidinio en la molécula. De acuerdo con lo anterior, se espera que el efecto antisentido se mejore y que el tiempo de retención en el cuerpo sea más largo, y, de este modo, se puede reducir la cantidad de dosificación para mejorar los efectos secundarios y reducir los costes.

El oligonucleótido y un análogo del mismo de la presente invención se pueden formular en una preparación parenteral o una preparación liposómica, mediante la adición de una sustancia auxiliar usualmente utilizada en el campo técnico de formulaciones farmacéuticas, tal como un vehículo, un aglutinante, un antiséptico, un estabilizante de oxidación, un desintegrante, un lubricante y un corrector. También, por ejemplo, es posible preparar una preparación tópica tal como una solución, una crema y un ungüento, mediante la adición de un portador farmacéutico usualmente usado en este campo técnico.

#### Ejemplos

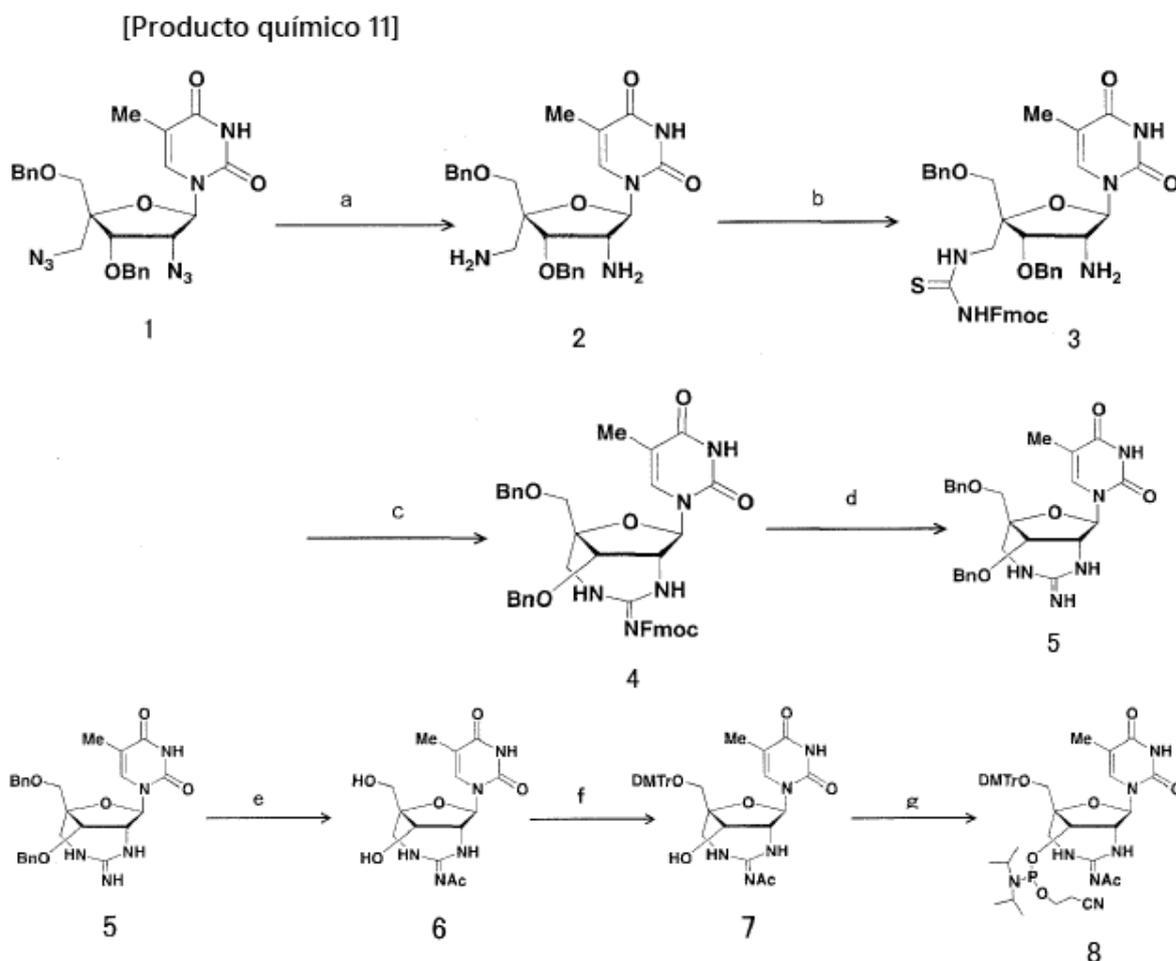
En lo sucesivo, la síntesis del nucleósido artificial 2',4' en puente y un análogo del mismo de la presente invención se describirá con más detalle a modo de ejemplos.

En los siguientes ejemplos, los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno ( $^1\text{H}$ -RMN) se midieron con un JNM-ECS400 (400 MHz) (fabricado por JEOL Ltd.) utilizando tetrametilsilano (0.00 ppm), cloroformo-d (7.26 ppm), y metanol-d<sub>4</sub> (3.30 ppm), como patrón interno. Los patrones de división se expresaron de manera que el singlete, el doblete, el triplete, el multiplete, el cuarteto AB y el doblete de dobletes se abreviaron respectivamente como s, d, t, m, AB y dd. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se midieron con un JNM-ECS400 (100 MHz) utilizando cloroformo-d (77.0 ppm) y metanol-d<sub>4</sub> (49.0 ppm) como patrón interno. La medición de resonancia magnética nuclear de fósforo ( $^{31}\text{P}$ -RMN) se realizó con un JNM-ECS400 (161.8 MHz) (fabricado por JEOL Ltd.) utilizando una solución de ácido fosfórico-óxido de deuterio al 5% (0.00 ppm) como estándar externo. La espectrometría de masas (FAB-MS) se realizó con un JMS-600, un JMS-700, y un JMS-D300 (fabricado por JEOL Ltd.). La cromatografía en sílica gel se realizó utilizando un absorbente PSQ-100B (ave. 0.110

mm) (fabricado por Fuji Silysia producto químico Ltd.), y se realizó una cromatografía de sílica gel instantánea utilizando un absorbente PSQ-60B (ave. 0.060 mm) (fabricado por Fuji Silysia Producto químico Ltd.). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó utilizando un Shimadzu LC-10AT<sub>VP</sub>, un Shimadzu SPD-10A<sub>VP</sub>, y un Shimadzu CTO-10<sub>VP</sub> (fabricado por Shimadzu Corporation). En la HPLC, se utilizó una columna analítica Waters XBridge™ OST C18 2.5 μm (4.6 x 50 mm), y una columna preparativa utilizada fue Waters XBridge™ OST C18 2.5 μm (10 x 50 mm). La medición de T<sub>m</sub> se realizó utilizando un Shimadzu UV-1650B y un Shimadzu UV-1650PC (fabricado por Shimadzu Corporation). La medición de MALDI-TOF-MS se realizó utilizando un Daltonics (marca registrada) Autoflex II TOF/TOF (fabricado por Bruker).

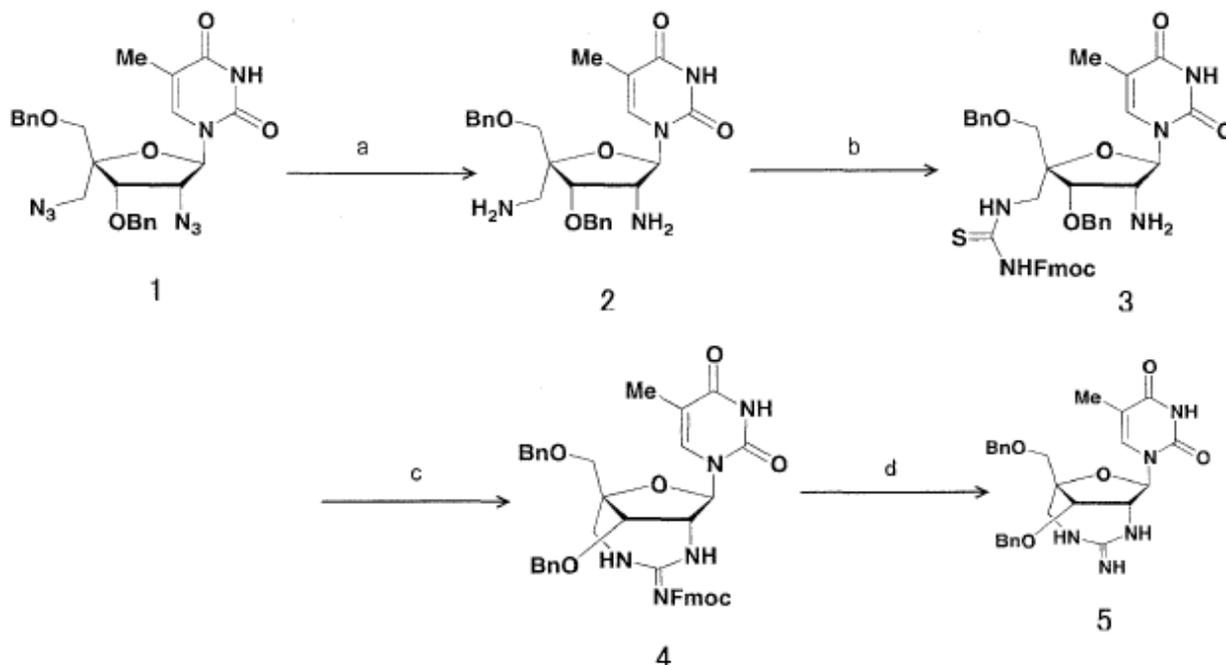
Se utilizaron cloruro de metileno, dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo y piridina como solventes de reacción y bases después de secar sobre hidruro de calcio y de destilar. Como los otros reactivos, los comercialmente disponibles se utilizaron tal cual, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1: Síntesis de análogo de nucleósido (Compuesto 8)



(1) Síntesis del compuesto 5

## [Producto químico 12]



El compuesto 1 se sintetizó en 15 etapas a partir de D-glucosa de acuerdo con el método descrito en Chem. Commun. (Nishida, M. et al., 2010, vol. 46, p. 5283-5285).

5 Se adicionó cloruro de níquel (36 mg, 0.28 mmol) a 50 mL de una solución de metanol que contiene el compuesto 1 obtenido (2.00 mg, 3.86 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, y se adicionó además a esta borohidruro de sodio (600 mg, 15.4 mmol) a 0°C, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Después la mezcla se filtró a través de celite, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía de columna en sílica gel (metanol) para obtener el compuesto 2 (1.47 g, 81%) como un amorfo de color blanco (Etapa a).

10 Los datos de propiedades físicas del compuesto 2 obtenido fueron los siguientes:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.60 (3H, d, J = 1.0 Hz), 2.61, 2.93 (2H, AB, J = 14.0 Hz), 3.54, 3.61 (2H, AB, J = 10.0 Hz), 3.70 (1H, t, J = 6.0 Hz, 9.0 Hz), 4.19 (1H, d, J = 6.0 Hz), 4.58, 4.61 (2H, AB, J = 11.5 Hz), 4.65, 4.81 (2H, AB, J = 11.0 Hz), 5.89 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.30-7.43 (10H, m), 7.53 (1H, d, J = 1.0 Hz).

15 A continuación, se adicionó una solución en diclorometano (4 mL) que contiene isocianato de 9-fluorenilmetoxicarbonyl (350 mg, 1.23 mmol) a 10 mL de solución en diclorometano que contiene el compuesto 2 obtenido (576 mg, 1.23 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno a 0°C, después de lo cual la mezcla se agitó a 0°C, durante 15 minutos. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando agua a 0°C, el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía de columna en sílica gel (cloroformo: metanol = 80:1) para obtener el compuesto 3 (638 mg, 69%) como un sólido de color blanco (Etapa b).

25 Los datos de propiedades físicas del compuesto 3 obtenido fueron los siguientes:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.57 (3H, d, J = 1.0 Hz), 3.57, 3.69 (2H, AB, J = 10.0 Hz), 3.65 (1H, t, J = 7.5 Hz), 3.91, 4.24 (2H, AB, J = 12.0 Hz), 4.16 (1H, d, J = 7.5 Hz), 4.22 (1H, t, J = 7.0 Hz), 4.46 (2H, d, J = 7.0 Hz), 4.53 (2H, s), 4.68, 4.77 (2H, AB, J = 11.0 Hz), 5.88 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.19-7.44 (15H, m), 7.55 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.78 (1H, d, J = 8.0 Hz), 8.12 (1H, s), 8.29 (1H, s), 9.98 (1H, s).

30 A continuación, se adicionó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato (103 mg, 0.54 mmol) a 5 mL de solución en diclorometano que contiene el compuesto 3 obtenido (335 mg, 0.45 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 6 horas. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando agua a 0°C, el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. El producto en bruto obtenido se purificó por

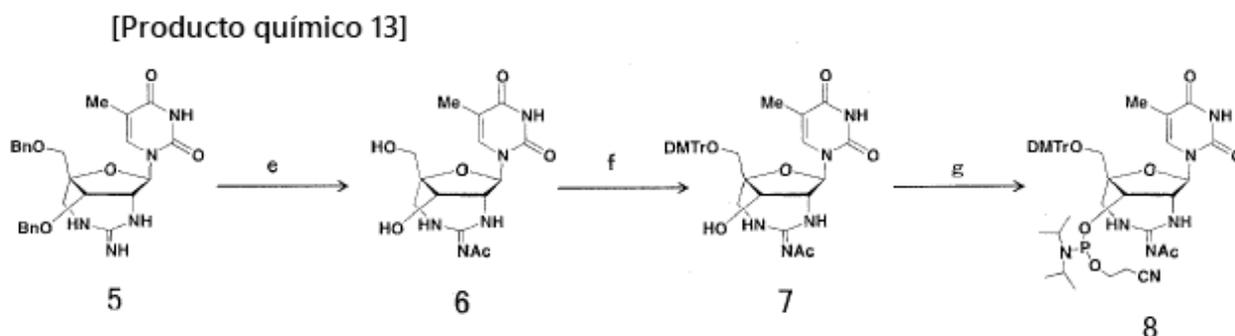
5 cromatografía de columna en sílica gel (cloroformo: metanol = 80:1) para obtener el compuesto 4 (268 mg, 83%) como un sólido de color blanco amarillento (Etapa c).

Los datos de propiedades físicas del compuesto 4 obtenido fueron los siguientes:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.35 (3H, s), 3.11, 3.45 (2H, AB,  $J = 13.5$  Hz), 3.69, 3.83 (2H, AB,  $J = 11.0$  Hz), 4.28 (2H, d,  $J = 6.5$  Hz), 4.30 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 4.32 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz), 4.38 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 4.48, 4.71 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 4.51, 4.57 (2H, AB,  $J = 11.0$  Hz), 5.91 (1H, s), 7.23-7.85 (19H, m).

10 Se adicionó dietilamina (2 mL) a 8 mL de solución en diclorometano que contiene el compuesto 4 obtenido (971 mg, 1.36 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 5 horas. A continuación, después de que el solvente se evaporó completamente, el producto obtenido se lavó con hexano para obtener el compuesto 5 (609 mg, 91%) como un sólido de color blanco (Etapa d).

Los datos de propiedades físicas del compuesto obtenido 5 fueron los siguientes:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.37 (3H, s), 3.12, 3.46 (2H, AB,  $J = 14.0$  Hz), 3.60, 3.86 (2H, AB,  $J = 11.0$  Hz), 4.25 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 4.44 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 4.50, 4.71 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 4.51, 4.59 (2H, AB,  $J = 11.0$  Hz), 5.89 (1H, s), 7.24-7.80 (10H, m), 7.89 (1H, s).

(2) Síntesis del compuesto 8



15 Se adicionó trietilamina (0.68 mL, 4.93 mmol) a 12 mL de solución en diclorometano que contiene el compuesto 5 obtenido (551 mg, 1.12 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno a temperatura ambiente, y se adicionó además a este anhídrido acético (0.23 mL, 2.47 mmol) a  $0^\circ\text{C}$ , después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 2 horas. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando solución saturada de bicarbonato de sodio al líquido de reacción a  $0^\circ\text{C}$ , el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. Se adicionó carbonato de potasio (400 mg, 2.89 mmol) a 10 mL de solución de isopropanol que contiene el producto obtenido en bruto (616 mg), después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 6 días. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando agua a  $0^\circ\text{C}$ , el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. Se adicionó hidróxido de paladio sobre carbono (1.40 g) a 10 mL de solución de isopropanol que contiene el producto obtenido en bruto (517 mg) en un flujo de gas de hidrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 26 horas. El solvente del filtrado obtenido filtrando el líquido de reacción se evaporó completamente para obtener el compuesto 6 (319 mg, 80%) como un sólido de color blanco (Etapa e).

Los datos de propiedades físicas del compuesto 6 obtenido fueron los siguientes:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.87 (3H, d,  $J = 1.0$  Hz), 2.21 (3H, s), 3.45, 3.54 (2H, AB,  $J = 14.5$  Hz), 3.71, 3.86 (2H, AB,  $J = 12.0$  Hz), 4.23 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 4.61 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 5.85 (1H, s), 8.10 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz).

35 A continuación, se adicionó cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (630 mg, 1.86 mmol) a 7 mL de solución de piridina que contiene el compuesto 6 obtenido (219 mg, 0.62 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno a  $0^\circ\text{C}$ , después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 20 horas. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando solución saturada de bicarbonato de sodio al líquido de reacción a  $0^\circ\text{C}$ , el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía de sílica gel (cloroformo: metanol = 40: 1  $\rightarrow$  5:1) para obtener el compuesto 7 (267 mg, 66%) como un amorfo de color blanco (Etapa f).

45 Los datos de propiedades físicas del compuesto 7 obtenido fueron los siguientes:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.87 (3H, d,  $J = 1.0$  Hz), 2.21 (3H, s), 3.45, 3.54 (2H, AB,  $J = 14.5$  Hz), 3.71, 3.86 (2H, AB,  $J = 12.0$  Hz), 4.23 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 4.61 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 5.85 (1H, s), 8.10 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz).

- 5 Se adicionó diisopropiletilamina (146 mL, 0.84 mmol) a 2 mL de solución en diclorometano que contiene el compuesto 7 obtenido (131 mg, 0.21 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, y se adicionó además a esta 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita (96  $\mu$ L, 0.43 mmol) a 0°C, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 14 horas. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando solución saturada de bicarbonato de sodio al líquido de reacción a 0°C, el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. El producto en bruto obtenido se purificó mediante reprecipitación utilizando diclorometano y hexano para obtener el compuesto 8 (110 mg, 61%) como un amorfo de color blanco (Etapa g).
- 10 Los datos de propiedades físicas del compuesto 8 obtenido fueron los siguientes:  $^{31}\text{P}$ -RMN (CDC13)  $\delta$ : 149.94, 151.37.

#### Ejemplo 2: Síntesis y purificación de análogo de oligonucleótido

- 15 Utilizando el compuesto 8 obtenido en el ejemplo 1, análogos de oligonucleótido (compuestos 9 a 13: mostrados en la Tabla 1, a continuación) se sintetizaron mediante un sintetizador nS-8 de oligonucleótido ADN/ARN automatizado (fabricado por Gene Design Inc.) con un soporte CPG de escala 0.2  $\mu$ mol. El tiempo de acoplamiento de solución de acetonitrilo (0.1M) que contiene el compuesto 8 se fijó en 16 minutos, y las otras condiciones fueron como las de la síntesis del ADN de origen natural. El activador utilizado fue 5-etiltio-1H-tetrazol (0.5M). Después de que los oligonucleótidos sintetizados se cortaron del soporte CPG utilizando una solución acuosa de amoníaco al 28%, los grupos protectores de las unidades estructurales base se eliminaron a 55°C, durante 12 horas. El producto en bruto
- 20 obtenido se purificó utilizando una columna corta de fase reversa (Sep-Pak® Plus C18 Environmental Cartridges, Waters) y se purificó adicionalmente por HPLC de fase reversa.

Los análogos de oligonucleótidos sintetizados (Compuestos 9 a 13) se purificaron y se determinaron sus purezas mediante HPLC de fase reversa siguiendo las condiciones siguientes.

#### Fase móvil

- 25 Solución (A): solución reguladora de acetato de trietilamonio 0.1 M, pH 7.0
- Solución (B): solución reguladora de acetato de trietilamonio 0.1M: acetonitrilo = 1:1, pH 7.0

#### Gradiente:

- MeCN analítico al 5-9% (30 min), MeCN preparativo al 5-9% (30 min): Compuesto 9
- MeCN analítico al 4-8% (30 min), MeCN preparativo al 4-8% (30 min): Compuesto 10
- 30 MeCN analítico al 3-7% (30 min), MeCN preparativo al 3-7% (30 min): Compuesto 11
- MeCN analítico al 4-8% (30 min), MeCN preparativo al 4-8% (30 min): Compuesto 12
- MeCN analítico al 7-11% (30 min), MeCN preparativo al 7-11% (30 min): Compuesto 13

#### Columnas utilizadas:

- Analytical Waters XBridge™ OST C18 2.5  $\mu$ m (4.6 x 50 mm)
- 35 Preparative Waters XBridge™ OST C18 2.5  $\mu$ m (10 x 50 mm)

#### Velocidad de flujo:

- Analítica 1.0 mL/min
- Preparativa 4.5 mL/min

Temperatura de la columna: 50°C

- 40 Detección: UV (254 nm)

Los pesos moleculares de los análogos de oligonucleótidos sintetizados (Compuestos 9 a 13) se determinaron por espectrometría de masas de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF-MS). La Tabla 1 muestra los resultados.

Tabla 1

Oligonucleótido * 1	Rendimiento (%)	Espectrometría de masa de tiempo de vuelo	
		Calculado (M-H)	Medido (M-H)
5'-d(GCGTTT <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 9)	15	3701.50	3700.64
5' -d(GCGTTT <u>I</u> ITGCT)-3' (Compuesto 10)	9	3770.56	3770.61
5' -d(GCG <u>I</u> TTTTITGCT)-3' (Compuesto 11)	7	3839.62	3838.94
5'-d(GCGTTT <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 12)	10	3770.56	3770.37
5'-d(TTTTTT <u>I</u> T)-3' (Compuesto 13)	14	3048.02	3048.11
*1 <u>I</u> : Ácido nucleico en puente con Guanidina			

Se observó que los oligonucleótidos previstos se obtuvieron porque, como se desprende de la Tabla 1, los resultados de la medición del peso molecular por espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) coincidían bien con los valores teóricos.

A efectos de comparación, un oligonucleótido que contiene un nucleósido nativo (compuesto 14: Tabla 2 a continuación, SEQ ID NO: 1) y análogos de oligonucleótidos que contienen un ácido nucleico artificial en puente con urea 2',4'-BNA/LNA (5-metil-2'-O,4'-C-metilenuridina (sintetizada de acuerdo con el Documento No Patente 6) (compuestos 15 a 18: Tabla 3 a continuación) también se sintetizaron y purificaron de una manera similar de acuerdo con el protocolo estándar de fosforamidita.

Ejemplo 3: Medición de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>)

Después de cada uno de los diversos oligonucleótidos obtenidos en el ejemplo 2 (compuestos 9 a 12, análogos de oligonucleótidos producidos utilizando el compuesto 8, compuesto 14, un oligonucleótido que contiene un nucleósido nativo y los compuestos 15 a 18, análogos de oligonucleótidos que contienen un ácido nucleico artificial en puente con urea) se hibridó a una hebra diana (5'-AGCAAAAACGC-3': SEQ. ID. NO: 2) para formar un dúplex, se midió su valor T<sub>m</sub>, una temperatura a la que se disocia el 50% de los dúplex, para determinar la capacidad del oligonucleótido para la hidridación.

Específicamente, se calentó una solución de muestra (130 µL) que contiene NaCl 100 mM, solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.2), oligonucleótidos 4 µM y hebras diana 4 µM, en un baño de agua en ebullición, y después se enfrió a temperatura ambiente durante 10 horas. Se hizo pasar un flujo de gas de nitrógeno a través de una cámara de celda de un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1650PC) con el fin de evitar la condensación de rocío y la solución de muestra se enfrió gradualmente a 5°C y se mantuvo a 5°C, durante 5 minutos, después de lo cual se inició la medición. La temperatura se elevó gradualmente a 90°C a una velocidad de 0.5°C/min, y la absorción de ultravioleta se midió a 260 nm a intervalos de 0.1°C. Obsérvese que se utilizó una celda con una tapa para evitar que la concentración se cambie por un aumento de la temperatura. La Tabla 2 muestra los resultados en valores de T<sub>m</sub> y diferencias en los valores de T<sub>m</sub> por unidad de modificación. Un valor de T<sub>m</sub> más alto indica una capacidad de formación de dúplex más alta.

Tabla 2

Oligonucleótido*1	T <sub>m</sub> (ΔT <sub>m</sub> /Modificación de la unidad) (°C)*2	
	ARN	ADN
5'-d(GCGTTTTTTTGCT)-3' (Compuesto 14)	48	50
5'-d(GCGTTT <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 9)	47 (-1.0)	49 (-1.0)
5'-d(GCG <u>I</u> TTTTITGCT)-3' (Compuesto 10)	48 (+0.0)	48 (-1.0)
5'-d(GCGTT <u>I</u> ITGCT)-3' (Compuesto 11)	49 (+0.3)	46 (-1.3)

5'-d(GCGTT <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 12)	45 (-1.5)	47 (-1.5)
<p>*1 <u>I</u>: Ácido nucleico en puente con Guanidina</p> <p>*2 Secuencia de hebra diana :5'-(AGCAAAAAACGC)-3'</p> <p>*2 Condiciones: Solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.2), NaCl 100 mM, Oligonucleótido 4 μM, 0.5°C/min. (260 nm)</p>		

5 Como se desprende de la Tabla 2, contrariamente a la predicción de que la capacidad de formación de dúplex se mejorará por los efectos de las estructuras de puente y los cationes, la capacidad de formación de dúplex fue sustancialmente la misma que la del ADN nativo. También, se observó que el valor de T<sub>m</sub> aumentaba a medida que aumentaba la relación de ácidos nucleicos artificiales introducidos en un oligonucleótido. De acuerdo con lo anterior, parece que los análogos de nucleótidos de la presente invención son útiles en la síntesis de los oligonucleótidos apropiados para las terapias antisentido.

10 Con el fin de estudiar adicionalmente el efecto de los cationes en las porciones de puente, la medición de T<sub>m</sub> se realizó en una condición de baja concentración de sal para desarrollar el efecto de los cationes más (utilizando una solución que tenía las mismas composiciones que las de la solución de muestra, pero libre de NaCl). A efectos de comparación, la medición de T<sub>m</sub> se realizó también sobre los ácidos nucleicos artificiales en puente con urea (compuestos 15 a 18). La Tabla 3 muestra los resultados.

Tabla 3

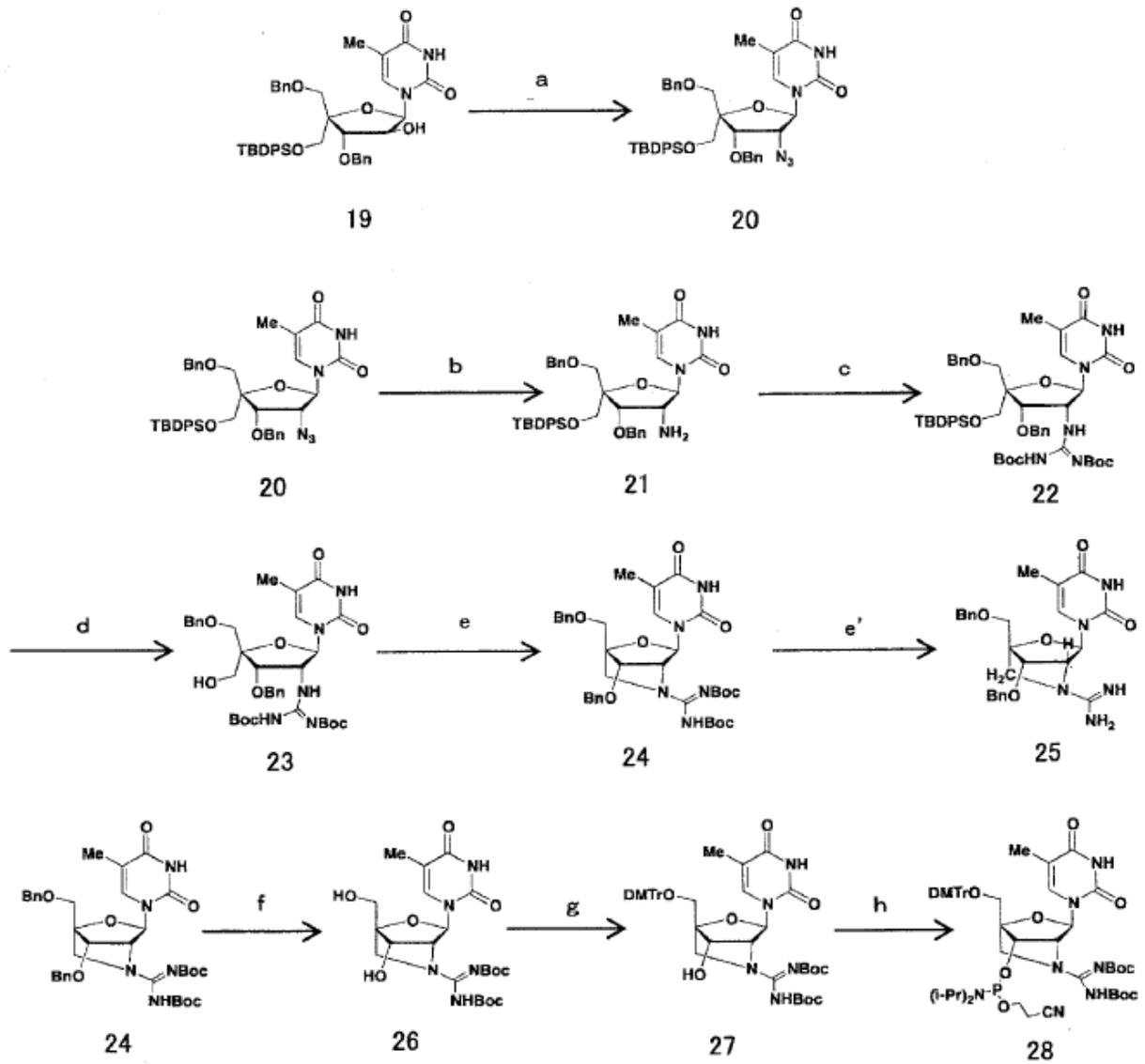
Oligonucleótido*1	T <sub>m</sub> (°C)*2	
	ARN	ADN
5'-d(GCGTTTTTTTGCT)-3' (Compuesto 14)	33	38
5'-d(GCGTT <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 9)	34	39
5'-d(GCGTT <u>I</u> <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 10)	34	39
5'-d(GCG <u>I</u> TTTTTGCT)-3' (Compuesto 11)	38	39
5'-d(GCGTT <u>I</u> <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 12)	32	33
5' -d(GCGTT <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 15)	34	37
5' -d(GCGTT <u>I</u> <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 16)	37	30
5'-d(GCG <u>I</u> TTTTTGCT)-3' (Compuesto 17)	40	28
5' -d(GCGTT <u>I</u> TTTGCT)-3' (Compuesto 18)	36	29
<p>*1 T: Ácido nucleico en puente con Guanidina <u>I</u>: Ácido nucleico en puente con Urea</p> <p>*2 Hebra diana (Secuencia :5'-(AGCAAAAAACGC)-3'</p> <p>*2 Condiciones: Solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.2), sin NaCl, Oligonucleótido 4 μM, 0.5°C/min. (260 nm)</p>		

15 Como se desprende claramente de la Tabla 3, no se observó tanta diferencia en los valores de T<sub>m</sub> cuando se dirigió ARN. Por otra parte, cuando se dirigió ADN, en el caso de los ácidos nucleicos artificiales en puente con urea, el valor de T<sub>m</sub> disminuyó a medida que aumentaba la relación de ácidos nucleicos artificiales introducidos a un oligonucleótido, mientras que en el caso de que se introdujeran los ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina, no se observó tal caída en el valor de T<sub>m</sub>. De acuerdo con lo anterior, se indicó que los cationes en las porciones de puente afectan a la estabilización del dúplex con ADN.

20

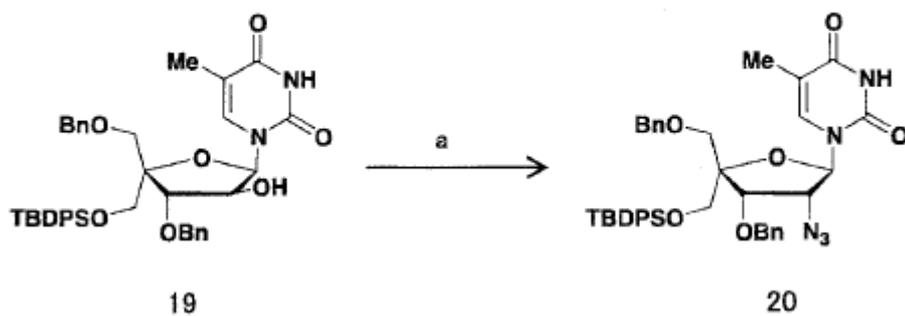
Ejemplo 4: Síntesis de análogo de nucleósidos (compuesto 28)

[Producto químico 14]



(1) Síntesis del compuesto 20

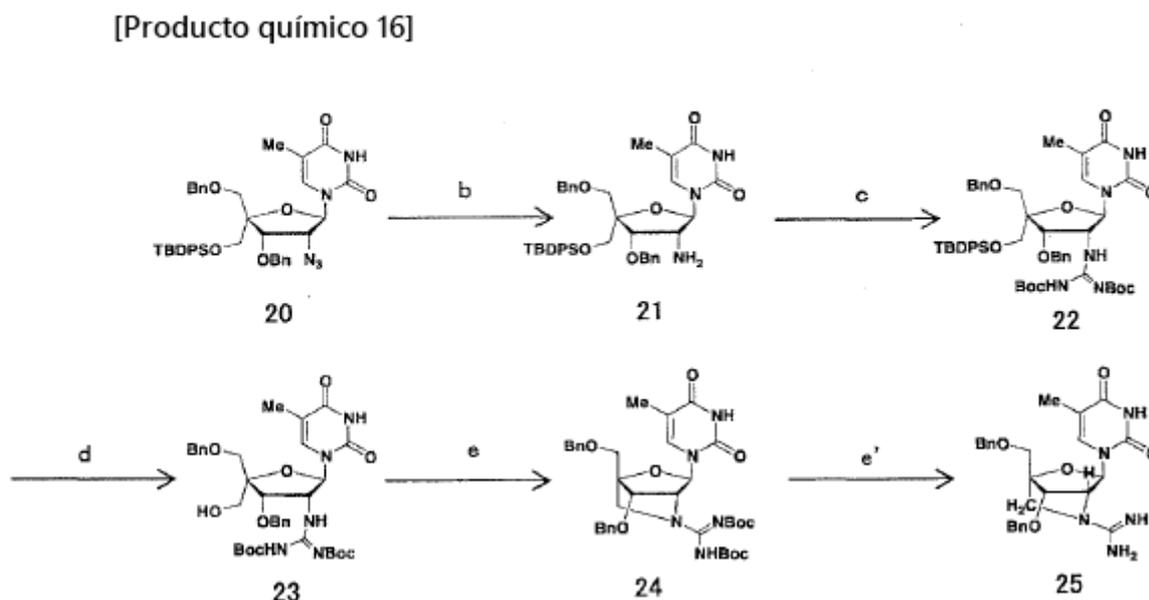
[Producto químico 15]



El Compuesto 19 se obtuvo de acuerdo con el procedimiento de preparación del compuesto 7 descrito en J. Org. Chem. (Shrestha, A.R. et al., 2011, vol. 76, p. 9891-9899). Se adicionaron piridina (1.65 mL, 20.5 mmol) y anhídrido trifluorometanosulfónico (1.37 mL, 8.20 mmol) a una solución en diclorometano (40 mL) que contiene el compuesto 19 (2.86 g, 4.10 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno enfriado con hielo, después de lo cual se agitó la mezcla durante 1 hora en condición de enfriamiento con hielo. Después de que el ácido se descompuso adicionando agua, se llevó a cabo la extracción con diclorometano, y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de evaporar el solvente, se obtuvo un producto en bruto de color amarillo y se purificó simplemente por cromatografía instantánea (*n*-hexano: acetato de etilo = 3:1 → 2:1) para obtener un producto en bruto como un amorfo de color amarillo claro. Posteriormente, se adicionó azida de sodio (0.23 g, 3.60 mmol) a una solución de dimetilformamida (80 mL) que contiene el producto en bruto (1.96 g, 2.34 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó. Después de 48 horas, el solvente se evaporó y se adicionó agua, se realizó la extracción con diclorometano y la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de evaporar el solvente, el producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía en columna instantánea (*n*-hexano: acetato de etilo = 3:1) para obtener el compuesto 20 (1.71 g, 66%) como amorfo de color blanco (Etapa a).

Los datos de propiedades físicas del compuesto 20 obtenidos fueron los siguientes:  $^1\text{H-RMN}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.99 (9H, s), 1.58 (3H, s), 3.63, 3.69 (2H, AB,  $J = 10.5$  Hz), 3.69, 3.91 (2H, AB,  $J = 10.5$  Hz), 3.91 (1H, dd,  $J = 7.2$  Hz, 5.4 Hz), 4.23 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz), 4.47, 4.53 (2H, AB,  $J = 11.4$  Hz), 4.57, 4.75 (2H, AB,  $J = 11.4$  Hz), 6.03 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz), 7.23-7.60 (20H, m), 8.70 (1H, s).

(2) Síntesis de los compuestos 24 y 25



Se adicionó cloruro de níquel (11 mg, 0.085 mmol) a 8 mL de solución de metanol que contiene el compuesto 20 obtenido (622 mg, 0.85 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, y se adicionó además a esta borohidruro de sodio (64 mg, 1.7 mmol) enfriado con hielo, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Después el líquido de reacción se filtró, el solvente se evaporó completamente y se adicionó agua, y se realizó la extracción con acetato de etilo. A continuación, la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio, y el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía de columna en sílica gel (acetato de etilo: trietilamina = 200:1) para obtener el compuesto 21 (456 mg, 76%) como un sólido de color blanco (Etapa b).

Los datos de propiedades físicas del compuesto 21 obtenidos fueron los siguientes:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.04 (9H, s), 1.63 (3H, d,  $J = 1.5$  Hz), 3.59, 3.66 (2H, AB,  $J = 10.0$  Hz), 3.67 (1H, dd,  $J = 5.5$  Hz, 9.0 Hz), 3.79, 3.99 (2H, AB,  $J = 11.0$  Hz), 4.06 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz), 4.55, 4.58 (2H, AB,  $J = 11.0$  Hz), 4.67, 4.76 (2H, AB,  $J = 11.0$  Hz), 5.81 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz), 7.19-7.61 (21H, m), 7.95 (1H, s).

Se adicionaron *N,N'*-di-(*tert*-butoxicarbonil)tiourea (30.4 mg, 0.11 mmol), diisopropiletilamina (9  $\mu\text{L}$ , 0.035 mmol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato (21 mg, 0.11 mmol) a 1 mL de solución en diclorometano que contiene el compuesto 21 obtenido (50 mg, 0.071 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 3 horas. A continuación, después de que la reacción se inactivó

adicionando agua a 0°C, el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio, y el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía de columna en sílica gel (hexano: acetato de etilo = 4:1) para obtener el compuesto 22 (58 mg, 86%) como un sólido de color blanco (Etapa c).

5 Los datos de propiedades físicas del compuesto 22 obtenido fueron los siguientes: <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.04 (9H, s), 1.42 (9H, s), 1.46(9H, s), 1.72 (3H, d, J = 1.0 Hz), 3.57, 3.96 (2H, AB, J = 10.0 Hz), 3.73, 3.78 (2H, AB, J = 11.0 Hz), 4.25 (1H, d, J = 8.0 Hz), 4.57, 4.65 (2H, AB, J = 11.0 Hz), 4.59, 4.61 (2H, AB, J = 9.0 Hz), 4.89 (1H, q, J = 8.0 Hz), 5.98 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.20-7.69 (22H, m), 8.93 (1H, d, J = 8.0 Hz), 11.34 (1H,s).

10 Se adicionó fluoruro de tetra-*n*-butilamonio (0.14 mL, 0.14 mmol) a 1 mL de solución de tetrahidrofurano que contiene el compuesto 22 obtenido (106 mg, 0.11 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 4.5 horas. A continuación, el solvente se evaporó completamente, y el producto obtenido en bruto se purificó por cromatografía de columna en sílica gel (hexano: acetato de etilo = 1:1) para obtener el compuesto 23 (80 mg, cuantitativo) como un sólido de color blanco (Etapa d).

15 Los datos de propiedades físicas del compuesto 23 obtenido fueron los siguientes: <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.42 (9H, s), 1.50 (9H, s), 1.75 (3H, d, J = 1.0 Hz), 2.05 (1H, dd, J = 3.5 Hz, 9.0 Hz), 3.57, 3.62 (2H, AB, J = 10.0 Hz), 3.68 (1H, dd, J = 11.0 Hz, 9.0 Hz), 3.84 (1H, dd, J = 11.0 Hz, 3.5 Hz), 4.35 (1H, d, J = 7.5 Hz), 4.51, 4.72 (2H, AB, J = 11.0 Hz), 4.58, 4.62 (2H, AB, J = 11.5 Hz), 4.87 (1H, q, J = 7.5 Hz), 6.07 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.26-7.52 (11H, m), 7.88 (1H, s), 9.05 (1H, d, J = 7.5 Hz), 11.39 (1H,s).

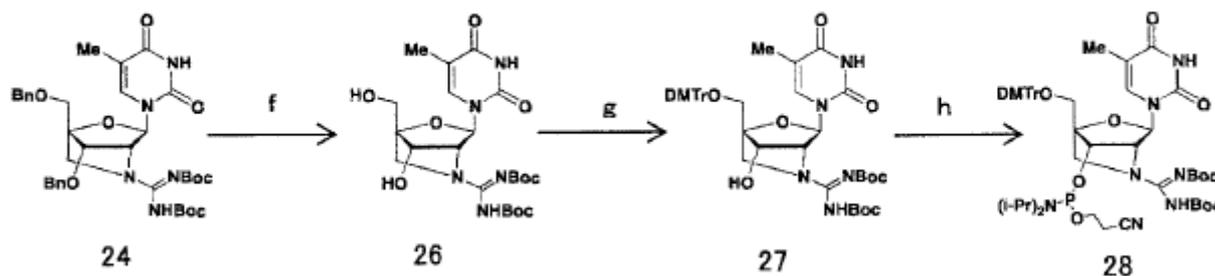
20 Se adicionó piridina (0.29 mL, 3.59 mmol) a 12 mL de solución en diclorometano que contiene el compuesto 23 obtenido (850 mg, 1.20 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, y se adicionó además a esta anhídrido trifluorometanosulfónico (0.3 mL, 1.78 mmol) a 0°C, después de lo cual la mezcla se agitó a 0°C, durante 3 horas. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando solución saturada de bicarbonato de sodio al líquido de reacción a 0°C, el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. A continuación, se adicionaron 2 mL de trietilamina a 8 mL de solución en diclorometano que contiene el producto en bruto en un flujo de gas de nitrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 27 horas. A continuación, el solvente se evaporó completamente y el producto obtenido en bruto se purificó por cromatografía de columna en sílica gel (hexano: acetato de etilo = 1:1) para obtener el compuesto 24 (644 mg, 77%) como un amorfo de color blanco amarillento (Etapa e).

30 A continuación, se adicionó ácido clorhídrico al 35% (0.3 mL) a 1 mL de solución de tetrahidrofurano que contiene el compuesto 24 (57 mg, 0.082 mmol), después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 40 minutos. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando solución saturada de bicarbonato de sodio al líquido de reacción a 0°C, el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener el compuesto 25 (44 mg, cuantitativo) como un sólido de color blanco (Etapa e').

35 Los datos de propiedades físicas del compuesto 25 obtenido fueron los siguientes: <sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.54 (3H, d, J = 1.0 Hz), 3.53, 3.70 (2H, AB, J = 10.0 Hz), 3.90, 3.97 (2H, AB, J = 11.0 Hz), 4.16 (1H, s), 4.60, 4.66 (2H, AB, J = 11.5 Hz), 4.62 (2H, s), 4.78 (1H, s), 5.66 (1H, s), 7.27-7.38 (m, 10H), 7.50 (1H, d, J = 1.0 Hz).

(2) Síntesis del compuesto 28

[Producto químico 17]



40

Se adicionó hidróxido de paladio sobre carbono (900 mg) a 10 mL de solución de metanol que contiene el compuesto 24 obtenido (644 mg, 0.93 mmol) en un flujo de gas de hidrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó

a temperatura ambiente, durante 14 horas. A continuación, el solvente del filtrado obtenido filtrando el líquido de reacción se evaporó completamente para obtener un producto en bruto del compuesto 26 (Etapa f).

5 A continuación, se adicionó cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (469 mg, 1.38 mmol) a 7 mL de solución de piridina que contiene el producto en bruto (354 mg) del compuesto 26 en un flujo de gas de nitrógeno a 0°C, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 12 horas. A continuación, después de que la reacción se inactivó  
10 adicionando solución saturada de bicarbonato de sodio al líquido de reacción a 0°C, el líquido de reacción se extrajo con diclorometano, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A continuación, el solvente se evaporó completamente para obtener un producto en bruto. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía de columna en sílica gel (hexano: acetato de etilo = 1:1) para obtener el compuesto 27 (442 mg, 58%) como un sólido de color blanco (Etapa g).

Los datos de propiedades físicas del compuesto 27 obtenido fueron los siguientes: <sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.42 (18H, s), 1.49 (3H, s), 3.39-3.55 (4H, m), 3.73 (6H, s), 4.39 (1H, s), 4.57 (1H, s), 5.51 (1H, s), 6.83 (4H, d, J = 9.0 Hz), 7.17-7.44 (m, 9H), 7.77 (1H, s).

15 Se adicionaron tetracoloro de *N,N*-diisopropil amonio (39 mg, 0.23 mmol) y 2-cianoetil *N,N,N',N'*-tetraisopropil fosforamidita (73 µL, 0.23 mmol) a 2 mL de solución de acetonitrilo que contiene el compuesto 27 obtenido (141 mg, 0.17 mmol) en un flujo de gas de nitrógeno, después de lo cual la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 3 horas. A continuación, después de que la reacción se inactivó adicionando agua al líquido de reacción a 0°C, se realizó la extracción con acetato de etilo, y la capa orgánica se lavó con agua y solución salina saturada y se secó  
20 sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El solvente se evaporó completamente, y el producto obtenido en bruto se purificó por cromatografía de columna en sílica gel (hexano: acetato de etilo = 3:2) para obtener el compuesto 28 (148 mg, 86%) como un amorfo de color blanco (Etapa h).

Los datos de propiedades físicas del compuesto 28 obtenido fueron los siguientes: <sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 148.78, 149.48, 149.78.

#### Ejemplo 5: Síntesis y purificación de análogos de oligonucleótidos

25 Utilizando el compuesto 28 obtenido en el ejemplo 4, 10 mer de análogos de oligonucleótido (compuestos 29 a 32: mostrados en la Tabla 4 a continuación) se sintetizaron mediante un sintetizador nS-8 de oligonucleótido ADN/ARN automatizado (fabricado por Gene Design Inc.) con un soporte CPG de escala 0.2 µmol. El tiempo de acoplamiento de solución de acetonitrilo (0.1M) que contiene el compuesto 28 se fijó en 8 minutos, y las otras condiciones fueron como las de la síntesis del ADN nativo. El activador utilizado fue 5-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-1H-tetrazol (0.25M).  
30 Los oligonucleótidos sintetizados se cortaron del soporte CPG utilizando una solución acuosa de amoníaco al 28%. Los productos en bruto de los compuestos 29 a 31 obtenidos se purificaron utilizando una columna corta de fase reversa (Sep-Pak®Plus C18 Environmental Cartridges, Waters) y luego se trataron con ácido trifluoroacético (TFA) al 50%, durante 24 horas, y se purificaron además por HPLC de fase reversa. El producto en bruto del compuesto 32 obtenido se purificó utilizando una columna corta de fase reversa (Sep-Pak®Plus C18 Environmental Cartridges, Waters) y se purificó adicionalmente por HPLC de fase reversa.  
35

Los análogos de oligonucleótido sintetizados (compuestos 29 a 32) se purificaron y se determinaron sus purezas como en el ejemplo 2.

Los pesos moleculares de los análogos de oligonucleótidos sintetizados (Compuestos 29 a 32) se determinaron mediante medición MALDI-TOF-MASS. La Tabla 4 muestra los resultados.

40 Tabla 4

Oligonucleótido*1	Rendimiento (%)	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo	
		Calculado (M-H <sup>+</sup> )	Medido (M-H <sup>+</sup> )
5'-d(TTTTtTTTT)-3' (Compuesto 29)	9	3048.02	3048.84
5'-d(TTTTtTtTTT)-3' (Compuesto 30)	7	3117.09	3117.57
5'-d(TTtTtTtTTT)-3' (Compuesto 31)	3	3186.16	3186.50
5'-d(TTTTTTTtT)-3' (Compuesto 32)	2	3048.02	3047.85
*1 t: Ácido nucleico en puente con Guanidina			

A efectos de comparación, un oligonucleótido que contiene un nucleósido nativo (compuesto 33: mostrado en la Tabla 5 a continuación) también se sintetizó y purificó de una manera similar de acuerdo con el protocolo de estándar de fosforamidita.

5 Ejemplo 6: Medición de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>)

Después de cada uno de los diversos oligonucleótidos (compuestos 29 a 31, análogos de oligonucleótidos producidos utilizando el compuesto 28; y compuesto 33, un oligonucleótido que contiene un nucleósido nativo) obtenido en el ejemplo 5 se hibridó a cualquiera de las hebras diana (10 mer de poly A y SEQ ID NO: 3 a 5) mostrados en las Tablas 5 y 6 a continuación para formar un complejo, se midió su valor de T<sub>m</sub>, una temperatura a la que se disocia el 50% de los complejos, para determinar la capacidad del oligonucleótido para la hibridación .

Específicamente, se calentó una solución de muestra (130 µL) que contiene NaCl 100 mM, solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.2), oligonucleótidos 4 µM y hebras diana 4 µM en un baño de agua en ebullición, y después se enfrió a temperatura ambiente durante 10 horas. Se hizo pasar un flujo de gas nitrógeno a través de una cámara de celda de un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1650PC) con el fin de evitar la condensación de rocío, y la solución de muestra se enfrió gradualmente a 0°C y se mantuvo a 0°C, durante 5 minutos, después de lo cual se inició la medición. La temperatura se elevó gradualmente a 80°C a una velocidad de 0.5°C/min, y se midió la absorción ultravioleta a 260 nm a intervalos de 0.1°C. Obsérvese que se utilizó una celda con tapa con el fin de evitar que la concentración se cambie por un aumento de la temperatura. La tabla 5 muestra, en términos de valores de T<sub>m</sub> y diferencias en los valores de T<sub>m</sub> por unidad de modificación, las capacidades de los diversos análogos de oligonucleótido que contiene un número diferente de ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina para hibridar a poly A. La Tabla 6 muestra, en términos de valores de T<sub>m</sub>, las capacidades del análogo de nucleótido que contiene el ácido nucleico artificial en puente con guanidina y el oligonucleótido que contiene el nucleósido nativo para hibridar a diversas hebras diana.

Tabla 5

Oligonucleótido*1	T <sub>m</sub> (ΔT <sub>m</sub> /Modificación de la unidad) (°C)*2	
	ARN	ADN
5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 33)	19	20
5'-d(TTTTtTTTT)-3' (Compuesto 29)	24 (+5.0)	24 (+4.0)
5'-d(TTTTtTtTTT)-3' (Compuesto 30)	30 (+5.5)	36 (+8.0)
5'-d(TTtTtTtTTT)-3' (Compuesto 31)	40 (+7.0)	50 (+10.0)

\*1 t: Acido nucleico en puente con Guanidina  
 \*2 Hebra diana (Secuencia :5'-(AAAAAAAAA)-3'  
 \*2 Condiciones: Solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.2), NaCl 100 mM, Oligonucleótido 4 µM, 0.5°C/min. (260 nm)

25

Tabla 6

Oligonucleótido*1	Hebra diana	T <sub>m</sub> (°C)*2	
		ARN	ADN
5'-d(TTTTtTTTT)-3' (Compuesto 29)	5'-(AAAAAAAAA)-3'	24	24
5'-d(TTTTtTTTT)-3' (Compuesto 29)	5'-(AAAAAGAAAA)-3'	17	10
5'-d(TTTTtTTTT)-3' (Compuesto 29)	5'-(AAAAACAAAA)-3'	10	10
5'-d(TTTTtTTTT)-3' (Compuesto 29)	5'-(AAAAATAAAA)-3'	12	10

5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 33)	5'-(AAAAAAAAAA)-3'	19	20
5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 33)	5'-(AAAAAGAAAA)-3'	13	<10
5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 33)	5'-(AAAAACAAAA)-3'	<10	<10
5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 33)	5'-(AAAAATAAAA)-3'	<10	<10
*1 T: Ácido nucleico en puente con Guanidina			
*2 Condiciones: Solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.2), NaCl 100 mM, Oligonucleótido 4 μM, 0.5°C/min. (260 nm)			

5 Como se desprende de la Tabla 5, los oligonucleótidos que contienen los ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina tenían excelentes capacidades de formación de complejos no sólo con respecto al ARN, sino también con respecto al ADN. También, se observó que el valor de T<sub>m</sub> aumentaba a medida que aumentaba la relación de ácidos nucleicos artificiales introducidos en un oligonucleótido. De acuerdo con lo anterior, parece que los ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina de la presente invención son útiles en la síntesis de los oligonucleótidos apropiados para las terapias antisentido.

10 Como se desprende de la Tabla 6, el oligonucleótido que contiene el ácido nucleico artificial en puente con guanidina tenía capacidad de reconocimiento de apareamiento erróneo. Los oligonucleótidos que contienen los ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina tenían capacidades de formación de complejos más excelentes con respecto a las hebras diana deseables (esto es, poly A) que el oligonucleótido que contiene el nucleósido nativo. De acuerdo con lo anterior, se observó que los oligonucleótidos que contienen los ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina no tenían ningún riesgo de formar complejos de una manera no específica de la secuencia.

Ejemplo 7: Evaluación de la capacidad de formación de doble hebra de análogos de oligonucleótidos

15 Utilizando el compuesto 28 obtenido en el ejemplo 4, 9 mer de análogo de oligonucleótido que contiene diversas bases (compuesto 34: mostrado en la Tabla 7 a continuación) se sintetizaron y purificaron como en el ejemplo 5, excepto que, después el oligonucleótido sintetizado se cortó del soporte CPG utilizando una solución acuosa de amoníaco al 28%, el grupo protector de la unidad estructural base se eliminó a 55°C, durante 12 horas. A efectos de comparación, un oligonucleótido que contiene un nucleósido nativo (compuesto 35: mostrados en la Tabla 7 a continuación) también se sintetizó y purificó de una manera similar de acuerdo con el protocolo de estándar de fosforamidita.

25 Después de que cada uno de los oligonucleótidos de los compuestos 34 y 35 se hibridó a una hebra diana 5'-GTGATATGC-3' para formar un dúplex, se midió su valor de T<sub>m</sub>, una temperatura a la que se disociaron el 50% de dúplex, para determinar la capacidad del oligonucleótido para la hibridación. La hibridación a la hebra diana y la medición de los valores de T<sub>m</sub> se realizaron como en el ejemplo 6. La Tabla 7 muestra los resultados de los valores de T<sub>m</sub>.

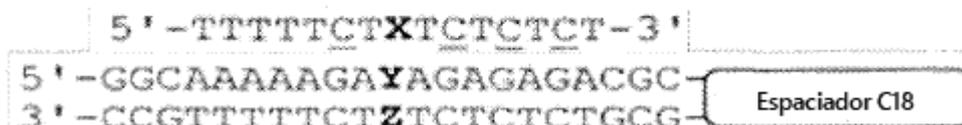
Tabla 7

Oligonucleótido*1	T <sub>m</sub> (°C)*2	
	ARN	ADN
5'-d(GCATATCAC)-3' (Compuesto 35)	32	35
5'-d(GCA <sup>t</sup> ATCAC)-3' (Compuesto 34)	40	44
*1 t: Ácido nucleico en puente con Guanidina		
*2 Hebra diana (Secuencia: 5'-(GTGATATGC)-3'		
*2 Condiciones: Solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.2), NaCl 100 mM, Oligonucleótido 4 μM, 0.5°C/min. (260 nm)		

Como se desprende de la Tabla 7, también en el caso de diseñar la secuencia para contener diversas bases, el oligonucleótido que contiene el ácido nucleico artificial en puente con guanidina (compuesto 34) tenía excelentes capacidades de formación de dúplex con respecto tanto al ARN Y ADN como en el caso de la secuencia poly T.

Ejemplo 8: Evaluación de la capacidad de formación de triplex de análogo de oligonucleótidos

[Producto químico 18]



Utilizando el compuesto 28 obtenido en el ejemplo 4, 15 mer de análogo de oligonucleótido (compuesto 36: en donde "X" es un ácido nucleico artificial en puente con guanidina y el C subrayado es 2'-desoxi 5-metilcitosina, véase la Tabla 8 a continuación) se sintetizó y purificó como en el ejemplo 5, excepto que, después de que el oligonucleótido sintetizado se cortó del soporte CPG utilizando a solución acuosa de amoníaco al 28%, el grupo protector de la unidad estructural base se eliminó a 55°C, durante 12 horas. A efectos de comparación, un oligonucleótido que contiene un nucleósido nativo (compuesto 37: donde "X" es un nucleósido nativo, y el C subrayado es 2'-desoxi 5-metilcitosina, véase la Tabla 8 a continuación) también se sintetizó y purificó de una manera similar de acuerdo con el protocolo de estándar de fosforamidita.

Se preparó un dúplex de ADN objetivo que contiene una hebra diana 5'-GGCAAAAAGAYAGAGAGACGC-3' (Número de secuencia 6) y su hebra complementaria 5'-GCGTCTCTCTZTCTTTTTGCC-3' (Número de secuencia 7) de la siguiente manera. 5'-GGCAAAAAGAYAGAGAGACGC-[espaciador C18]-GCGTCTCTCTZTCTTTT TGCC-3' (hebra obtenida por la unión del extremo 3' de la hebra del oligonucleótido de SEQ. ID. NO: 6 y el extremo 5' de la hebra del oligonucleótido de SEQ. ID. NO: 7 mediante un [espaciador C18] como un enlazante) se sintetizó y purificó de acuerdo con el protocolo de estándar de fosforamidita, excepto que se utilizaron 18-O-dimetoxitrihexaetilenglicol y 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (fabricado por Glen Research) para la síntesis de las porciones enlazantes, de manera que se obtuvo un dúplex de ADN diana deseado. En la fórmula, Y y Z se refieren a una combinación que puede formar un par de bases, y son de la siguiente manera: Y es A, y Z es T; Y es T, y Z es A; Y es G, y Z es C; o Y es C, y Z es G.

Después de que cada uno de los oligonucleótidos de los compuestos 36 y 37 se hibridó a un dúplex diana para formar un triplex, se midió su valor Tm, una temperatura a la que se disociaron el 50% de triplex, para determinar la capacidad del oligonucleótido para la hibridación.

Específicamente, una solución de muestra (130 µL) que contiene solución reguladora de cacodilato de sodio 10 mM (pH 6.8), KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, oligonucleótidos 1.89 µM, y dúplex diana 1.89 µM se calentó en un baño de agua hirviendo, y después se enfrió a temperatura ambiente durante 10 horas. Se hizo pasar un flujo de gas de nitrógeno a través de una cámara de celda de un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1650PC) con el fin de evitar la condensación de rocío, y la solución de muestra se enfrió gradualmente a 5°C y se mantuvo a 5°C, durante 20 minutos, después de lo cual se inició la medición. La temperatura se elevó gradualmente a 90°C a una velocidad de 0.5°C/min, y se midió la absorción ultravioleta a 260 nm a intervalos de 0.1°C. Obsérvese que se utilizó una celda con tapa con el fin de evitar la concentración se cambie por un aumento de la temperatura. La Tabla 8 muestra los resultados de los valores de Tm. Un valor de Tm más alto indica una capacidad de formación de triplex más alta.

Tabla 8

Oligonucleótido*1	Tm(°C)*2			
	Combinación YZ Diana			
	AT	TA	GC	CG
5'-d(TTTTTCTTTCTCTCT)-3' (Compuesto 37)	44	20	23	29
5'-d(TTTTTCTtTCTCTCT)-3' (Compuesto 36)	54	17	38	20

\*1 t: Ácido nucleico en puente con Guanidina

\*1 C:2'-desoxi-5-metilcistisina

\*2 Condiciones: Solución reguladora de cocadilato de sodio 10 mM (pH 6.8), KCl 100 mM, y 50 mM MgCl<sub>2</sub>, Oligonucleótido 1.89 μM, 0.5 °C/min. (260 nm)

Como se desprende claramente de la Tabla 8, el oligonucleótido que contiene el ácido nucleico artificial en puente con guanidina (compuesto 36) tenía excelentes capacidades de formación de triplex con respecto a un dúplex diana deseable (Y es A y Z es T).

#### 5 Ejemplo 9: Evaluación de la resistencia a nucleasa de los análogos de oligonucleótidos

En este ejemplo, se prepararon 10 mer de diversos oligonucleótidos donde X de la secuencia 5'-d(TTTTTTTTXXT)-3' fueron los siguientes. Es decir, se prepararon los siguientes diversos oligonucleótidos: un análogo de oligonucleótido producido utilizando el análogo de nucleósido (compuesto 8) del ejemplo 1, donde X era un ácido nucleico artificial en puente con guanidina (esto es, "compuesto 13"); un análogo de oligonucleótido producido utilizando el análogo de nucleósido (compuesto 28) del ejemplo 4, donde X era un ácido nucleico artificial en puente con guanidina (esto es, "compuesto 32"); un oligonucleótido donde X era un LNA-T (LNA de timina) (compuesto 38, fabricado por Gene Design Inc.); un oligonucleótido donde X era un ADN-T (ADN de timina) (10 mer de oligo dT, esto es, "compuesto 33"); y un oligonucleótido sintetizado y purificado de acuerdo con el protocolo de estándar de fosforamidita, donde X era un oligo S (sintetizado y purificado de acuerdo con el protocolo de síntesis de fosforotioato estándar, excepto que se utilizó D-1,4-ditiotreitól (DDTT, fabricado por ChemGene) en lugar de un agente oxidante como agente sulfurante (compuesto 39: utilizado como control positivo).

La resistencia a la nucleasa se evaluó de la siguiente manera. Es decir, se adicionaron 0.175 μg de 3' exonucleasa (*Crotalus adamanteus* venom fosfodiesterasa: CAVP, fabricada por Pharmacia Biotech) y se mezclaron con 100 μL de solución reguladora (Tris·HCl 50 mM (pH 8.0), MgCl<sub>2</sub> 10 mM) que contiene cada uno de diversos oligonucleótidos (750 pmol), después de lo cual la mezcla se incubó a 37°C, y parte del líquido de reacción se extrajo a intervalos iguales después del inicio de la reacción. El líquido reaccionado extraído se calentó a 90 °C durante 2 minutos para desactivar la enzima y la cantidad restante de oligonucleótidos se determinó por HPLC. Las condiciones de HPLC fueron las siguientes: gradiente 6-12% de MeCN (15 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; y temperatura de la columna de 50°C. La cantidad restante de oligonucleótidos se calculó como el porcentaje de oligonucleótidos sin reaccionar (%) y se representó gráficamente frente al tiempo de reacción. La figura 1 muestra los resultados.

La figura 1 es un gráfico que muestra un cambio en el tiempo en el porcentaje de oligonucleótidos sin reaccionar cuando diversos oligonucleótidos que tienen la secuencia 5'-d(TTTTTTTTXXT)-3' se trataron con 3' exonucleasa. En la figura 1, el eje vertical indica el porcentaje de oligonucleótidos sin reaccionar (%) al tratamiento con nucleasa, y el eje horizontal indica el tiempo de tratamiento con nucleasa (min). Los símbolos de la figura 1 son los siguientes: cuadrángulo representa un oligonucleótido que contiene un nucleósido de origen natural (compuesto 33); círculo representa un oligonucleótido que contiene un LNA (compuesto 38); triángulo representa un oligonucleótido que contiene un ácido nucleico artificial en puente con guanidina (compuesto 32); x representa un oligonucleótido que contiene un ácido nucleico artificial en puente con guanidina (compuesto 13); y el triángulo invertido representa un oligonucleótido que contiene un S-oligo (compuesto 39).

Como se desprende claramente de la figura 1, 50% o más del compuesto 13 se dejó sin reaccionar incluso después del tratamiento con nucleasa durante 20 minutos, esto es, fue resistente a degradarse. El compuesto 32 tenía un porcentaje más bajo de oligonucleótidos que quedaban sin reaccionar que el del compuesto 13. Sin embargo, el compuesto 32 fue resistente a ser degradado comparado con el compuesto 38 (oligonucleótido que contiene LNA) que se degradó casi completamente después del tratamiento con nucleasa durante 10 minutos.

#### 40 Ejemplo 10: Evaluación de la resistencia a la nucleasa del análogo de oligonucleótido

En este ejemplo, se prepararon 9 mer de oligonucleótido (compuesto 40) donde X de la secuencia 5'-d(TTTTTTTTXX)-3' era un ácido nucleico artificial en puente con guanidina de la siguiente manera.

Es decir, se adicionó 3' exonucleasa (*Crotalus adamanteus* venom fosfodiesterasa: CAVP, fabricada por Pharmacia Biotech) (0.2 μg) y se mezclaron con 40 μL de solución reguladora (Tris·HCl 50 mM (pH 8.0), MgCl<sub>2</sub> 10 mM) que contiene el compuesto 32 (3330 pmol), después de lo cual la mezcla se incubó a 37°C durante 3 horas. A continuación, se realizó el calentamiento a 90°C durante 2 minutos para desactivar la enzima, y se realizó la purificación por HPLC. Se observó que el oligonucleótido deseado se obtuvo debido a que el valor de medición del peso molecular (2743.07) del oligonucleótido obtenido por espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) coincidía bien con el valor teórico (2743.83).

A efectos de comparación, se utilizó un oligonucleótido donde X de la secuencia 5'-d(TTTTTTTTXX)-3' fue un LNA (fabricado por Gene Design Inc.: Compuesto 41).

5 La resistencia a la nucleasa se evaluó como en el ejemplo 9, excepto que se adicionaron 0.08 µg de 3' exonucleasa a 100 µL de solución reguladora que contiene cada uno de diversos oligonucleótidos (750 pmol). La figura 2 muestra los resultados.

10 La figura 2 es un gráfico que muestra un cambio en el tiempo en el porcentaje de oligonucleótidos sin reaccionar cuando se trataron diversos oligonucleótidos que tienen la secuencia 5'-d(TTTTTTTTXX)-3' con 3' exonucleasa. En la figura 2, el eje vertical indica el porcentaje de oligonucleótidos sin reaccionar (%) al tratamiento con nucleasa, y el eje horizontal indica el tiempo de tratamiento con nucleasa (min). Los símbolos de la figura 2 son los siguientes: círculo representa un oligonucleótido que contiene un LNA (compuesto 41); y el triángulo representa un oligonucleótido que contiene un ácido nucleico artificial en puente con guanidina (compuesto 40).

15 Como se desprende de la figura 2, el 80% del compuesto 40 (oligonucleótido que contiene ácido nucleico artificial en puente con guanidina) se dejó sin reaccionar incluso después del tratamiento con nucleasa durante 20 minutos. Por otra parte, casi no había oligonucleótido sin reaccionar del compuesto 41 (oligonucleótido que contiene LNA) después del tratamiento con nucleasa durante 20 minutos. De esta manera, un oligonucleótido que contiene un ácido nucleico artificial unido a guanidina de anillo de 5 miembros en el extremo 3', como en el análogo de nucleósido en puente con guanidina (compuesto 28) en el ejemplo 4, mostró una resistencia a las nucleasas extremadamente alta.

Ejemplo 11: Medición de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de los análogos de oligonucleótidos

20 Después cada uno del compuesto 33 (oligonucleótido nativo que contiene 10 mer de oligo dT); compuesto 29 a 31, 42 y 43 (análogos de oligonucleótidos que contienen ácidos nucleicos en puente con guanidina del compuesto 28); y los compuestos 44 a 48 (oligonucleótidos que contienen LNA-T) mostrados en la Tabla 9 a continuación se hibridaron a 10 mer de poly A para formar un complejo, se midió su valor de T<sub>m</sub>, una temperatura a la que se disocia el 50% de complejos, para determinar la capacidad del oligonucleótido para la hibridación.

25 Los compuestos 29 a 31, 42 y 43 se sintetizaron y purificaron como en el ejemplo 5, excepto que se usó TFA al 75% en lugar de TFA al 50% en el tratamiento con TFA después de la purificación utilizando una columna corta de fase reversa. Los compuestos 44 a 48 fueron fabricados por Gene Design Inc.

30 La formación de los complejos y la medición de los valores de T<sub>m</sub> se realizaron como en el ejemplo 6, excepto que una solución de muestra (130 µL) que contiene KCl 200 mM, solución reguladora de cacodilato de potasio 20 mM (pH 6.8), oligonucleótidos 4 µM, y hebras diana 4 µM. La Tabla 9 muestra los resultados. La Tabla 9 muestra los resultados de comparación entre el oligonucleótido nativo y los diversos oligonucleótidos que contienen un número diferente de LNA, en términos de valores de T<sub>m</sub> y diferencias en los valores de T<sub>m</sub> por unidad de modificación, las capacidades de los diversos análogos de oligonucleótidos que contienen un número diferente de ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina para la hibridación con poly A.

35 Tabla 9

Oligonucleótido*1	T <sub>m</sub> (ΔT <sub>m</sub> /Modificación de la unidad) (°C)*2	
	ARN	ADN
5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 33)	22	25
5'-d(TTTTTtTTTT)-3' (Compuesto 29)	27 (+5.0)	30 (+5.0)
5'-d(TTTTTtTtTTT)-3' (Compuesto 30)	33 (+5.5)	42 (+8.5)
5'-d(TTtTtTtTTTT)-3' (Compuesto 31)	44 (+7.3)	57 (+10.7)
5'-d(TTTTttTTTT)-3' (Compuesto 42)	44 (+7.3)	55 (+10.0)
5'-d(tTtTtTtTtT)-3' (Compuesto 43)	66 (+8.8)	79 (+10.8)
5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 44)	28 (+6.0)	25 (+0.0)
5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 45)	34 (+6.0)	31 (+3.0)

5'-d(TTTT TTTT)-3' (Compuesto 46)	43 (+7.0)	40 (+5.0)
5'-d(TTTT TTTT)-3' (Compuesto 47)	42 (+6.7)	35 (+3.3)
5'-d(TTTT TTTT)-3' (Compuesto 48)	50 (+5.6)	48 (+4.6)
<p>*1 t: Ácido nucleico en puente con Guanidina T:LNA</p> <p>*2 Hebra diana Secuencia: 5'-(AAAAAAAA)-3'</p> <p>*2 Condiciones: Solución reguladora de cocadilato de sodio 20 mM (pH 6.8), KCl 200 mM, Oligonucleótido 4 <math>\mu</math>M, 0.5°C/min. (260 nm)</p>		

5 Como se desprende de la Tabla 9, cuando se dirigió ARN, los análogos de oligonucleótidos que contienen los ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina tenían afinidades de unión suficientemente altas en comparación con el oligonucleótido nativo. Además, cuando el número de ácidos nucleicos artificiales introducidos era de 3 residuos o menos, los análogos de oligonucleótidos que contienen los ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina tenían los valores de Tm similares a los de los oligonucleótidos que contienen los LNA, pero el oligonucleótido en el cual fueron introducidos 5 residuos de ácido nucleico artificial en puente con guanidina mostraron afinidades de unión más altas que aquéllas en las que se introdujeron 5 residuos de LNA. La comparación de los incrementos en los valores de Tm por residuo mostró claramente que, cuando se introdujo el LNA, un aumento en los valores de Tm fue de 6 a 7°C independientemente del número introducido, mientras que cuando se introdujo el ácido nucleico artificial en puente con guanidina, un aumento en los valores de Tm por residuo se hizo mayor a medida que aumentaba el número introducido. De acuerdo con lo anterior, se indicó que las estructuras de puente afectan de forma aditiva a la afinidad de unión, mientras que los cationes derivados de guanidina afectan sinérgicamente a la afinidad de unión. También se observó que cuando se dirigió el ADN, los oligonucleótidos que contienen los ácidos nucleicos artificiales en puente con guanidina mostraban una afinidad de unión extremadamente alta y tenían una afinidad de unión extremadamente superior que los del oligonucleótido nativo y los oligonucleótidos que contienen los LNA.

#### Ejemplo 12: Evaluación de la capacidad de reconocimiento de bases diana de análogos de oligonucleótidos

20 El análogo de oligonucleótido en el cual se introdujeron 5 residuos de ácido nucleico artificial en puente con guanidina (compuesto 43) y el oligonucleótido en el cual se introdujeron 5 residuos de LNA (compuesto 48), mostrados en la Tabla 9, se evaluaron para determinar las afinidades de unión con respecto a una hebra diana de ADN que tiene una secuencia completamente complementaria (coincidencia completa) y una hebra diana de ADN que tiene una desadaptación de una sola base (apareamiento erróneo). Las secuencias de las hebras diana fueron las siguientes: coincidencia completa 5'-(AAAAAAAA)-3'; y apareamiento erróneo 5'-(AAAAATAAA)-3'. Las afinidades de unión se evaluaron como en el ejemplo 11 realizando un tratamiento de hibridación para formar un complejo, y luego midiendo su valor de Tm, una temperatura a la que se disocian 50% de los complejos.

30 La figura 3 muestra los resultados. La figura 3 muestra curvas de Tm de un análogo de oligonucleótido que contiene un ácido nucleico artificial en puente con guanidina y un oligonucleótido que contiene un LNA, con respecto a una hebra diana de ADN que tiene una secuencia totalmente complementaria (coincidencia completa) y una hebra diana de ADN que tiene un apareamiento erróneo de base única (apareamiento erróneo). En la figura 3, el eje vertical indica la absorbancia a 260 nm, y el eje horizontal indica la temperatura (°C). La gráfica muestra los resultados del análogo de oligonucleótido que contiene el ácido nucleico artificial en puente con guanidina (compuesto 43) con respecto al apareamiento erróneo (línea única delgada) y a la coincidencia completa (línea discontinua única delgada), y del oligonucleótido que contiene el LNA (compuesto 48) con respecto al apareamiento erróneo (línea única gruesa) y de coincidencia completa (línea discontinua única gruesa).

40 Como se desprende de la figura 3, el análogo de oligonucleótido que contiene el ácido nucleico artificial en puente con guanidina (compuesto 43) tenía un valor de Tm suficientemente bajo con respecto a la hebra diana de apareamiento erróneo comparado con el valor de Tm con respecto a la hebra diana de coincidencia completa y la disminución en el valor de Tm fue similar al del oligonucleótido que contiene el LNA (compuesto 48). De acuerdo con lo anterior, se observó que el oligonucleótido que contiene el ácido nucleico artificial en puente con guanidina tenía una afinidad de unión extremadamente alta con una hebra diana, sin perjudicar la capacidad de reconocimiento de la base diana.

#### Ejemplo 13: Evaluación del ácido nucleico artificial en puente con guanidina (en lo sucesivo, se puede denominar como GuNA) respecto a la cinética en células

45 (1) Síntesis e identificación de oligonucleótidos modificados con GuNA marcados fluorescentemente (F-GuNA-ODN)

En primer lugar, utilizando el compuesto 28 obtenido en el ejemplo 4, un nucleósido nativo, y un amidito para la modificación fluorescente descrito más adelante, se sintetizó un análogo de oligonucleótido mediante un sintetizador nS-8 automatizado de oligonucleótido de ADN/ARN (fabricado por Gene Design Inc.). El análogo de oligonucleótido sintetizado es un compuesto para uso como precursor (compuesto 49) de los compuestos 53 a 57 mostrados en la Tabla 10. La estructura de este precursor (compuesto 49) se muestra a continuación.

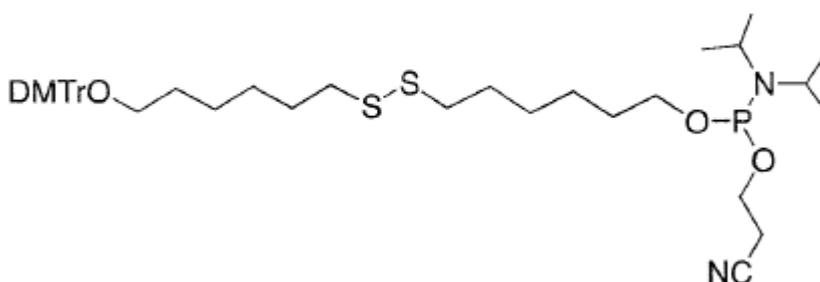
[Producto químico 19]



En la síntesis automatizada del oligonucleótido, toda la timidina amidita (número de modelo: T111081), soporte de fase sólida CPG timidina (número de modelo: T361010), CapA (número de modelo: L840020-06), CapB (número de modelo: L850020-06), y un agente oxidante (número de modelo: L860020-06) se obtuvieron a partir de los reactivos Proligo (marca registrada) SAFC (marca registrada). Se adquirió el acetonitrilo (número de modelo: 018-14451) y la solución de desbloqueo (número de modelo: 042-28921) de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. El activador utilizado fue 0.25 M de 5-etiltio-1H-tetrazol/acetonitrilo seco (código de fabricante: 30-3140-52, fabricado por Glen Research). El tiempo de acoplamiento de la solución de acetonitrilo (0.1 M) que contiene el compuesto 28 se fijó a 20 minutos y, cuando el compuesto 28 se introdujo sucesivamente en el oligonucleótido para tres bases, se realizó el doble acoplamiento solamente en la tercera base. Las otras condiciones fueron como las de síntesis de ADN nativo.

Con respecto a la modificación fluorescente, cuando se introdujo amidita como agente fluorescente en el oligonucleótido, el agente fluorescente se puede hidrolizar durante el tratamiento subsiguiente con ácido trifluoroacético al 75% (TFA). De este modo, se adicionó amidita Thiol-Modifer C6 S-S (código de fabricante: 10-1936-90, Glen Research) representada por la fórmula estructural a continuación, mediante un sintetizador automático de ADN en el extremo 5' del oligonucleótido y se terminó el procesamiento sin desprotección del grupo protector, esto es, el grupo dimetoxitritilo (grupo DMTr), de manera que se obtuvo un precursor (compuesto 49) de análogos de oligonucleótidos modificados marcados con fluorescencia (compuestos 53 a 57). Se sabe que el enlace disulfuro del amidito Thiol-Modifer C6 S-S es suficientemente resistente al 75% de TFA.

[Producto químico 20]



A efectos de comparación, se adquirieron y utilizaron análogos de oligonucleótido (compuestos 58 a 61: mostrados en la Tabla 10 a continuación) (fabricado por Gene Design Inc.) que contiene un ácido nucleico artificial en puente con urea 2',4'-BNA/LNA (5-metil-2'-O,4'-C-metilenuridina) en lugar del compuesto 28. La estructura de este precursor (compuesto 50) de los análogos de oligonucleótidos se muestra a continuación.

[Producto químico 21]

5'-HO-C6-S-S-C6-Oligonucleótido-3' (Compuesto 50)

El precursor obtenido (compuesto 49) se extrajo del soporte de CPG utilizando una solución acuosa de amoníaco al 28%, se separó amoníaco de la misma utilizando una columna NAP-10 (número de código: 17-0854-01, GE Healthcare) y el material resultante se purificó mediante RP-HPLC y se liofilizó. La RP-HPLC se realizó utilizando un Shimadzu LC-10AT<sub>VP</sub>, un Shimadzu SPD-10A<sub>VP</sub>, y un Shimadzu CTO-10<sub>VP</sub> siguiendo las condiciones que se indican a continuación.

Fase móvil

Solución (A): solución reguladora de acetato de trietilamonio 0.1 M, pH 7.0

Solución (B): acetonitrilo al 80%/solución reguladora de acetato de trietilamonio 0.1 M

Gradiente:

5 Concentración solución (B): 0-100% (80 min)

Columnas utilizadas:

Waters XBridge™ OST C18 2.5 μm (10 x 50 mm número de producto: 186003954)

Velocidad de flujo: 3.0 mL/min

Temperatura de la columna: 50°C

10 Detección: UV (254 nm)

A continuación, se adicionó ácido trifluoroacético al 75%, el grupo Boc y el grupo DMTr se separaron del precursor así purificado (Compuesto 49) realizando el tratamiento a temperatura ambiente, durante 6 horas y se eliminó un ácido trifluoroacético utilizando una columna NAP-10, de manera que se obtuvo un precursor liofilizado y desprotegido (compuesto 50).

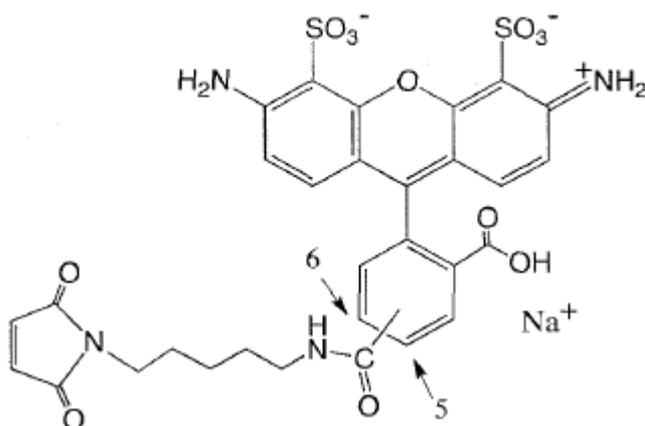
15 De acuerdo con el protocolo del Thiol-Modifer C6 S-S, se adicionó solución reguladora DTT/TE 100 mM (pH 7.0) al precursor desprotegido (compuesto 50) y el enlace disulfuro se redujo a temperatura ambiente durante 2 horas, de manera que se produjo un grupo SH. El precursor obtenido después de la reducción (compuesto 51) se purificó mediante RP-HPLC (Solución (B): acetonitrilo al 50%/solución reguladora de acetato de trietilamonio 0.1 M, Gradiente: concentración de solución (B) 0-50%/25 min), y se obtiene. A continuación, se muestra la estructura del precursor obtenido después de la reducción (compuesto 51).

[Producto químico 22]

5'-HS-C6-Oligonucleótido-3' (Compuesto 51)

25 El grupo SH se produjo a través de la reducción como se ha descrito anteriormente, y después se adicionó Alexa Fluor 488 C5 maleimida (código del producto: A-10254, fabricado por Life technologies) representada por la fórmula estructural al precursor purificado (compuesto 51) En una cantidad de 10 equivalentes con respecto al precursor (compuesto 51), después de lo cual la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante la noche, de modo que el grupo SH se unió a la maleimida (Nucleic Acids Research, 36, 2764-2777, 2008).

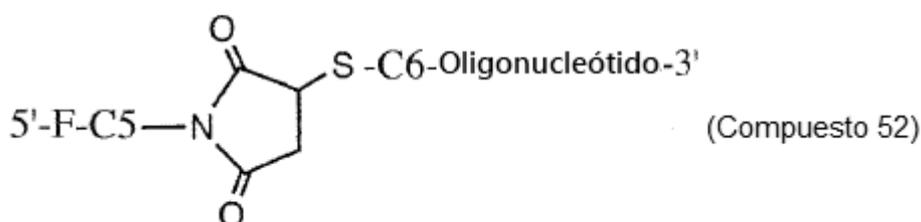
[Producto químico 23]



30 Posteriormente, la purificación se realizó mediante RP-HPLC (Solución (B): acetonitrilo al 50%/solución reguladora de acetato de trietilamonio 0.1 M, Gradiente: concentración de solución (B) 0-50%/25 min), de manera que se obtuvieron los análogos de oligonucleótido modificado marcado con fluorescencia (compuesto 52: compuestos 53 a 61). De éstos, los compuestos 54 a 57 eran oligonucleótidos modificados con GuNA marcados con fluorescencia (F-

GuNA-ODN). A continuación, se muestra la estructura del análogo de oligonucleótido modificado marcado con fluorescencia obtenido (compuesto 52).

[Producto químico 24]



- 5 Los análogos de oligonucleótidos modificados marcados con fluorescencia sintetizados (compuestos 53 a 61) se purificaron y se determinaron sus purezas como en el ejemplo 2.

La espectrometría de masas de los análogos de oligonucleótidos modificados marcados con fluorescencia sintetizados (Compuestos 53 a 61) se realizó con un MALDI-TOF-MS (SpiralTOF JMS-S3000, JEOL). La Tabla 10 muestra los resultados.

10

Tabla 10

Oligonucleótido * 1	Rendimiento (%)	Espectrometría de masa de tiempo de vuelo	
		Calculado (M-H <sup>-</sup> )	Medido (M-H <sup>-</sup> )
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 53)	16	3873.84	3874.55
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 54)	11	3942.91	3943.78
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 55)	19	4081.04	4080.66
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 56)	16	4081.04	4080.90
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 57)	8	4288.23	4287.31
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 58)	*2	3901.85	3902.53
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 59)	*2	3957.87	3955.85
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 60)	*2	3957.87	3957.19
5'-d(FSTTTTTTTTTT)-3' (Compuesto 61)	*2	4041.90	4040.82
*1 T: GuNA *1 T:2',4'-BNA/LNA S:thiol F: Alexa Fluor 488			
*2 No medido			

(2) Introducción de oligonucleótidos modificados con GUNA marcados con fluorescencia F-GuNA-ODN en células de hepatoma humano (HuH-7) y observación de la cinética en las células

- 15 En primer lugar, como una preparación, la parte de vidrio de una placa de fondo de vidrio (código de modelo: 3970-035, Iwaki) para la observación celular se recubrió con colágeno mediante la aplicación de 1 mL de 100 µg/mL de colágeno/ácido clorhídrico (pH 3.0) (Cellmatrix Type IC, fabricado por Nitta Gelatin Inc.).

Después de dejar reposar la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos, se retiró el colágeno de la misma y se lavó la placa una vez con solución salina estandarizada con fosfato y después se secó a temperatura ambiente

durante 1 hora. A continuación, se sembraron en placas 4.5 x 10<sup>5</sup> células HuH-7 (adquiridas de JCRB Cell Bank (número de célula: JCRB0403)) y se cultivaron durante la noche en un medio libre de rojo de fenol al 10% de FBS/DMEM (número de producto: 08490-05, fabricado por Nacalai Tesque, Inc.) (5% de CO<sub>2</sub>) y, a continuación, se adicionaron cada uno de los análogos de oligonucleótidos modificados marcados con fluorescencia (compuestos 53 a 61) obtenidos en (1) a una concentración de 500 nM.

Después de adicionar los análogos de oligonucleótidos modificados marcados con fluorescencia (compuestos 53 a 61), el cultivo se continuó durante otras 12 horas, después de lo cual las células HuH-7 cultivadas se lavaron una vez con una solución de sal equilibrada de Hanks (HBSS, número de producto 14025-092, fabricado por Life Technologies), y los núcleos y los lisosomas se tiñeron utilizando Hoechst 33342 (número de producto: H3570, fabricado por tecnologías Life) y LysoTracker (marca registrada) Red DND-99 (número de catálogo: L-7528, fabricado por Life technologies) según el protocolo. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de solución salina balanceada de Hanks y se adquirieron imágenes de fluorescencia utilizando un microscopio de fluorescencia de incidente (BZ-9000, fabricado por Keyence Corporation). Una lente objetiva utilizada era una lente de contraste de fase 40x (S Plan Fluor, fabricada por Nikon Corporation).

El conjunto de filtros de detección y el tiempo de exposición de cada agente fluorescente son los siguientes.

Alexa Fluor 488: Ex 470/40 nm, DM 495 nm, BA 535/50 nm (GFP-B, fabricado por Keyence Corporation), 5 segundos

Hoechst 33342: Ex 360/40 nm, DM 400 nm, BA 460/50 nm (DAPI-B, fabricado por Keyence Corporation), 2 segundos

LysoTracker (marca comercial registrada) Red DND-99: Ex 540/25 nm, DM 565 nm, BA 605/55 nm (TRITC, fabricado por Keyence Corporation), 1.2 segundos

Como resultado de la introducción de los análogos de oligonucleótidos modificados marcados con fluorescencia (compuestos 53 a 61) a las células HuH-7, se observó emisión de fluorescencia particularmente intensa en las células cuando dos tipos de oligonucleótidos se adicionaron, esto es, el compuesto 57 en el cual se introdujeron 6 residuos del compuesto 28 y el compuesto 61 en el cual se introdujeron 6 residuos de 2',4'-BNA/LNA. En comparación con estos, los otros oligonucleótidos tenían un nivel más bajo de emisión de fluorescencia. La figura 4 muestra microfotografías de cinética del compuesto 57 (A a D) y del compuesto 61 (E a H) en células HuH-7: donde A y E son imágenes de contraste de fase; B y F son imágenes de fluorescencia utilizando Alexa Fluor 488 (oligonucleótidos); C y G son imágenes de fluorescencia de Hoechst 33342 (núcleos); y D y H son imágenes de fluorescencia utilizando LysoTracker (lisosomas) (barra de escala 50 μm). Cuando se utilizó el oligonucleótido del compuesto 57 en el cual se introdujeron 6 residuos del compuesto 28, se observó intensa emisión de fluorescencia (figura 4B). Por otra parte, cuando se utilizó el oligonucleótido del compuesto 61 en el cual se introdujeron 6 residuos de 2',4'-BNA/LNA, se observó en cierta medida la emisión de fluorescencia, pero su nivel fue inferior al del compuesto 57 utilizando el compuesto 28 (figura 4F). La razón de esto parece ser que, en el caso del compuesto 57, se introdujeron 6 residuos del compuesto 28, y, de este modo, se mejoró la eficiencia de introducción a las células y se cambió la carga eléctrica de todo el oligonucleótido de manera que se mejoró la eficiencia de adsorción a las superficies de las células. Por otra parte, parece que, en el caso del compuesto 61, se introdujeron 6 residuos de 2',4'-BNA/LNA, y, de este modo, se mejoró la eficiencia de introducción a las células, pero la carga eléctrica no se cambió y la eficiencia de adsorción a las superficies de las células no fue mejorada, de manera que el nivel de emisión de fluorescencia fue menor que el del compuesto 57.

La figura 5 muestra microfotografías de cinética del compuesto 57 en células HuH-7, mostrando fotografías (A a D) obtenidas agrandando la región indicada por la flecha en la figura 4B, en las figuras 4A a 4D. Una observación cercana de la localización de la emisión de fluorescencia obtenida en las células mostró que los oligonucleótidos adicionados no estaban presentes dentro de los núcleos, y una gran cantidad de los mismos se acumulaba en las vesículas de los citoplasmas y también estaba presente en los lisosomas.

Es decir, se demostró que el cambio de la carga eléctrica de todo el oligonucleótido proporcionando el grupo guanidino cargado positivamente al oligonucleótido cargado negativamente es un enfoque útil para mejorar la eficacia de introducción del oligonucleótido en las células.

Obsérvese que ha sido convencionalmente difícil introducir oligonucleótidos en células sin usar un sistema de administración de fármacos en vista de la resistencia enzimática o de la permeabilidad celular. Con el fin de resolver este problema, se utiliza generalmente un enfoque en donde se efectúa la modificación de fosforotioato en la estructura principal de fosfato de los oligonucleótidos. Sin embargo, la modificación del fosforotioato puede disminuir la productividad, la seguridad y la acción del fármaco, debido al problema de quiralidad en los átomos de fósforo. Esta vez, fue posible mejorar la permeabilidad celular sin realizar modificación de fosforotioato y, de este modo, se ve que los nucleósidos artificiales en puente con guanidina y los oligonucleótidos de la presente invención superan estos inconvenientes y pueden contribuir al uso de ácidos nucleicos como productos farmacéuticos.

Aplicabilidad Industrial

5 La presente invención puede proporcionar una molécula de ácido nucleico para un oligonucleótido que tiene una alta afinidad de unión y una alta especificidad a un ácido nucleico diana y que muestra una alta resistencia a la nucleasa. Dicha molécula de ácido nucleico puede hacer una gran contribución como un material para un fármaco de ácido nucleico para uso en terapias antisentido, terapias antigénicas, terapias basadas en aptámeros, terapias basadas en ARNpi y similares, que se esperan como nuevos métodos de tratamiento o prevención de enfermedades.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Osaka
- <120> Nucleósido y oligonucleótido artificial que tienen un puente de guanidino
- 10 <130> P2-13O07079
- <150> JP 2012-208906
- <151> 2012-09-21
- <150> JP 2013-022360
- <151> 2013-02-07
- 15 <160> 7
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 12
- <212> ADN
- 20 <213> Artificial
- <220>
- <223> Compuesto 14
- <400> 1
- gcgtttttg ct 12
- 25 <210> 2
- <211> 12
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223> Cadena diana
- <400> 2
- agcaaaaaac gc 12
- <210> 3
- <211> 10
- 35 <212> ADN

<213> Artificial  
<220>  
<223> Cadena diana  
<400> 3  
5   aaaaagaaaa   10  
<210> 4  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Artificial  
10   <220>  
<223> Cadena diana  
<400> 4  
    aaaaacaaaa   10  
<210> 5  
15   <211> 10  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cadena diana  
20   <400> 5  
    aaaaataaaa   10  
<210> 6  
<211> 21  
<212> ADN  
25   <213> Artificial  
<220>  
<223> Cadena diana en doble hebra  
<220>  
<221> misc\_feature  
30   <222> (11)..(11)  
<223> n = A o T o G o C  
<400> 6  
    ggcaaaaaga nagagagacg c   21

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cadena complementaria en doble hebra

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

10 <223> n = T o A o C o G

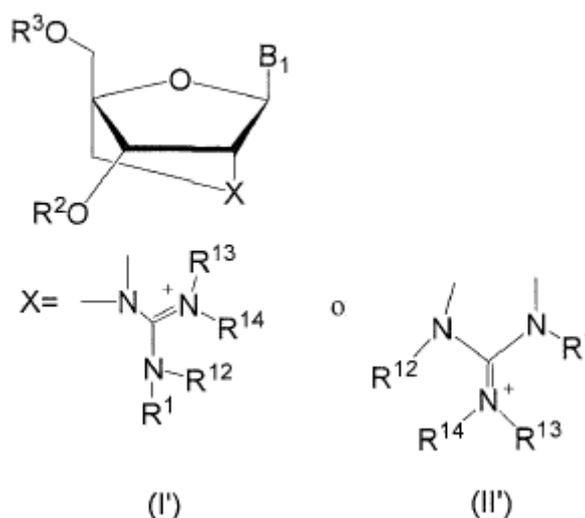
<400> 7

gcgtctctct ntcttttgc c 21



2. El compuesto o la sal del mismo de la reivindicación 1, en donde, en la fórmula I o II, B<sub>1</sub> representa un grupo 6-aminopurina-9-ilo, un grupo 2,6-diaminopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-bromopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-hidroxipurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-metoxipurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-cloropurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2,6-dimetoxipurina-9-ilo, un grupo 2,6-dicloropurina-9-ilo, un grupo 6-mercaptapurina-9-ilo, un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-fluoro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-cloro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-metoxi-1, 2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-mercapto-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-1, 2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, o un grupo 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.
- 5
- 10 3. El compuesto o la sal del mismo de la reivindicación 1, en donde, en la fórmula I o II, B<sub>1</sub> representa un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.
4. Un oligonucleótido que contiene al menos una de las estructuras de nucleósidos representadas por la fórmula I' o II' a continuación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

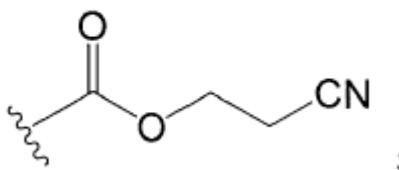
[Producto químico 3]



- 15 (en donde B<sub>1</sub> representa un grupo purina-9-ilo o un grupo 2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados de un grupo α, en donde el grupo α consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquilo lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo alcoxi lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquiltio lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo amino, un grupo alquilamino lineal C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un grupo amino protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, y un átomo de halógeno;
- 20

R<sup>1</sup>, R<sup>12</sup>, y R<sup>13</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo protector para un grupo amino, o

[Producto químico 4]

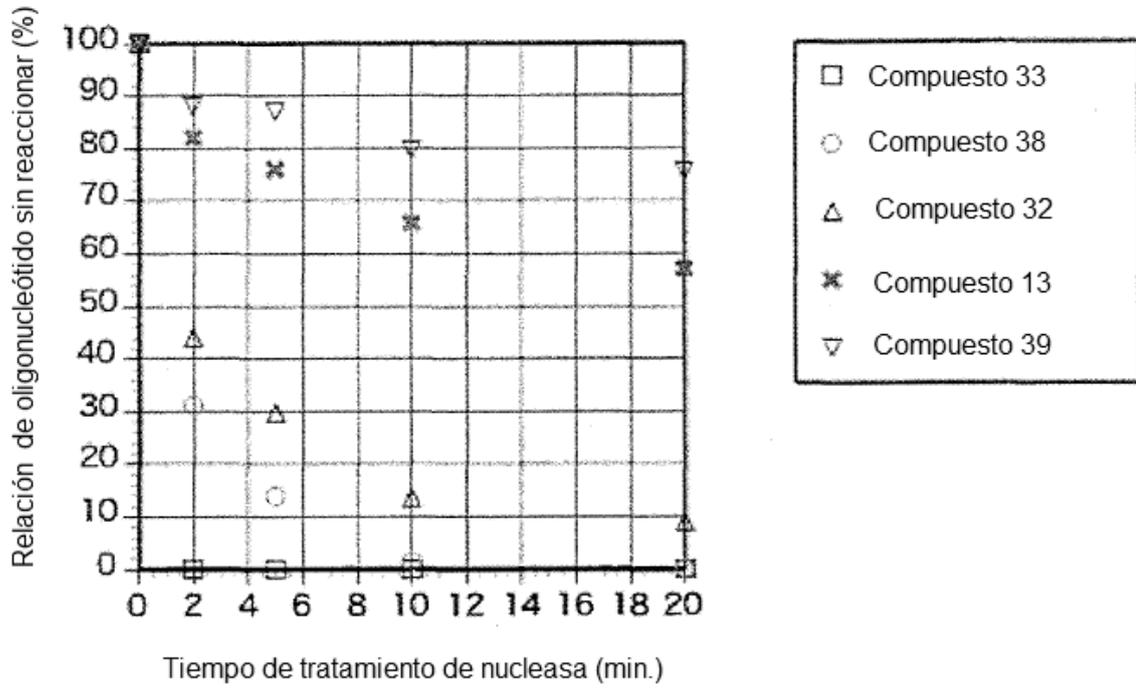


R<sup>14</sup> representa un átomo de hidrógeno; y

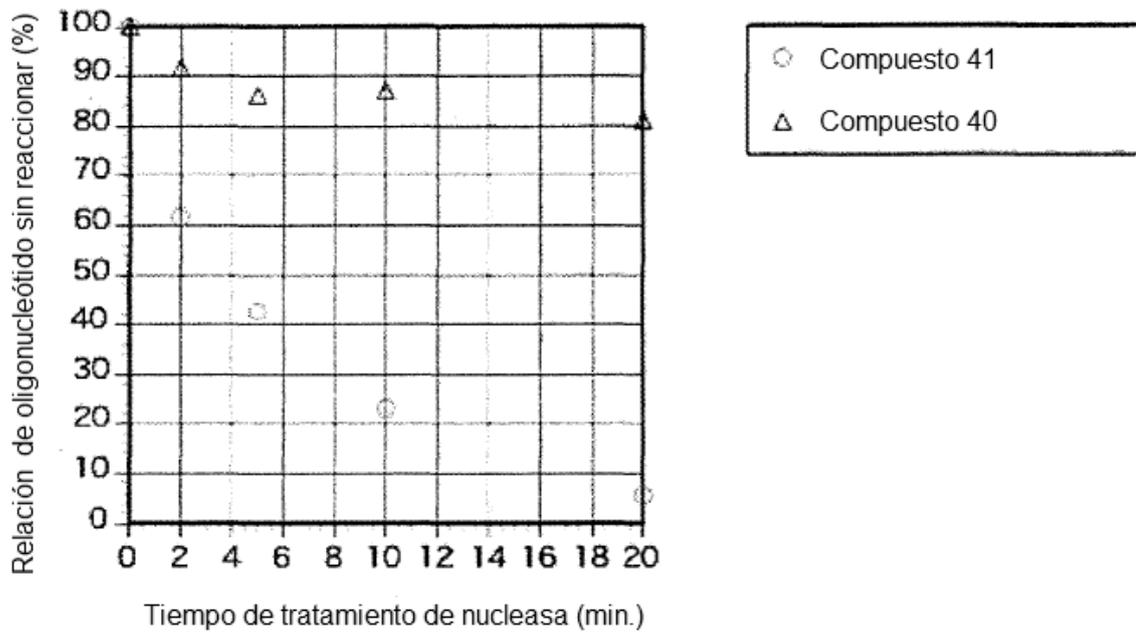
- 5 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> cada uno independientemente representan un átomo de hidrógeno, un grupo protector para un grupo hidroxilo en la síntesis del ácido nucleico, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> que puede ser ramificado o formar un anillo, un grupo arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$  y que puede tener un heteroátomo, un grupo aralquilo que tiene una unidad estructural arilo C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub> que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$  y que puede tener un heteroátomo, un grupo acilo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$ , un grupo sililo que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$ , un grupo fosfato que puede tener uno cualquiera o más sustituyentes seleccionados del grupo  $\alpha$ , un grupo fosfato protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, o -P(R<sup>4</sup>)R<sup>5</sup> (en donde R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> cada uno independientemente representan un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector en la síntesis del ácido nucleico, un grupo amino, un grupo alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, un grupo alquiltio C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, un grupo cianoalcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y/o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>)).
- 10
- 15 5. El oligonucleótido o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 4, en donde, en la fórmula I' o II', B<sub>1</sub> representa un grupo 6-aminopurina-9-ilo, un grupo 2,6-diaminopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-bromopurina-9-ilo, un grupo 2-amino-6-hidroxipurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-metoxipurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-cloropurina-9-ilo, un grupo 6-amino-2-fluoropurina-9-ilo, un grupo 2,6-dimetoxipurina-9-ilo, un grupo 2,6-dicloropurina-9-ilo, un grupo 6-mercaptipurina-9-ilo, un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-fluoro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 4-amino-2-oxo-5-cloro-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-metoxi-1, 2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-mercapto-1, 2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-1, 2-dihidropirimidina-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo, o un grupo 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.
- 20
6. El oligonucleótido oligonucleótido o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 4, en donde, en la fórmula I' o II', B<sub>1</sub> representa un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidina-1-ilo.

25

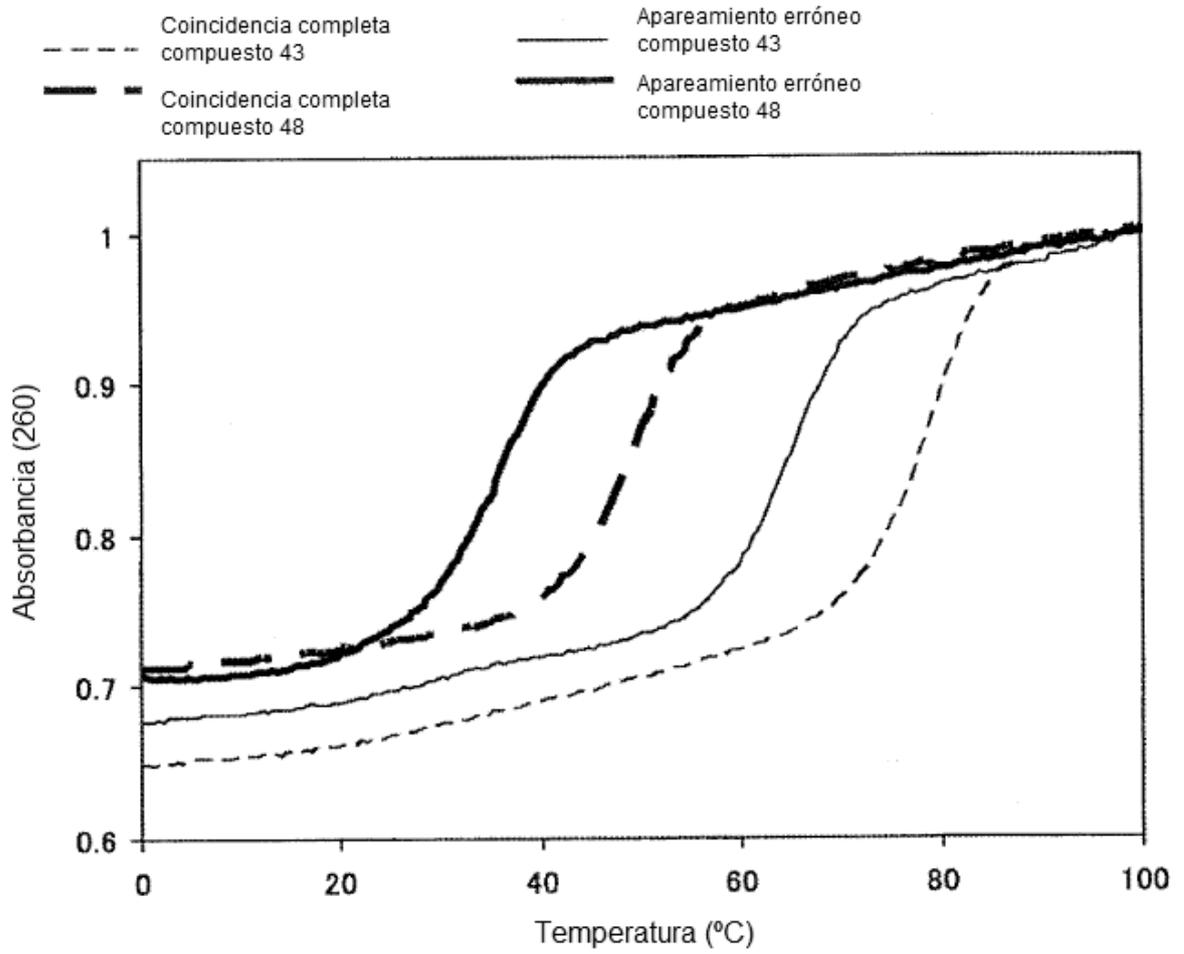
[Figura 1]



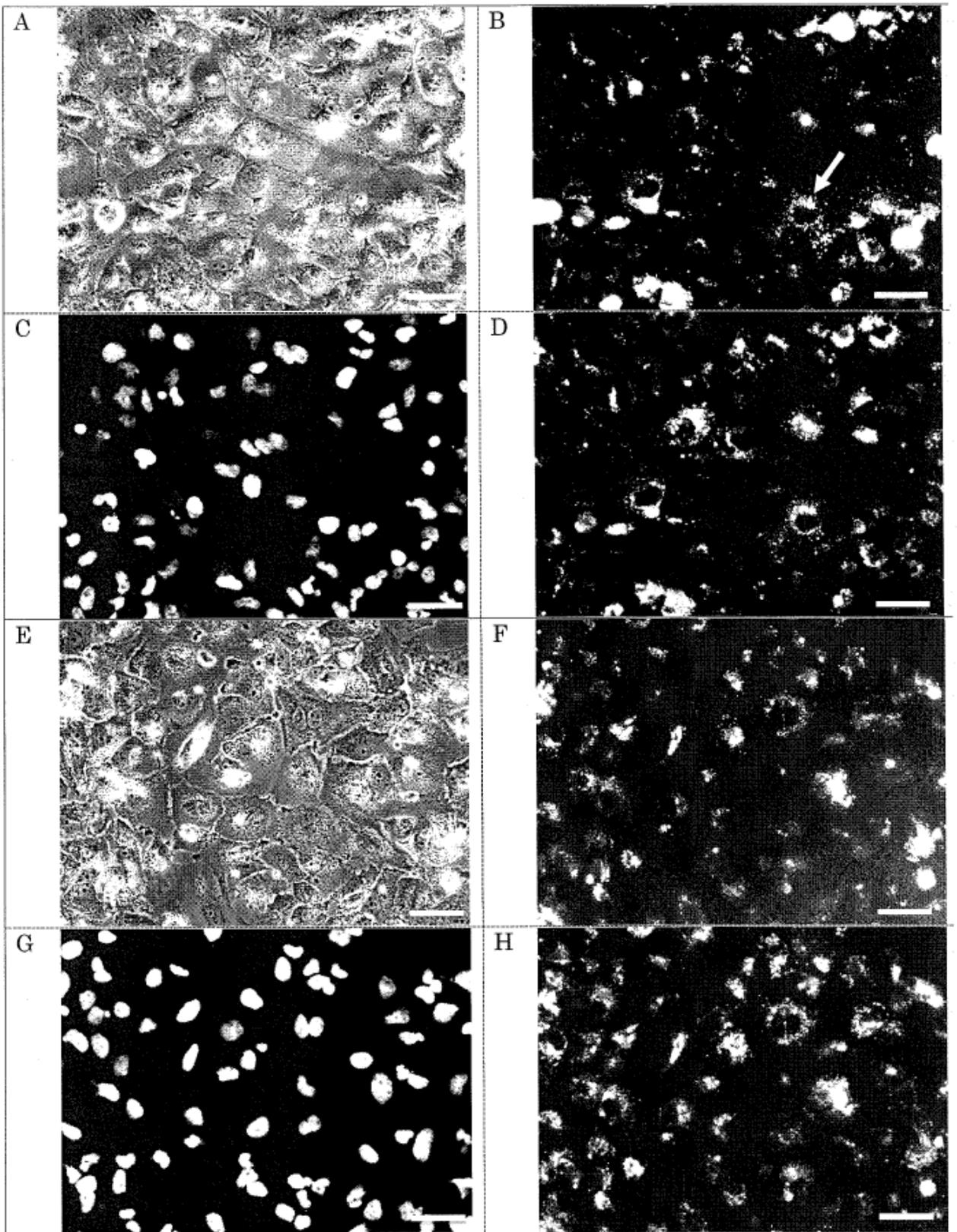
[Figura 2]



[Figura 3]



[Figura 4]

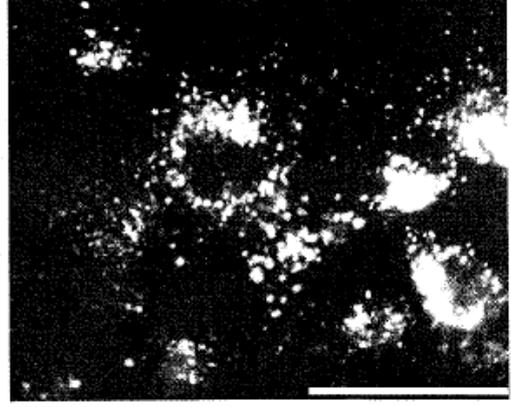


[Figura 5]

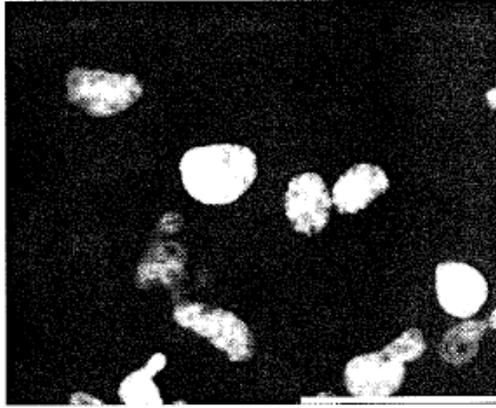
A



B



C



D

