

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 296**

51 Int. Cl.:

C07H 19/06 (2006.01)

C07H 19/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2005 PCT/US2005/023633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2006 WO06014387**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2005 E 05768112 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 1778711**

54 Título: **Síntesis de monómeros nucleosídicos 3'-aminoprotegidos**

30 Prioridad:

02.07.2004 US 585193 P

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

22.11.2017

73 Titular/es:

**GERON CORPORATION (100.0%)
149 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**GRYAZNOV, SERGEI, M.;
PONGRACZ, KRISZTINA y
ZIELINSKA, DARIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 643 296 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

Síntesis de monómeros nucleosídicos 3'-aminoprottegidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de síntesis eficaces de monómeros nucleosídicos 3'-amino protegidos ortogonalmente, útiles en la preparación sintética de análogos de oligonucleótidos, y a los monómeros protegidos ortogonalmente preparados por dichos métodos.

10

Referencias

- Asai, A. et al., *Cancer Research* 63(14):3931-9 (2003).
 Carpino, L.A. et al., *J. Org. Chem.* 45:4250-2 (1980). Carpino, L.A. et al., *J. Org. Chem.* 54:5887-97 (1989).
 15 Cech, D. et al., *Coll. Czech. Chem. Comm.* 61:S297-S300 (1996).
 Chen, J.-K., Schultz, R.G., Lloyd, D.H. y Gryaznov, S.M., *Nucleic Acids Res.* 23: 2661-2668 (1994).
 Escude, C., Giovannageli, C., Sun, J.-S., Lloyd, D.-H., Chen, J.-K., Gryaznov, S.M., Garestier, T. y Helene, C.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4365-4369 (1996).
 Giovannageli, C., Diviacco, S., Labrousse, V., Gryaznov, S.M., Charneau, P. y Helene, C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*
 20 *USA* 94:79-84 (1997).
 Gryaznov, S.M. y Chen, J.-K. *J. Am. Chem. Soc.* 116:3143-3144 (1994).
 Gryaznov, S.M. et al., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 22(5-8):577-581 (2003).
 Gryaznov, S.M., Lloyd, D.H., Chen, J.-K., Schultz, R.G., DeDionisio, L.A., Ratmeyer, L. y Wilson, W.D., *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA 92:5798-5802 (1995).
 25 Gryaznov, S.M., Pongracz, K., y Matray, T., PCT Pubn. No. WO 2001/018015 (Mar 15 2001). Gryaznov, S.M.,
 Skorski, T., Cucco, C., Nieborowska-Skorska, M, Chiu, C.Y., Lloyd, D.H., Chen, J. K., Koziolkiewicz, M. y
 Calabretta, B. *Nucleic Acids Res.* 24:1508-1514 (1996).
 Matray, J.C. et al., *Nucleic Acid Research* 27(20):3976-3985 (1999).
 Nelson, J.S. et al., *J. Org. Chem.* 62:7278-7287 (1997).
 30 Pongracz, K. y Gryaznov, S.M., *Tetrahedron Letters* 40(43): 7661-7664 (1999).
 Skorski, T., Perrotti, D., Nieborowska-Skorska, M., Gryaznov, S.M. y Calabretta, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
 94:3966-3971 (1997).
 Vincente, S. et al., *J. Org. Chem.* 64:991-997 (1999). Vu, H. et al., *Tetrahedron Letters* 31(5):7269-7272 (1990).
 Wang, E.S. et al., *Blood* 103(1):258-266 (2004).
 35 Zaitseva, G.V. et al., *Nucleosides & Nucleotides* 13(1-3):819-838 (1994).
 Zaitseva, V.E. et al., *Sov. J. Bioorg. Chem.* 10(5):369-378 (transl. from *Bioorg. Khim.* 10(5):670-680) (1984).

Antecedentes de la invención

- 40 El uso de oligonucleótidos y análogos de oligonucleótidos como agentes terapéuticos, basado en la unión específica
 a secuencias de ácidos nucleicos o a proteínas diana, se ha investigado ampliamente. Se han diseñado análogos de
 oligonucleótidos estructuralmente modificados que carecen de la susceptibilidad nucleasa de los oligonucleótidos
 naturales (con enlaces fosfodiéster) y que, en algunos casos, presentan otras propiedades ventajosas tales como
 45 una unión mejorada a dianas o una especificidad de unión mejorada. Una de estas clases de análogos de
 nucleótidos es el oligonucleótido unido a fosforodiamidato N3'→P5' (Gryaznov y Chen, 1994; Chen *et al.*, 1994).
 Estos compuestos son resistentes a nucleasas, forman dupletes estables con dianas de ARN complementario y
 dupletes de ADN, y han demostrado una actividad de sentido contrario específica de secuencia tanto *in vitro* como *in*
vivo (Gryaznov *et al.*, 1995; Escude *et al.*, 1996; Gryaznov *et al.*, 1996; Giovannageli *et al.*, 1997; Skorski *et al.*,
 1997). Los oligonucleótidos de tiofosforamidato N3'→P5' relacionados retienen la elevada afinidad de unión al ARN
 50 de los fosforamidatos N3'→P5' y también muestran una estabilidad a ácidos mejorada (Pongracz y Gryaznov, 1999;
 Gryaznov *et al.*, 2001). Algunos oligonucleótidos de tiofosforamidato N3'→P5' han mostrado una prometedor
 actividad de inhibición de la telomerasa (Gryaznov *et al.*, 2003; Asai *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

- Por pasos, la preparación de oligonucleótidos de fosforamidato o de tiofosforamidato N3'→P5' controlada por
 55 secuencia, utiliza monómeros de 3'-aminonucleósidos en los que el grupo 3'-amino se protege durante la adición, y
 posteriormente se desprotege para la adición de un monómero adicional a la cadena del oligonucleótido en
 crecimiento (véanse, por ejemplo Gryaznov y Chen, 1994; Pongracz y Gryaznov, 1999). Puesto que los grupos de
 las bases de nucleósidos que normalmente se protegen durante la síntesis son grupos amino primarios, la necesidad
 de proteger el grupo 3'-amino en presencia de estos grupos ha complicado la preparación de estos monómeros. Los
 60 procedimientos existentes (véanse, por ejemplo, Nelson *et al.*, 1997; Matray *et al.*, 1999) conllevan múltiples etapas
 de protección y por lo general implican la conversión de un grupo 3'-hidroxilo en un grupo 3'-azido (-N₃), que
 posteriormente se reduce a la 3'-amina. Estos procedimientos llevan tiempo, son costosos, y dan como resultado
 bajos rendimientos globales de los monómeros. Por consiguiente, se desea mejorar la eficacia de esta síntesis, lo
 que facilitará la preparación de oligonucleótidos de fosforamidato o de tiofosforamidato N3'→P5'.

65

Sumario de la invención

La presente invención proporciona, en un aspecto, un método para preparar un monómero de adenosina, guanosina o citidina que tiene una base nucleosídica protegida y un grupo 3'-amino protegido, en el que la base y el grupo 3'-amino están protegidos ortogonalmente. En una realización, el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar un monómero de 3'-amino-3'-desoxiadenosina, citidina o guanosina en el que el grupo 5'-hidroxilo, la base nucleosídica y el grupo 3'-amino están desprotegidos;

(b) hacer reaccionar selectivamente el grupo 3'-amino con un primer grupo protector que consiste en un grupo lábil a ácidos o grupo fluorenilmetoxicarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmetoxicarbonilo;

hacer reaccionar el grupo 5'-hidroxilo con un segundo grupo protector que consiste en acilo, éter de trialkilsililo lábil a bases, o éter de sililo lábil a fluoruro; y

hacer reaccionar la base nucleosídica con un tercer grupo protector que es un grupo acilo o un grupo formamidinilo; en el que el primer grupo protector se puede eliminar del grupo 3'-amino en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica, y el segundo grupo protector se puede eliminar del grupo 5'-hidroxilo en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino. El método puede comprender además la etapa de

(c) eliminar el segundo grupo protector del grupo 5'-hidroxilo, en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino.

En una realización, el primer grupo protector es un grupo lábil a ácidos; por ejemplo, un grupo triarilmetilo, tal como trifenilmetilo (tritilo), monometoxitritilo (MMT), o dimetoxitritilo (DMT). En otra realización, el primer grupo protector es fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o uno de sus derivados, que se pueda eliminar con una amina básica tal como DBU o piperidina.

En una realización, preferentemente utilizada para un monómero de adenosina o citidina, el segundo y el tercer grupos protectores son ambos grupos acilo, por ejemplo, grupos benzoilo, y las condiciones de (c) comprenden un tratamiento suave con ion hidróxido.

En otra realización, el segundo grupo protector es un trialkil silil éter lábil a bases, por ejemplo, un éter de trimetilsililo (TMS), el tercer grupo protector es un grupo acilo, y las condiciones de (c) comprenden un tratamiento suave con ion hidróxido.

En una realización adicional, el segundo grupo protector es un éter de sililo lábil a fluoruro, el tercer grupo protector es un grupo acilo, y las condiciones de (c) comprenden tratamiento con ion fluoruro. Dichos éteres de sililo lábiles a fluoruro incluyen, por ejemplo, un terc-butildimetil silil éter, un terc-butildifenil silil éter, un difenilmetil silil éter, y un tri(isopropil) silil éter. En una realización, el éter de sililo lábil a fluoruro es un terc-butildimetil silil (TBDMS) éter.

En una realización alternativa, el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar un monómero de 3'-amino-3'-desoxiadenosina, citidina o guanosina en el que el grupo 5'-hidroxilo, la base nucleosídica y el grupo 3'-amino están desprotegidos;

(b) hacer reaccionar selectivamente el grupo 3'-amino con un primer grupo protector que consiste en un grupo lábil a ácidos o grupo fluorenilmetoxicarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmetoxicarbonilo; y

hacer reaccionar selectivamente la base nucleosídica con un grupo protector adicional que consiste en un grupo formamidinilo cuando el monómero es adenosina o guanosina o un grupo acilo cuando el monómero es citidina; en el que el primer grupo protector se puede eliminar del grupo 3'-amino en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica.

En esta realización del método, el grupo 5'-OH permanece prácticamente sin reaccionar en las condiciones de protección de la base nucleosídica, y no requiere una protección individual. En una realización, el monómero es un monómero de citidina, el primer grupo protector es como se ha descrito anteriormente, y el grupo protector adicional es un grupo acilo, preferentemente un grupo benzoilo. El grupo acilo protector se incorpora preferentemente por reacción con un anhídrido de acilo.

En otras realizaciones, el monómero es un monómero de guanosina o de adenosina, el primer grupo protector es como se ha descrito anteriormente, y el grupo protector adicional es un grupo formamidinilo, tal como un dialquilformamidinilo.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para preparar un monómero de timidina que tiene un grupo 5'-hidroxilo libre y un grupo 3'-amino protegido, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un monómero de 3'-amino-3'-desoxitimidina en el que el grupo 5'-hidroxilo y el grupo 3'-amino están desprotegidos; y

(b) hacer reaccionar selectivamente el grupo 3'-amino con un primer grupo protector que consiste en un grupo

triarilmetilo o fluorenilmtoxycarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxycarbonilo.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para preparar un monómero de timidina que tiene un grupo 3'-amino protegido, comprendiendo el método:

- 5 (a) proporcionar un monómero de 3'-amino-3'-desoxitimidina en el que el grupo 5'-hidroxilo y el grupo 3'-amino están desprotegidos;
- 10 (b) hacer reaccionar selectivamente dicho grupo 3'-amino con un primer grupo protector que consiste en un grupo lábil a ácidos o grupo fluorenilmtoxycarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxycarbonilo; y posteriormente:
- (c) fosfitilar el grupo 5'-hidroxilo.

El primer grupo protector puede ser lábil a ácidos; por ejemplo, un grupo triarilmetilo, tal como trifenilmetilo (tritilo). En otra realización, el primer grupo protector es fluorenilmtoxycarbonilo (Fmoc) o uno de sus derivados, que se pueda eliminar con una amina básica tal como DBU o piperidina.

Los monómeros de partida y finales en estos métodos sintéticos comprenden, preferentemente, un grupo 2' seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, alquilo inferior, y flúor. En realizaciones seleccionadas, el monómero comprende un grupo 2' seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, metoxi, y flúor. En una realización, el monómero es un monómero 2',3'-didesoxi, tal como el grupo 2' es hidrógeno.

En otro aspecto, la invención proporciona un monómero de adenosina, guanosina o citidina que tiene un grupo 3'-amino protegido que está protegido con un grupo lábil a ácidos o un grupo fluorenilmtoxycarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxycarbonilo y una base nucleosídica que está protegida con un grupo dialquil-formamidinilo, grupo di(cicloalquil)-formamidinilo, o grupo di(aralquil)-formamidinilo, en el que el grupo 5'-hidroxilo está desprotegido, o está protegido de tal forma que se puede desproteger en condiciones que no desprotegen dicha base nucleosídica o dicho grupo 3'-amino. En realizaciones seleccionadas, el grupo 3'-amino está protegido con un grupo protector lábil a ácidos; por ejemplo, un grupo triarilmetilo, tal como trifenilmetilo (tritilo). En otras realizaciones, el grupo 3'-amino está protegido con fluorenilmtoxycarbonilo (Fmoc) o un derivado del mismo que se pueda eliminar con una amina básica tal como DBU o piperidina.

En una realización, la base nucleosídica está protegida con un grupo acilo. Preferentemente, el grupo acilo es benzoilo cuando el monómero es un monómero de adenosina o citidina, e isobutirilo cuando el monómero es un monómero de guanosina. En otras realizaciones adicionales, la base nucleosídica está protegida con un grupo formamidinilo, preferentemente, una base nucleosídica está protegida con un grupo dialquilformamidinilo.

El grupo 5'-hidroxilo del monómero está desprotegido, o está protegido de tal forma que se puede desproteger en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino. Por ejemplo, puede estar protegido con un éter de sililo que es lábil a una base débil o al ion fluoruro, tal como se ha indicado anteriormente.

El monómero comprende preferentemente un grupo 2' seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, alquilo inferior, y flúor. En realizaciones seleccionadas, el monómero comprende un grupo 2' seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, metoxi, y flúor. En una realización, el monómero es un monómero 2',3'-didesoxi, tal como el grupo 2' es hidrógeno.

Estos y otros objetivos y características de la invención serán más evidentes en su totalidad cuando la siguiente descripción detallada de la invención se lea junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 es un esquema que muestra métodos ilustrativos alternativos para la síntesis de un monómero de 3'-aminoadenosina, que también son de aplicación para monómeros de 3'-aminocitidina, de acuerdo con diversas realizaciones de la invención;

55 la Figura 2A muestra un método ilustrativo para la síntesis de un monómero de 3'-aminoguanosina, de acuerdo con una realización de la invención;

la Figura 2B muestra un método ilustrativo alternativo para la síntesis de un monómero de 3'-aminoguanosina, de acuerdo con una realización de la invención;

la Figura 2C muestra un método para la síntesis de un monómero de 3'-aminocitidina, de acuerdo con una realización adicional de la invención; y

60 la Figura 3 muestra un método ilustrativo para la síntesis de un monómero de 3'-aminotimidina, de acuerdo con una realización adicional de la invención.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

5 Los términos siguientes tienen los siguientes significados salvo que se indique otra cosa.

"Protegido ortogonalmente", con respecto a una pluralidad de grupos funcionales protegidos en la misma molécula, indica que es posible desproteger cualquier miembro seleccionado del grupo sin desproteger el resto de grupos.

10 "Protegido selectivamente", con respecto a la protección de un grupo funcional diana en una molécula que tiene una pluralidad de grupos funcionales desprotegidos, indica que, en una reacción de la molécula con un reactivo protector, el grupo funcional diana queda protegido en mayor medida que cualquier grupo funcional no diana. La extensión de la reacción del grupo funcional diana con respecto al cualquier grupo funcional no diana es mayor de 1:1, preferentemente mayor de 2:1, y más preferentemente mayor de 3:1 o superior, por ejemplo mayor de 9:1. La misma definición se aplica a la terminología "reacción selectiva" de un grupo funcional dado con un grupo protector.

15 "Reacción con un grupo protector", tal como se usa en el presente documento, es equivalente a "proporcionar un grupo protector", "proteger con a grupo protector", o "reaccionar con un reactivo protector de grupo".

20 "Alquilo" se refiere a un resto acíclico completamente saturado que consiste en carbono e hidrógeno, que puede ser lineal o ramificado. Ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-butilo, t-butilo, n-heptilo, e isopropilo. Por lo general, se prefieren los grupos alquilo inferior, que tienen de uno a seis átomos de carbono, que se ilustran por metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, isoamilo, n-pentilo, e isopentilo. En otras realizaciones, alquilo inferior incluye grupos que tienen de uno a cuatro átomos de carbono, o 1-2 átomos de carbono (metilo y etilo).

25 "Cicloalquilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico saturado, que tiene preferentemente de 4 a 7 átomos de carbono, más preferentemente 5 o 6 (es decir ciclopentilo o ciclohexilo).

30 "Alquenilo" se refiere a un resto acíclico insaturado que consiste en carbono e hidrógeno, que puede ser lineal o ramificado, que tiene uno o más dobles enlaces. Por lo general, se prefieren los grupos alquenilo inferior, que tienen de dos a seis, o de dos a cuatro, átomos de carbono. "Alquinilo" se refiere a un resto acíclico insaturado que consiste en carbono e hidrógeno, que puede ser lineal o ramificado, que contiene uno o más triples enlaces. Por lo general, se prefieren los grupos alquinilo inferior, que tienen de dos a seis, o de dos a cuatro, átomos de carbono.

35 "Ariilo" se refiere a un radical aromático monovalente sustituido o no sustituido, que tiene por lo general un solo anillo (por ejemplo, benceno) o dos anillos condensados (por ejemplo, naftilo), donde se prefieren los grupos ariilo monocíclicos. El término incluye grupos heteroarilo, que son grupos de anillo aromático que tienen uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo, tales como furilo, pirrol, piridilo, e indol. Por "sustituido" se entiende que uno o más átomos de hidrógeno del anillo en el grupo ariilo, preferentemente uno o dos átomos de hidrógeno del anillo, está sustituido por un grupo preferentemente seleccionado entre flúor, cloro, bromo, metilo, etilo, metoxi, halometoxi, y halometilo. Los grupos ariilo preferidos para su uso en los grupos protectores son ariilos carbocíclicos, que están no sustituidos, o sustituidos por alcoxi inferior (además del sustituyente que une el grupo al resto protector).

45 "Aralquilo" se refiere a un alquilo, preferentemente un sustituyente alquilo inferior (C₁-C₄, más preferiblemente C₁-C₂), que está adicionalmente sustituido por un grupo ariilo, preferiblemente un grupo ariilo monocíclico; los ejemplos son bencilo (-CH₂C₆H₅) y fenetilo.

50 "Acilo" se refiere a un sustituyente de la forma R(C=O)-, en la que R es alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, o ariilo como se ha definido anteriormente, y se selecciona preferentemente entre alquilo inferior y ariilo carbocíclico monocíclico. Los ejemplos incluyen benzoilo (Ph(C=O)-), acetilo (CH₃(C=O)-) e isobutirilo ((CH₃)₂CH(C=O)-).

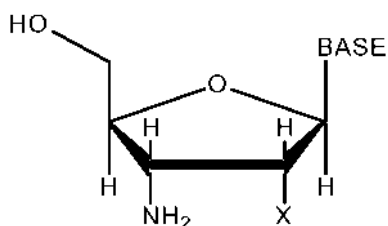
II. Síntesis de monómeros protegidos

55 La invención proporciona, en un aspecto, síntesis eficaces de monómeros de 3'-amino-5'-hidroxil nucleósidos protegidos ortogonalmente, en las que los grupos amino en la posición 3' y la base nucleosídica están protegidos ortogonalmente, a partir de los correspondientes 3'-aminonucleósidos no protegidos. Normalmente, los monómeros producto se fosfitilan a continuación en el 5'-hidroxilo libre para su uso en la síntesis de oligonucleótidos de fosforamidato o de tiofosforamidato N3'→P5'. (Véanse por ejemplo la Figura 2B y Figura 3).

60

A. Materiales de partida

El material de partida para la síntesis del monómero es un 3'-aminonucleósido que tiene la siguiente fórmula general:



donde BASE es una base nucleosídica desprotegida seleccionada entre guanina (G), adenina (A), timina (T) y citosina (C). El sustituyente 2' X puede ser hidrógeno, como en los monómeros 2',3'-didesoxi, para producir análogos de ADN. Como alternativa, X puede ser hidroxilo o alcoxi inferior, tal como metoxi, para producir ARN o análogos de O-alkil ARN. El sustituyente 2' también puede ser flúor (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.684.143) o alquilo inferior, tal como metilo.

Los 3'-amino-2',3'-didesoxinucleósidos, útiles como materiales de partida en las síntesis del presente documento, se pueden obtener comercialmente de Metkinen Oy, situada en Littoinen, Finlandia. El material de partida de 3'-amino-2',3'-didesoxitimidina también está disponible en el mercado de varias fuentes tales como Dalton Chemical Labs (Toronto, Canadá) y MP Biomedicals Inc. (Irvine, CA). Varias preparaciones sintéticas de los 3'-amino-2',3'-didesoxinucleósidos se han notificado en la bibliografía (por ejemplo Zaitseva *et al.*, 1994; Cech *et al.*, 1996; Zaitseva *et al.*, 1984). De acuerdo con Zaitseva *et al.*, 1994, la 3'-amino-2',3'-didesoxitimidina se puede convertir en los correspondientes monómeros de adenosina o guanosina mediante transglicolación enzimática.

B1. Estrategias de protección: Descripción general

De acuerdo con la invención, se proporcionan procedimientos eficaces para convertir los nucleósidos anteriormente representados gráficamente en los correspondientes monómeros 3'-amino-protegidos (en el caso de A, G, y C). Como los grupos de las bases que se deben proteger son también grupos amino, la protección selectiva del grupo 3'-amino en presencia de la base no protegida, o viceversa, no se ha conseguido satisfactoriamente en el pasado, y los procedimientos existentes para la preparación de estos monómeros (véase, por ejemplo, Nelson *et al.*, 1997) conlleva múltiples etapas de protección y por lo general implica la conversión de un grupo 3'-hidroxilo en un grupo azida, que posteriormente se reduce a la 3'-amina.

Los presentes inventores han proporcionado métodos eficaces para proteger selectivamente el grupo 3'-amino en presencia de las bases nucleosídicas, de forma que la base nucleosídica se puede proteger posteriormente con un grupo protector ortogonal; es decir, uno que no se pueda eliminar en las condiciones seleccionadas que son eficaces para eliminar el grupo protector en 3'-amino (o el grupo protector en 5'-hidroxilo, si está presente).

Además, el grupo 3'-amino también está protegido selectivamente en presencia del grupo 5'-hidroxilo o viceversa. Por consiguiente, es posible proporcionar el 5'-hidroxilo libre con un grupo protector, que se puede eliminar en condiciones seleccionadas que no eliminan ni el grupo protector de 3'-amino o el grupo protector de la base. (Como alternativa, como en el caso de la timidina, el grupo 5'-hidroxilo libre se puede fosfilar directamente).

El grupo protector del 5'-hidroxilo puede ser, por ejemplo, un grupo sililo, que se puede eliminar en condiciones, tales como una base débil o ion fluoruro, que no eliminan los grupos protectores (normalmente grupos acilo o amidinilo) usados con la base nucleotídica. Como alternativa, el mismo grupo protector (tal como un grupo acilo) se puede usar para el 5'-hidroxilo y la base nucleotídica, donde las condiciones utilizadas para su eliminación (por ejemplo, base débil) que desprotegerán el grupo hidroxilo no desprotegerán los grupos amino de la base nucleotídica.

En una estrategia adicional, la base nucleotídica se puede proteger en condiciones que dejan el grupo 5'-hidroxilo sin reaccionar y que, por tanto, no requieren protección.

En todos los casos, los grupos protectores empleados para las bases nucleotídicas son estables en las condiciones de acoplamiento de monómeros utilizadas en la síntesis de oligonucleótidos. Los procedimientos para preparar oligonucleótidos de fosoramidato o de tiofosoramidato N3'→P5' a partir de los monómeros descritos en el presente documento se describen, por ejemplo, en Gryaznov y Chen (1994) y Pongracz and Gryaznov (1999).

B2. Estrategias de protección: monómeros A, G, y C

La invención proporciona, para monómeros de adenosina, guanosina o citidina, métodos para preparar dichos monómeros que tienen un grupo 5'-hidroxilo libre, una base nucleosídica protegida, y un grupo 3'-amino protegido, donde la base y el grupo 3'-amino están protegidos ortogonalmente, tal como se define anteriormente. El material de partida es un monómero de 3'-amino-3'-desoxiadenosina, citidina o guanosina en el que el grupo 5'-hidroxilo, la base nucleosídica y el grupo 3'-amino están desprotegidos.

En una estrategia general, el método comprende hacer reaccionar selectivamente el grupo 3'-amino con un primer grupo protector, hacer reaccionar el grupo 5'-hidroxilo con un segundo grupo protector, y hacer reaccionar la base nucleosídica con un tercer grupo protector. El primer grupo protector (para el 3'-amino) es tal que se puede eliminar del grupo 3'-amino en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica. Además, el segundo grupo protector (para el 5'-hidroxilo), cuando está presente, es tal que se puede eliminar del grupo 5'-hidroxilo en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino.

Una vez que los grupos reactivos deseados se han protegido, de acuerdo con la estrategia general anterior, el segundo grupo protector, si se encuentra presente, se elimina del grupo 5'-hidroxilo, en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino. A continuación, el monómero se puede fosfilar, por ejemplo, para su uso en la síntesis de oligonucleótidos.

Normalmente, el primer, segundo y tercer grupos protectores se aplican en dicho orden, aunque el segundo y el tercer grupos pueden, realmente, ser el mismo y, por tanto, aplicarse en una única reacción. Además, la protección del grupo 5'-hidroxilo, en las estrategias que utilizan esta etapa, se puede llevar a cabo antes o después de la protección del grupo 3'-amino. Las dos reacciones se suelen llevar a cabo en el mismo recipiente de reacción, aunque preferentemente, los agentes no se añaden simultáneamente. Preferentemente, el reactivo protector de 3'-amino se añade en primer lugar, como se ilustra en los ejemplos siguientes.

En realizaciones seleccionadas, la protección transitoria del grupo 5'-hidroxilo con una base lábil de éter de sililo (por ejemplo, TMS) se utiliza durante la etapa de protección de la base, tal como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1 (conversión de la estructura **2** en la estructura **6**) y en la Fig. 2B, como se analiza más adelante de forma detallada.

En otras realizaciones, el grupo 5'-hidroxilo y las bases nucleotídicas se protegen con el mismo reactivo, seguido de la desprotección selectiva del grupo hidroxilo. Dicho reactivo suele ser un agente acilante, por ejemplo, un haluro de isobutirilo o un haluro de benzoilo. Un esquema ilustrativo de este tipo se muestra en la conversión de la estructura **2** en la **3** en la Fig. 1, seguido de tratamiento con base en condiciones suaves para desproteger selectivamente el grupo hidroxilo (conversión de **3** en **6**).

Como se ha mencionado anteriormente, el primer grupo protector, para proteger el grupo 3'-amino, es uno que es estable en las condiciones que pueden eliminar el segundo grupo protector (del 5'-hidroxilo), cuando está presente, pero es lábil en condiciones que no eliminan el tercer grupo protector (para la base nucleosídica). En una realización, el primer grupo protector es lábil a ácidos; por ejemplo, un grupo triarilmetilo tal como tritilo (trifenilmetilo), monometoxitritilo (MMT), o dimetoxitritilo (DMT).

Otro grupo útil como el primer grupo protector es fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), que se puede eliminar mediante escisión no hidrolítica con una amina básica, tal como DBU, morfolina, o piperidina. Una base de hidróxido (por ejemplo NaOH) no es adecuada para este fin, ya que este reactivo normalmente eliminará también otros grupos protectores de la molécula. También se pueden usar derivados de Fmoc que se pueden eliminar por un mecanismo similar. Dichos derivados incluyen aquellos en los que el grupo fluorenilo del Fmoc está sustituido, normalmente en la posición 2 y/o 7, por un grupo, tal como un grupo alquilo inferior, que no afectará negativamente al mecanismo de escisión, o con un grupo electroatrayente, tal como halógeno, que aumenta la labilidad a bases del grupo protector (Carpino *et al.*, 1980). También se incluyen los análogos de dióxido de tioxanteno descritos en Carpino *et al.*, 1989.

La Figura 1 muestra permutaciones ilustrativas de una estrategia sintética que se puede usar en la preparación de los monómeros sujeto. Estos métodos son especialmente adecuados para los monómeros nucleósidos A (adenosina) y C (citosina). Como se describe a continuación, los métodos también se pueden usar, preferentemente con algunas modificaciones, para monómeros G (guanosina). En las estrategias ilustradas en las Figs. 1 y 2A-B, se usa protección del 5'-hidroxilo. La Fig. 2C, analizada más detalladamente a continuación, ilustra una estrategia en la que no se utiliza protección del 5'-hidroxilo.

Como se ha mencionado anteriormente, un primer grupo protector preferido (para el grupo 3'-amino) es un grupo lábil a ácidos, tal como tritilo, MMT, o DMT, o un grupo, tal como Fmoc, que es lábil a un reactivo de amina básico tal como DBU. En una realización, los segundo y el tercer grupos protectores preferidos son ambos grupos aracilo, por ejemplo, grupos benzoilo. Las condiciones que son eficaces para desproteger el grupo 5'-hidroxilo en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino, en este caso, comprenden preferentemente un tratamiento suave con base, tal como un tratamiento con hidróxido, por ejemplo hidróxido de amonio. Dicho tratamiento es eficaz para eliminar el grupo acilo del 5'-hidroxilo y para convertir la base diacilada en la base monoacilada. Dicho esquema se ilustra en la Fig. 1, en la conversión del compuesto intermedio **3** en el producto **6**.

En otra realización, el segundo grupo protector, para la protección del grupo 5'-hidroxilo, es un éter de trialkilsililo lábil a bases, preferentemente TMS, y el tercer grupo protector (para la protección de la base nucleotídica) es un grupo acilo, tal como un alcanóilo, preferentemente isobutirilo, o un grupo benzoilo. De nuevo, las condiciones que son eficaces para desproteger el grupo 5'-hidroxilo en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino, en este caso, comprenden preferentemente un tratamiento suave con base, por ejemplo, tratamiento con hidróxido. Dicho tratamiento es eficaz para escindir un éter de trimetilsililo y para convertir la base diacilada, si

se encuentra presente, en la base monoacilada. Un ejemplo de este esquema también se ilustra en la Fig. 1, en la conversión del compuesto intermedio **2** en el producto **6**.

Otro tipo preferido de grupo protector para la base nucleotídica, particularmente para los monómeros de adenosina y guanosina, es un grupo protector de formamidinilo, tal como un grupo dialquil-formamidinilo, di(cicloalquil)-formamidinilo, o di(aralquil)-formamidinilo, donde "alquilo" es, preferentemente, C₁-C₄ y "cicloalquilo" es, preferentemente, C₅-C₆. Los ejemplos específicos incluyen dimetilformamidinilo y dibencilformamidinilo. Estos grupos protectores se pueden eliminar, por lo general, de las bases nucleotídicas (por ejemplo, al final de la síntesis) en condiciones más suaves de las utilizadas para eliminar los grupos protectores de benzoílo o isobutirilo. Véanse, por ejemplo, Vu *et al.*, 1990, Vincent *et al.*, 1999, y/o la patente de Estados Unidos n.º 5.281.701. Tal como se describe en el presente documento, la reacción de una amina primaria con una dimetil acetal dialquilformamida, por ejemplo, proporciona la amina protegida con dialquilformamidinilo. La desprotección se puede llevar a cabo, generalmente, por tratamiento con una solución acuosa o alcohólica de hidróxido de amonio a temperatura ambiente a aproximadamente 55°C.

En una realización adicional, el segundo protector (para proteger el 5'-hidroxilo) es un éter de sililo lábil a fluoruro, y el tercer grupo protector (para la base nucleosídica) es un grupo acilo, tal como un grupo benzoílo, o un grupo formamidinilo como se ha descrito anteriormente. En este caso, las condiciones que son eficaces para desproteger el grupo 5'-hidroxilo, en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino, comprenden preferentemente tratamiento con ion fluoruro, por ejemplo, fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF). Dicho tratamiento es eficaz para escindir el éter de sililo y convertir la base diacilada, si se encuentra presente, en la base monoacilada. Un ejemplo de este esquema también se ilustra en la Fig. 1, en la conversión del compuesto intermedio **5** en el producto **6**. Los éteres de sililo lábiles a fluoruro ilustrativos incluyen, por ejemplo, terc-butildimetil silil éter, terc-butildifenil silil éter, difenilmetil silil éter, tri(isopropil) silil éter, y otros conocidos en la técnica.

Los métodos anteriores también se pueden utilizar, con algunas modificaciones relativas principalmente a la solubilidad, para los monómeros de guanosina (G). En una realización, que se ilustra en la Figura 2A, el grupo 5'-hidroxilo del monómero de partida **7** se protege con un grupo lipófilo, tal como TBDMS, en una etapa temprana del proceso, para facilitar la solubilidad en el disolvente convencional piridina.

Como se ha mencionado anteriormente, un primer grupo protector preferido (para el grupo 3'-amino) es un grupo lábil a ácidos, tal como tritilo, DMT, o MMT, o un grupo, tal como Fmoc, que es lábil a un reactivo de amina básico tal como DBU. En la realización de la Fig. 2A se emplea un grupo tritilo.

Dependiendo de las condiciones de reacción, se pueden observar pequeñas cantidades (por ejemplo, aproximadamente un 5 %) del compuesto ditritilado **9** además del compuesto **8** deseado 3'-monotritilado. Por consiguiente, "protección selectiva" tal como se usa en el presente documento, indica que la molécula que tiene el estado de protección deseado se forma en mayor medida, es decir, en una relación mayor de 1:1, que las moléculas en las que los grupos funcionales no diana están protegidos, tanto de forma exclusiva o además del grupo funcional diana. Preferentemente, la relación es mayor de 2:1, más preferentemente mayor de 3:1, y lo más preferido mayor de 9:1.

El segundo grupo protector (para el 5'-hidroxilo) es, en esta realización, un éter de sililo lábil a fluoruro y, más preferentemente, un grupo que mejora la solubilidad del compuesto intermedio. Se descubrió que un éter de TBDMS, como se muestra en la Fig. 2A, mejoraba la solubilidad en el disolvente piridina.

El tercer grupo protector es, preferentemente, un grupo acilo, por ejemplo, un grupo isobutirilo, o un grupo formamidinilo, como se ha descrito anteriormente. Las condiciones que son eficaces para desproteger el grupo 5'-hidroxilo, en condiciones que no desprotegen la base nucleosídica o el grupo 3'-amino, comprenden preferentemente tratamiento con ion fluoruro, por ejemplo, fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF). Dicho tratamiento es eficaz para escindir el éter de sililo en el compuesto **10** sin afectar los grupos isobutirilo o tritilo, como se muestra en la Fig. 2A.

En otra realización, tal como se ilustra en la Figura 2B, un disolvente más polar, como DMF, se utiliza para solubilizar el monómero de partida **7** y, por otra parte, el esquema de reacción es similar al esquema de la "protección transitoria" (usando un éter de TMS como el grupo protector del 5'-hidroxilo) mostrado para el monómero de adenosina **1** en la Fig. 1.

La Figura 2C ilustra una realización de una estrategia sintética, especialmente aplicable a los monómeros de citidina, en el que no se emplea la protección del 5'-hidroxilo. En este esquema de reacción, tras la protección selectiva del grupo 3'-amino del monómero **12** con, por ejemplo, un grupo tritilo, el grupo amino exocíclico de esta base se hace reaccionar con un anhídrido de acilo, tal como anhídrido de benzoílo. El disolvente preferiblemente contiene un alcohol, que se cree compite con una reacción de supresión del grupo 5'-hidroxilo. Los ejemplos incluyen metanol, etanol, y mezclas de estos disolventes con, por ejemplo, acetonitrilo, DMF, o piridina. En la reacción que utiliza anhídrido de benzoílo en etanol o en acetonitrilo:metanol 9:1, como se describe en el Ejemplo 4, se observó poco (< 5 %) producto 5'-benzoilado. El monómero de 5'-hidroxilo **14** predominante se puede fosfilar después por métodos

convencionales.

En otra realización, particularmente aplicable a los monómeros de adenosina o guanosina, tras la protección selectiva del grupo 3'-amino del monómero con, por ejemplo, un grupo tritilo, el grupo amino exocíclico de esta base se protege con un grupo dialquilformamidinilo, grupo di(cicloalquil)formamidinilo, o grupo dibencilformamidinilo, preferentemente un grupo dimetilformamidinilo. El grupo 5'-hidroxilo, que se espera que permanezca práctica o totalmente sin reaccionar durante estas etapas, se puede fosfitilar después por métodos convencionales.

B3. Estrategias de protección: Monómero T

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar un monómero de timidina que tiene un grupo 5'-hidroxilo libre y un grupo 3'-amino protegido. La estrategia sintética difiere de la anteriormente descrita, en que la base timina no suele necesitar protección en condiciones de síntesis de oligonucleótidos. En este caso, el material de partida es un monómero de 3'-amino-3'-desoxitimidina en el que el grupo 5'-hidroxilo y el grupo 3'-amino están desprotegidos, y el método comprende hacer reaccionar selectivamente dicho grupo 3'-amino con un primer grupo protector, de tal forma que el grupo 5'-hidroxilo permanece sustancialmente desprotegido.

Como en las síntesis anteriormente descritas, un grupo protector preferido para el grupo 3'-amino es un grupo lábil a ácidos, tal como un grupo triarilmetilo, o un grupo, tal como Fmoc, que es lábil a un reactivo de amina básico tal como DBU. En la realización de la Fig. 3 se emplea un grupo tritilo.

A continuación, el grupo 5'-hidroxilo se puede fosfitilar, como se describe, por ejemplo en el Ejemplo 5 siguiente. A destacar que este proceso de fosfitilación también es de aplicación a cualquiera de los monómeros con protección en el grupo 5'-hidroxilo y 3'-amino y en la base anteriormente descritos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran, pero no se pretende que limiten la invención. Por ejemplo, las condiciones de reacción, tales como la selección del disolvente, catalizador (por ejemplo, trietilamina o diisopropil etil amina), tiempos de reacción y temperaturas de reacción, pueden variar por lo general de los ilustrados a continuación, de acuerdo con el conocimiento del experto en la técnica, usando experimentación rutinaria. En algunos casos, el orden de adición de reactivos podría variar. Los disolventes adecuados para la mayoría de estas reacciones, cuando no se indica otra cosa, incluyen por lo general disolventes apróticos polares tales como piridina, DMF, acetonitrilo, o mezclas de los mismos. Las temperaturas adecuadas están generalmente comprendidas en el intervalo de -10°C a temperatura ambiente a aproximadamente 55°C.

Ejemplo 1. Síntesis de N⁶-benzoil-3'-aminotritil-2',3'-dideoxiadenosina a partir de 3'-amino-2',3'-dideoxiadenosina

A. Método 1: Ruta de perbenzoilación (como se ilustra en la Fig. 1, 1→2→3→6)

El monómero de partida, 3'-amino-2',3'-dideoxiadenosina(1, 10 mmol), se evaporó simultáneamente con piridina seca, después, se suspendió en 100 ml de piridina seca que contenía 6 equiv. de trietilamina, y la mezcla se calentó a 50°C con agitación. Se añadió cloruro de tritilo (1,1 equiv.), y la agitación se continuó durante dos horas a 50°C. La solución transparente obtenida que contenía el monómero 3'-tritilado **2** se enfrió a 0°C, se añadieron 5 equiv. de cloruro de benzoilo gota a gota, y la mezcla de reacción se agitó durante una hora y después se vertió en 100 ml de bicarbonato sódico al 5 % frío. La goma de color amarillo precipitada se extrajo con acetato de etilo, y la solución de acetato de etilo se evaporó. El aceite resultante (**3**, que tiene un grupo benzoilo en el 5'-hidroxilo y dos en N⁶ de la base) se disolvió en 50 ml de piridina:metanol:agua 65:35:5 v/v/v, la solución se enfrió a 0°C, y se añadieron 50 ml de hidróxido sódico 2 M. Después de 25 min de agitación a 0°C, la mezcla de reacción se neutralizó con clorhidrato de piridinio, y el volumen de la mezcla se redujo por evaporación. Tras dilución con acetato de etilo, la capa orgánica se separó y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se evaporó al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida de gel de sílice usando un sistema disolvente de cloruro de metileno:metanol 95:5 v/v. El rendimiento del producto aislado (**6**), que tiene un grupo 5'-hidroxilo libre y la base monobenzoilada, fue 2,0 g (33,6 %)

B. Método 2: Ruta de protección transitoria (como se muestra en la Fig. 1, 1→2→6)

El monómero de partida, 3'-amino-2',3'-dideoxiadenosina(1, 10 mmol), se convirtió en el monómero 3'-protegido **2** como se ha descrito anteriormente, es decir, por tratamiento con 1,1 equiv. de cloruro de tritilo en piridina seca que contenía 6 equiv. de trietilamina a 50°C.

La solución transparente de **2** se enfrió a 0°C, y se añadieron 5 equiv. de clorotrimetilsilano gota a gota, seguido de agitación durante 30 min, produciendo un compuesto intermedio de 5'-OTMS. A continuación se añadió cloruro de benzoilo (5 equiv.) gota a gota, seguido de agitación durante dos horas a temperatura ambiente, produciendo un compuesto intermedio de base protegida con monobenzoilo y/o dibenzoilo.

La mezcla de reacción se enfrió a 0°C, y se añadieron 20 ml de agua fría, seguido de 20 min de agitación y la adición de 20 ml de una solución concentrada de hidróxido de amonio. La agitación se continuó durante 30 min, y la solución se concentró al vacío. El residuo oleoso se recogió en acetato de etilo y se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico, y la solución se secó y se evaporó al vacío. El producto se purificó como anteriormente por cromatografía sobre gel de sílice. El rendimiento del producto aislado (**6**) fue 3,6 g (60,2 %).

En procedimientos posteriores, DMF o DMF/piridina, con adición de trietilamina, se usó como disolvente en la reacción de tritilación inicial, y el compuesto intermedio **2** se hizo reaccionar adicionalmente, usando cualquiera del Método A o Método B, para dar el producto **6** con un rendimiento de aproximadamente el 70 %. Se encontró que los rendimientos mejoraban algo por eliminación de trietilamina (por ejemplo, mediante lavado acuoso) antes de la benzoylación, particularmente cuando se usa el Método A. Se observó que este tratamiento evitaba la formación de un producto secundario, que se creía resultado de la apertura del anillo de la base adenina. La formación de este producto secundario también se eliminó aislando el producto tritilado **2** antes de la reacción posterior.

15 C. Método 3: Ruta de protección TBDMS (como se ilustra en la Fig. 1, 1→2→4→5→6)

El monómero de partida, 3'-amino-2',3'-didesoxiadenosina(**1**, 10 mmol), se convirtió en el monómero 3'-protegido **2** como se ha descrito anteriormente, es decir, por tratamiento con 1,1 equiv. de cloruro de tritilo en piridina seca que contenía 6 equiv. de trietilamina a 50°C.

A la solución transparente se añadieron 2 equiv. de cloruro de terc-butildimetilsililo (TBDMS Cl), y la agitación continuó durante la noche a temperatura ambiente. Esta solución (del siloxi intermedio **4** 3'-tritilamino-5'-TBDM) se enfrió a -5°C, y se añadieron 3 equiv. de cloruro de benzoilo gota a gota, seguido por agitación a temperatura ambiente durante dos horas, proporcionando el intermedio de N⁶-dibenzoilo **5**. La solución se concentró al vacío, y el residuo oleoso se recogió en acetato de etilo, se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico, se secó y se evaporó al vacío.

El residuo oleoso obtenido se disolvió en 100 ml de THF, y se añadieron 2 equiv. de TBAF (fluoruro de tetrabutilamonio). La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, y la solución se lavó con bicarbonato sódico, citrato de sodio 0,5 M (pH 4) y salmuera. El producto se purificó como anteriormente por cromatografía sobre gel de sílice para dar 3,3 g (55,5 %) del compuesto **6** puro.

35 Ejemplo 2. Síntesis de N⁴-benzoil-3'-aminotritil-2',3'-didesoxicitidina

La síntesis de N⁴-benzoil-3'-aminotritil-2',3'-didesoxicitidina a partir de 3'-amino-2',3'-didesoxicitidina puede realizarse de una manera similar, usando cualquiera de los procedimientos anteriores, o de acuerdo con el método del Ejemplo 4, a continuación.

40 Ejemplo 3. Síntesis de N²-isobutiril-3'-aminotritil-2',3'-didesoxiguanosina a partir de 3'-amino-2',3'-didesoxiguanosina (Fig. 2A)

El material de partida, 3'-amino-2',3'-didesoxiguanosina (7, 2 g), se evaporó simultáneamente con piridina seca, a continuación se suspendió en 100 ml de piridina seca y 6 equiv. de diisopropiletilamina. Se añadió cloruro de terc-butildimetilsililo (2 equiv.), produciendo un siloxi intermedio 5'-TBDM. Después de 30 min de agitación, se añadieron 1,1 equiv. de cloruro de tritilo en dos porciones, y la agitación continuó durante la noche a temperatura ambiente. Se detectaron dos compuestos mediante TLC, siendo el producto más abundante de menor recorrido **8** la 5'-TBDMS-3'-aminotritil-2',3'-didesoxiguanosina deseada. El compuesto **9**, menos abundante y de mayor recorrido, está tritilado en la base. El compuesto **8** monotritilado se aisló por cromatografía sobre gel de sílice usando un sistema disolvente de cloruro de metileno:metanol:trietilamina 94:5:1 v/v/v.

Este producto se evaporó simultáneamente con piridina seca y se disolvió en 100 ml de piridina. La solución se enfrió a 0°C, y se añadieron 1,1 equiv. de cloruro de isobutirilo, seguido de agitación durante 30 min. Después de inactivar la reacción con metanol y evaporación al vacío, la reacción se trató con cloruro de metileno-bicarbonato sódico. La fase orgánica se secó con sulfato sódico y se evaporó al vacío. El residuo oleoso (el monómero **10** completamente protegido) se disolvió en 100 ml de tetrahidrofurano, y se añadieron 5 equiv. de fluoruro de tetrabutilamonio. La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche, a continuación se diluyó con acetato de etilo, se lavó con bicarbonato sódico. Después de secar con sulfato sódico el disolvente se evaporó al vacío para dar 2 g del producto de 5'-hidroxilo **11** (46,1 %).

En procedimientos posteriores, la tritilación de **7** se llevó a cabo en DMF/piridina a 50°C, y el producto secundario **9** (<5 %) se retiró mediante precipitación del producto predominante **8** en diclorometano o agua. La base nucleotídica se protegió usando bien el esquema de protección transitoria de la Fig. 2B o una reacción de peracilación (análogo al Ejemplo 1A). El producto **11** se aisló, tras cristalización en CH₃CN, en rendimientos de aproximadamente 60 % y 53 %, respectivamente. También se observó que los rendimientos mejoraban cuando se ponía cuidado en evitar la hidrólisis del reactivo de cloruro de acilo.

Ejemplo 4. Síntesis de N⁴-benzoil-3'-aminotritil-2',3'-didesoxicitidina a partir de 3'-amino-2',3'-didesoxicitidina (como se ilustra en la Fig. 2C)

5 El grupo 3'-amino del material de partida **12** se hizo reaccionar con cloruro de tritilo en piridina:DMF 1:4 en presencia de trietilamina. El compuesto intermedio **13** se hizo reaccionar con anhídrido de benzoílo en CH₃CN:MeOH 9:1 a 50°C. El producto deseado **14** se aisló, tras cromatografía sobre gel de sílice, con un 70 % de rendimiento.

Ejemplo 5. Síntesis de 3'-aminotritil-3'-desoxitimidina-5'-(2-cianoetilo, N,N-diisopropil)fosforamidita a partir de 3'-amino-3'-desoxitimidina, seguido de fosfitilación (como se ilustra en la Fig. 3)

10 El material de partida, 3'-amino-3'-desoxitimidina (**15**, 1,3 g) se evaporó simultáneamente con piridina seca, se disolvió a continuación en 30 ml de piridina seca. A esta solución se añadieron 5 equiv. de diisopropiletilamina o trietilamina, seguido de 10 min de agitación y adición de 1 a 1,1 equiv. de cloruro de tritilo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche (o, como alternativa, a 50°C durante 1 hora). Tras la desaparición del material de partida según TLC, la reacción se inactivó con metanol y la solución se evaporó al vacío. El aceite obtenido se disolvió en cloruro de metileno, se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico, se secó con sulfato sódico y se concentró. La precipitación con cloruro de metileno-hexano proporcionó 2,2 g (85 %) del producto **16** en forma de un polvo de color blanco.

20 El producto **16** (1,7 g) se evaporó simultáneamente con piridina seca y se disolvió en 100 ml de cloruro de metileno seco. A esta solución se añadieron 4 equiv. de diisopropiletilamina, seguido de 1,2 equiv. de 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforamidita. La reacción se controló por TLC y, tras la desaparición del material de partida, la solución se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico, se secó con sulfato sódico y se evaporó al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida de gel de sílice usando un sistema disolvente de cloruro de metileno:triethylamina 10:1 v/v para producir 2 g (83,3 %) del monómero **17** fosfitilado en forma de una espuma sólida. El rendimiento global del procedimiento fue del 70,8 %.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un monómero de adenosina, guanosina o citidina que tiene una base nucleosídica protegida y un grupo 3'-amino protegido, en el que dicha base y dicho grupo 3'-amino están protegidos ortogonalmente, comprendiendo el método:
- 5 (a) proporcionar un monómero de 3'-amino-3'-desoxi adenosina, citidina o guanosina en donde el grupo 5'-hidroxilo, la base nucleosídica y el grupo 3'-amino están desprotegidos;
- 10 (b) hacer reaccionar selectivamente dicho grupo 3'-amino con un primer grupo protector que consiste en un grupo lábil a ácidos o grupo fluorenilmetoxicarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmetoxicarbonilo; hacer reaccionar dicho grupo 5'-hidroxilo con un segundo grupo protector que consiste en acilo, éter de trialkilsililo lábil a bases o éter de sililo lábil a fluoruro y hacer reaccionar dicha base nucleosídica con un tercer grupo protector que es un grupo acilo o un grupo formamidinilo;
- 15 en donde dicho primer grupo protector se puede eliminar de dicho grupo 3'-amino en condiciones que no desprotegen dicha base nucleosídica, y dicho segundo grupo protector se puede eliminar de dicho grupo 5'-hidroxilo en condiciones que no desprotegen dicha base nucleosídica o dicho grupo 3'-amino.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el tercer grupo protector es un grupo acilo.
- 20 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además la etapa de (c) eliminar dicho segundo grupo protector de dicho grupo 5'-hidroxilo en condiciones que no desprotegen dicha base nucleosídica o dicho grupo 3'-amino.
4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho primer grupo protector es un grupo lábil a ácidos.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho primer grupo protector es triarilmetilo.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho primer grupo protector es trifenilmetilo.
- 30 7. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho monómero es un monómero de adenosina o de guanosina.
8. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dichos segundo y tercer grupos protectores son grupos acilo.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que dichos segundo y tercer grupos protectores son grupos benzoílo.
10. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho segundo grupo protector es un trialkil silil éter lábil a bases y dicho tercer grupo protector es un grupo acilo.
- 40 11. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho segundo grupo protector es un éter de sililo lábil a fluoruro y dicho tercer grupo protector es un grupo acilo.
12. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho monómero comprende un grupo 2' seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ y flúor.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho monómero es un monómero 2',3'-didesoxi, de tal forma que dicho grupo 2' es hidrógeno.
14. Un método para preparar un monómero de adenosina, de guanosina o de citidina que tiene un grupo 5'-hidroxilo libre, una base nucleosídica protegida y un grupo 3'-amino protegido, en donde dicha base y dicho grupo 3'-amino están protegidos ortogonalmente, comprendiendo el método:
- 50 (a) proporcionar un monómero de 3'-amino-3'-desoxi adenosina, citidina o guanosina en donde el grupo 5'-hidroxilo, la base nucleosídica y el grupo 3'-amino están desprotegidos;
- 55 (b) hacer reaccionar selectivamente dicho grupo 3'-amino con un primer grupo protector que consiste en un grupo lábil a ácidos o grupo fluorenilmetoxicarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmetoxicarbonilo; y
- (c) hacer reaccionar selectivamente dicha base nucleosídica con un grupo protector adicional que consiste en un grupo formamidinilo cuando el monómero es adenosina o guanosina o un grupo acilo cuando el monómero es citidina;
- 60 en donde dicho primer grupo protector se puede eliminar de dicho grupo 3'-amino en condiciones que no desprotegen dicha base nucleosídica.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el grupo protector adicional consiste en un grupo dialquilformamidinilo, di(cicloalquil)formamidinilo o di(aralquil)formamidinilo donde el monómero es adenosina o guanosina.
- 65

16. El método de la reivindicación 15, en el que el grupo dialquilformamidinilo o dicicloalquilformamidinilo es tal que el alquilo es alquilo C₁-C₄ y el cicloalquilo es cicloalquilo C₅-C₆.
- 5 17. El método de la reivindicación 14, en el que dicho monómero es un monómero de citidina y dicha reacción con un grupo protector adicional comprende la reacción con un anhídrido de acilo.
18. El método de la reivindicación 14, en el que dicho primer grupo protector es triarilmetilo.
- 10 19. El método de la reivindicación 18, en el que dicho primer grupo protector es trifenilmetilo.
20. El método de la reivindicación 19, en el que dicho monómero es adenosina o guanosina y dicho grupo protector adicional es un grupo dimetilformamidinilo o un grupo dibencilformamidinilo.
- 15 21. El método de la reivindicación 20, en el que dicho grupo protector adicional es un grupo dimetilformamidinilo.
22. El método de la reivindicación 14, en el que dicho monómero comprende un grupo 2' seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ y flúor.
- 20 23. El método de la reivindicación 14, en el que dicho monómero es un monómero 2',3'-didesoxi, de tal forma que dicho grupo 2' es hidrógeno.
24. Un método para preparar un monómero de timidina que tiene un grupo 5'-hidroxilo libre y un grupo 3'-amino protegido, comprendiendo el método:
- 25 (a) proporcionar un monómero de 3'-amino-3'-desoxitimidina en el que el grupo 5'-hidroxilo y el grupo 3'-amino están desprotegidos; y
(b) hacer reaccionar selectivamente dicho grupo 3'-amino con un primer grupo protector que consiste en un grupo triarilmetilo o fluorenilmtoxocarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxocarbonilo.
- 30 25. El método de la reivindicación 24, en el que dicho primer grupo protector es trifenilmetilo.
26. El método de la reivindicación 24, en el que dicho primer grupo protector es un grupo fluorenilmtoxocarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxocarbonilo.
- 35 27. Un método para preparar un monómero de timidina que tiene un grupo 3'-amino protegido, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar un monómero de 3'-amino-3'-desoxitimidina en el que el grupo 5'-hidroxilo y el grupo 3'-amino están desprotegidos;
- 40 (b) hacer reaccionar selectivamente dicho grupo 3'-amino con un primer grupo protector que consiste en un grupo lábil a ácidos o un grupo fluorenilmtoxocarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxocarbonilo; y posteriormente:
(c) fosfitilar el grupo 5'-hidroxilo.
- 45 28. El método de la reivindicación 27, en el que dicho primer grupo protector es lábil a ácidos.
29. El método de la reivindicación 28, en el que dicho primer grupo protector es triarilmetilo.
- 50 30. El método de la reivindicación 27, en el que dicho primer grupo protector es un grupo fluorenilmtoxocarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxocarbonilo.
31. Un monómero de adenosina, guanosina o citidina que tiene un grupo 3'-amino protegido que está protegido con un grupo lábil a ácidos o un grupo fluorenilmtoxocarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxocarbonilo y una base nucleosídica que está protegida con un grupo dialquilformamidinilo, di(cicloalquil)formamidinilo o di(aralquil)formamidinilo, en donde el grupo 5'-hidroxilo está desprotegido o está protegido de tal forma que se puede desproteger en condiciones que no desprotegen dicha base nucleosídica o dicho grupo 3'-amino.
- 55 32. El monómero de la reivindicación 31, en el que el grupo dialquilformamidinilo o dicicloalquilformamidinilo es tal que el alquilo es alquilo C₁-C₄ y el cicloalquilo es cicloalquilo C₅-C₆.
- 60 33. El monómero de la reivindicación 31, en el que dicho grupo 3'-amino está protegido con un grupo fluorenilmtoxocarbonilo o un derivado de un grupo fluorenilmtoxocarbonilo.
- 65 34. El monómero de la reivindicación 31, en el que dicho grupo protector lábil a ácidos es un grupo triarilmetilo.
35. El monómero de la reivindicación 31, en el que dicha base nucleosídica está protegida con un grupo

dimetilformamidinilo o un grupo dibencilformamidinilo.

36. El monómero de la reivindicación 31, en el que dicha base nucleosídica está protegida con un grupo dialquilformamidinilo.

5

37. El monómero de la reivindicación 36, en donde dicho monómero es un monómero de adenosina o de guanosina.

38. El monómero de la reivindicación 31, que tiene un grupo 5'-hidroxilo desprotegido.

10 39. El monómero de la reivindicación 31, que tiene un grupo 5'-hidroxilo protegido que se puede desproteger en condiciones que no desprotegen dicha base nucleosídica o dicho grupo 3'-amino.

40. El monómero de la reivindicación 31, en donde dicho monómero comprende un grupo 2' seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ y flúor.

15

41. El monómero de la reivindicación 40, en el que dicho monómero es un monómero 2',3'-didesoxi, de tal forma que dicho grupo 2' es hidrógeno.

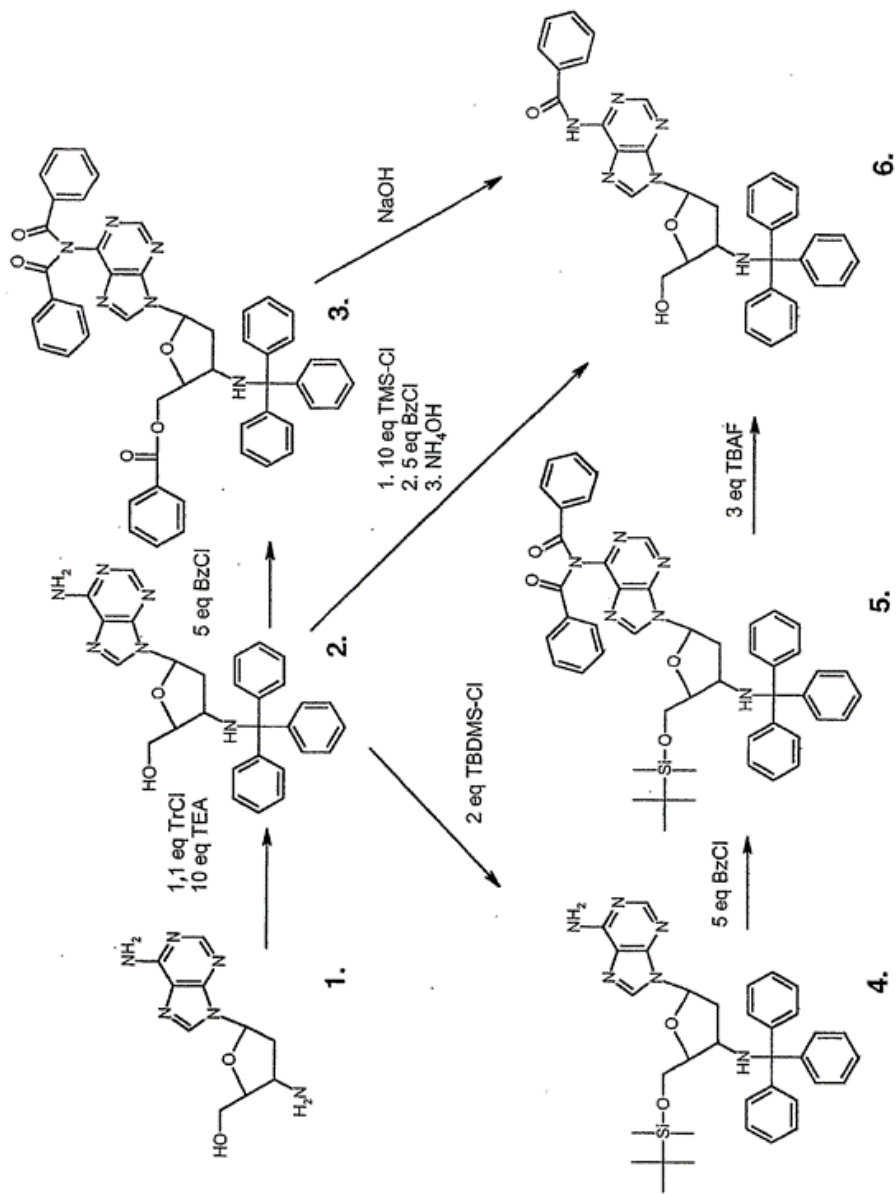


Fig. 1

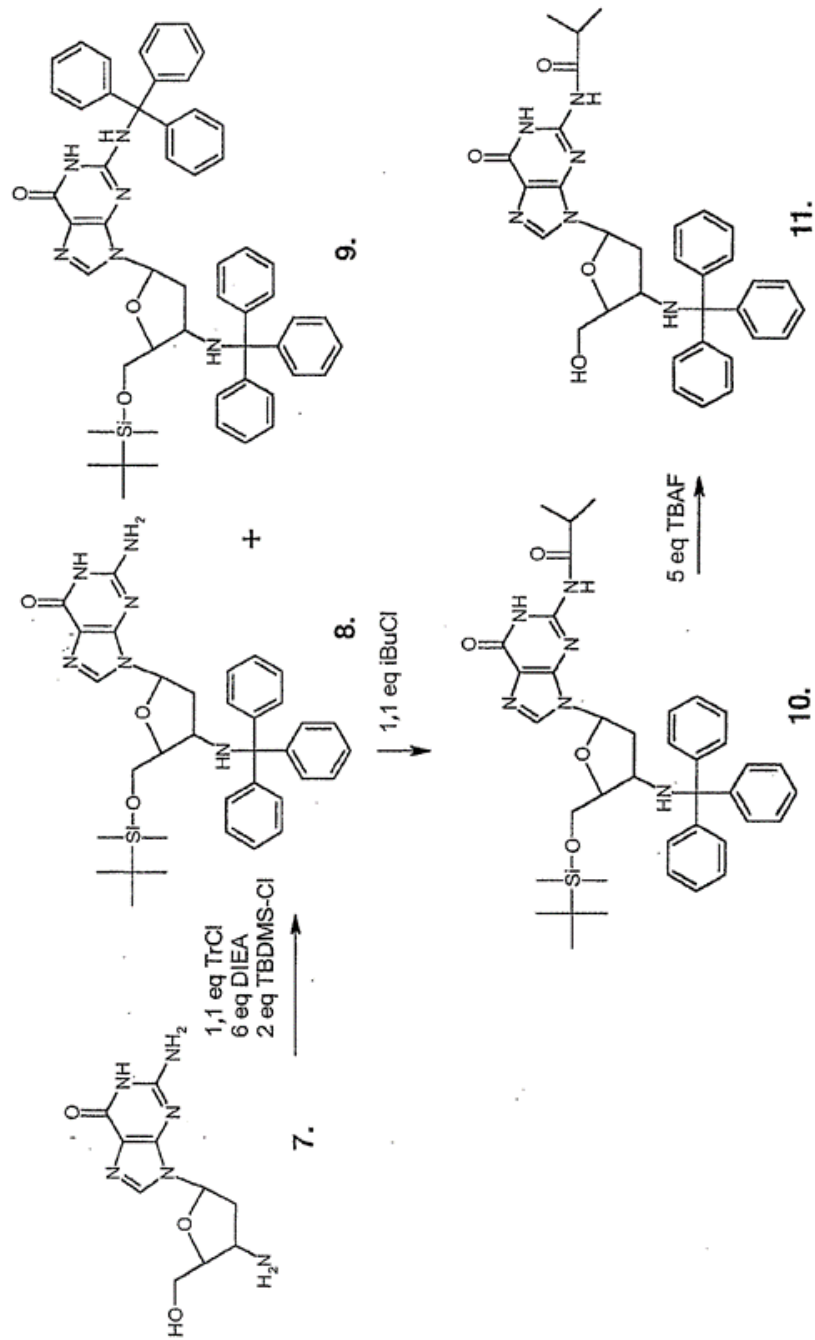


Fig. 2A

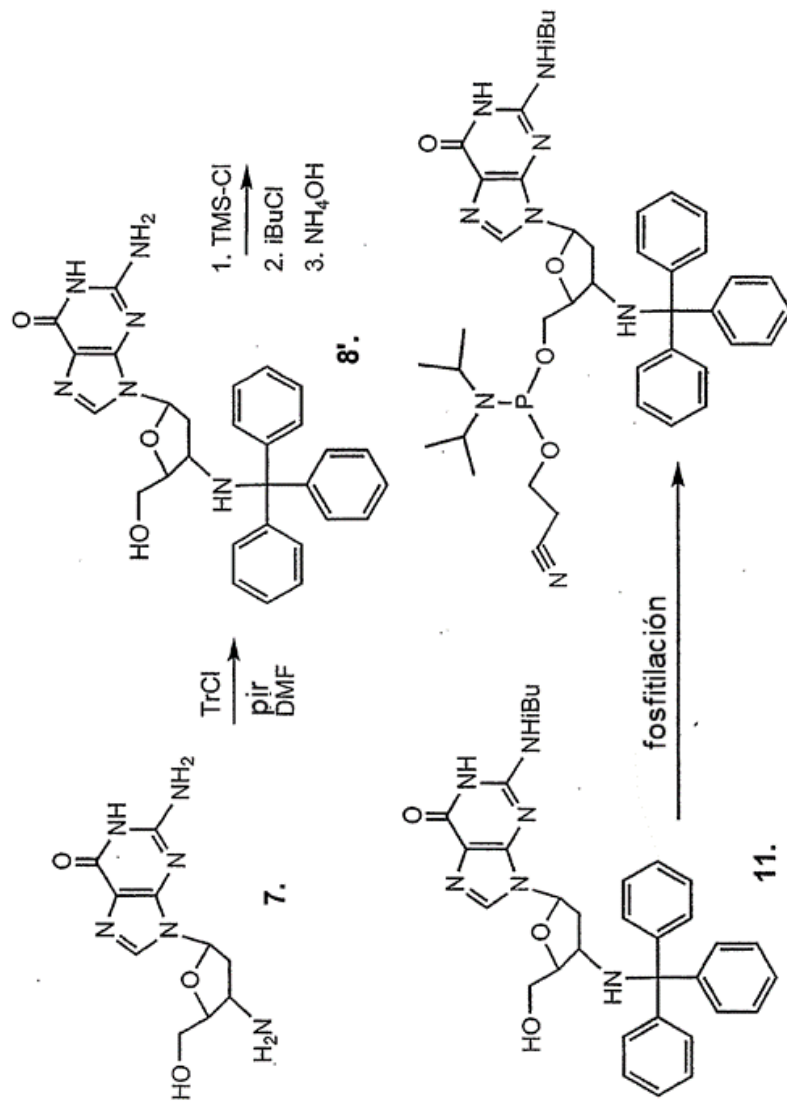


Fig. 2B

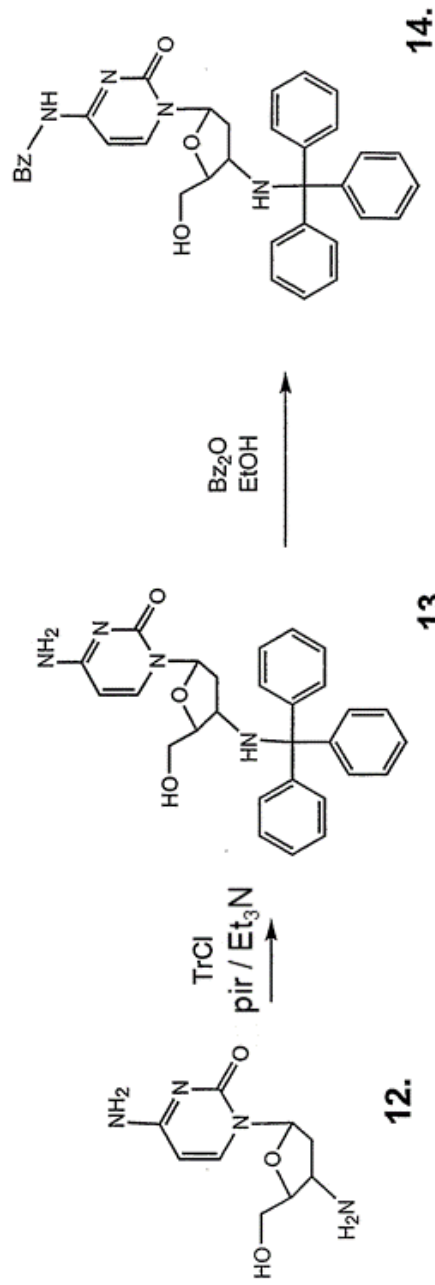


Fig. 2C

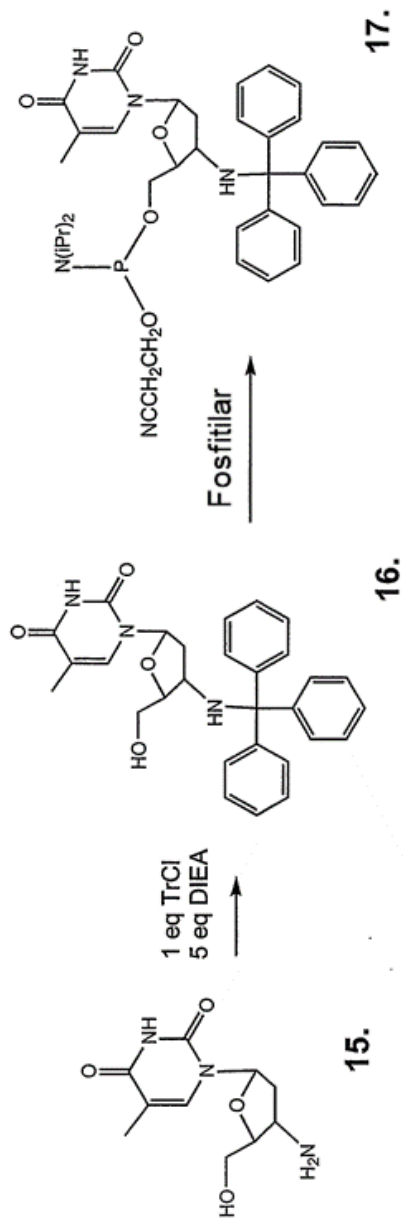


Fig. 3