

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 946**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/073** (2006.01)

**C07H 19/10** (2006.01)

**C07D 209/16** (2006.01)

**C07D 209/26** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C07H 1/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2017** **PCT/US2017/022007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017** **WO17160672**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2017** **E 17713541 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 3430022**

54 Título: **Compuestos y métodos para la síntesis de 5-(triptaminocarboxiamida n-protegida)-2'-desoxiuridina fosforamidita para su incorporación a una secuencia de ácido nucleico**

30 Prioridad:

**14.03.2016 US 201662308132 P**

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

**02.10.2020**

73 Titular/es:

**SOMALOGIC, INC. (100.0%)**  
**2945 Wilderness Place**  
**Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:

**ROHLOFF, JOHN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 784 946 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

Compuestos y métodos para la síntesis de 5-(triptaminocarboxiamida n-protégida)-2'-desoxiuridina fosforamidita para su incorporación a una secuencia de ácido nucleico

**Campo**

La presente divulgación se refiere al campo de las bases, nucleótidos, y fosforamiditas modificadas, incluyendo métodos mejorados de síntesis y oligonucleótidos que comprenden los nucleótidos modificados.

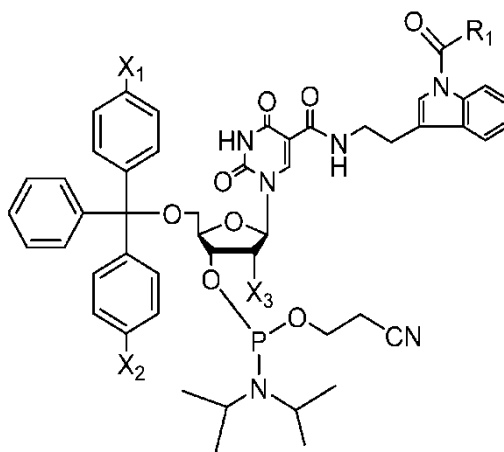
**Antecedentes**

El nucleótido modificado químicamente, TrpdU (y sus análogos 2'-modificados), que transporta una cadena lateral de 3-(2-aminoetil)-indol, es útil, por ejemplo, en el desarrollo de aptámeros de alta afinidad para analitos diana, tales como proteínas. El anillo de indol de TrpdU es rico en electrones y polarizable, lo que puede facilitar la formación de una estructura secundaria e interfaces hidrófobas con analitos diana. Hasta la fecha, TrpdU no se ha llevado a la práctica, análogamente a otros nucleótidos modificados, como un reactivo de fosforamidita en síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, y su uso ha sido limitado, por tanto.

Se han notificado derivados de dUTP modificados en la posición 5 y analizados para determinar su compatibilidad con las etapas de selección enzimática *in vitro* (Vaught, J. V., et al. (2010) J. Am. Chem. Soc. 132, 4141-4151). Sigue existiendo una necesidad en la técnica de una fosforamidita de TrpU, y métodos mejorados de preparación de una fosforamidita de TrpU.

**Sumario**

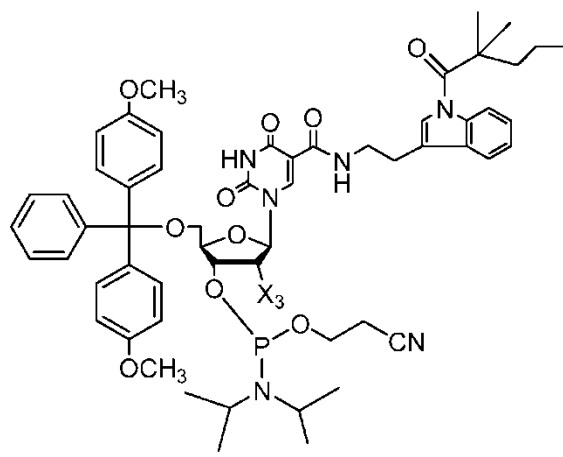
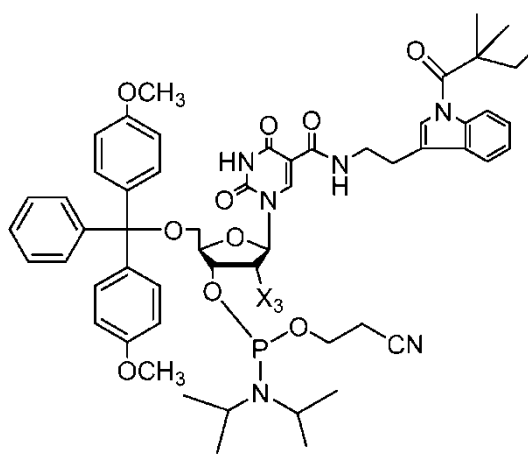
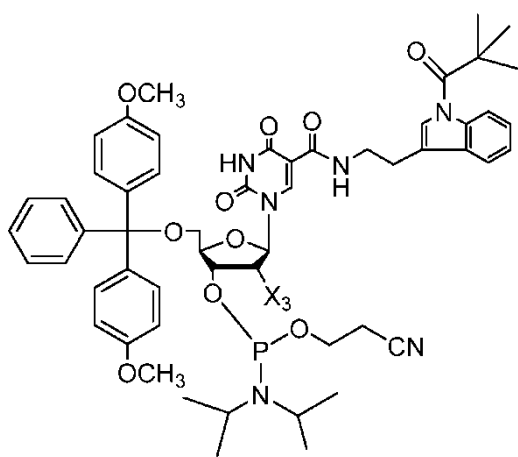
En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto que tiene la estructura

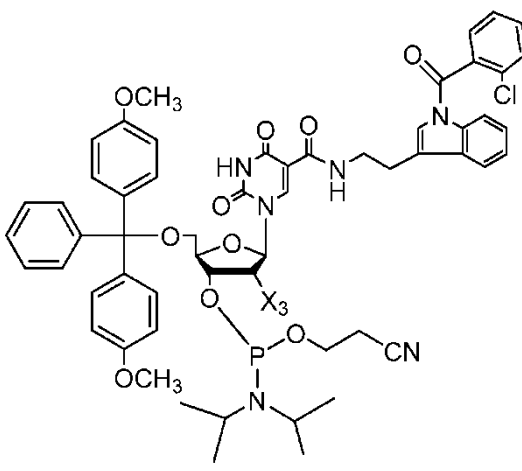
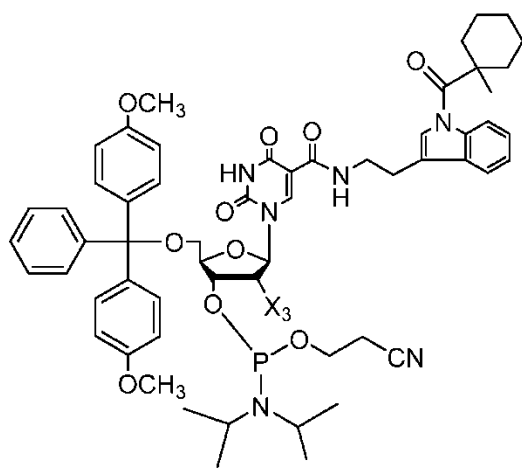
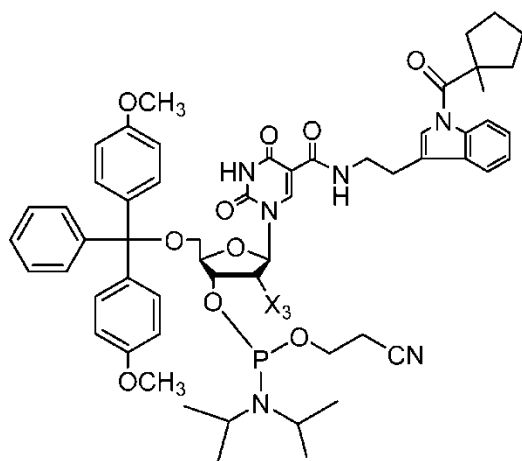


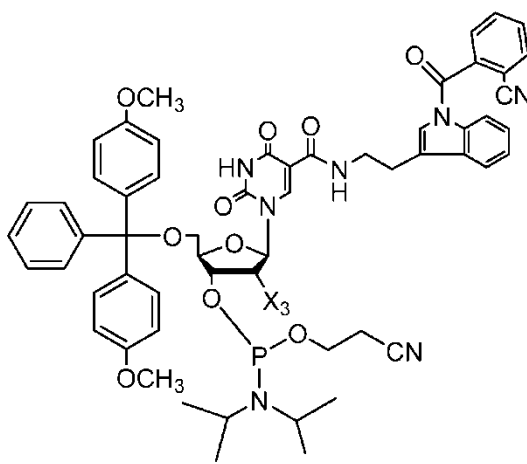
o una de sus sales. En algunas realizaciones,  $R_1$  se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetilbutilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones, cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  se selecciona independientemente entre metoxi e hidrógeno. En algunas realizaciones,  $X_3$  se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno, y *tert*-butildimetilsililo.

En algunas realizaciones,  $R_1$  es *tert*-butilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1,1-dimetil-propilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 2-cianofenilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1-metil-ciclopentilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones,  $X_1$  y  $X_2$  son metoxi. En algunas realizaciones,  $X_3$  es hidrógeno. En algunas realizaciones,  $X_3$  es metoxi. En algunas realizaciones,  $X_3$  es flúor. En algunas realizaciones,  $X_3$  es *tert*-butildimetilsililo.

En algunas realizaciones, un compuesto proporcionado en el presente documento se selecciona entre:

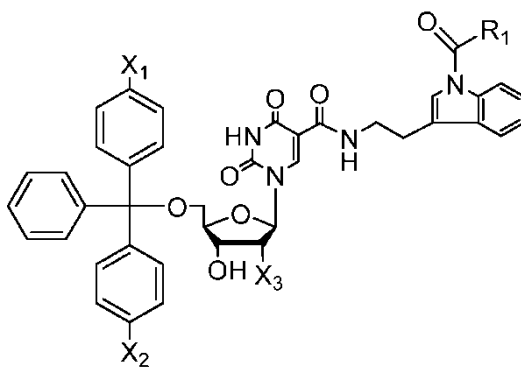






y sus sales.

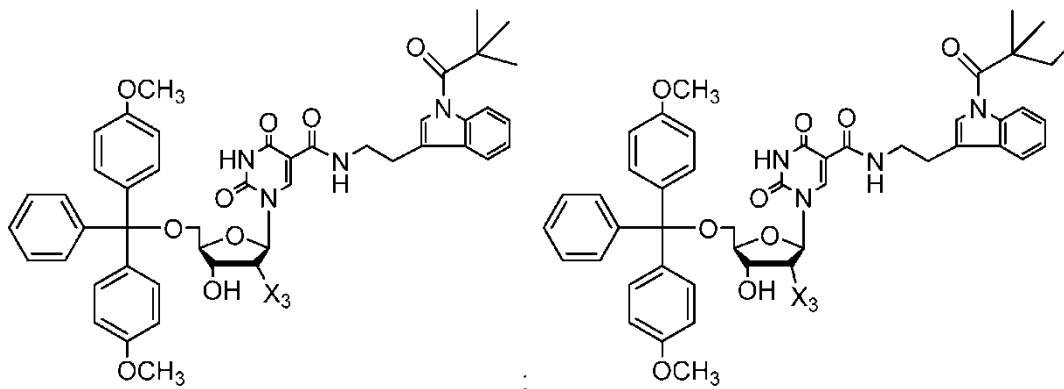
- 5 En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto que tiene la estructura o una de sus sales.

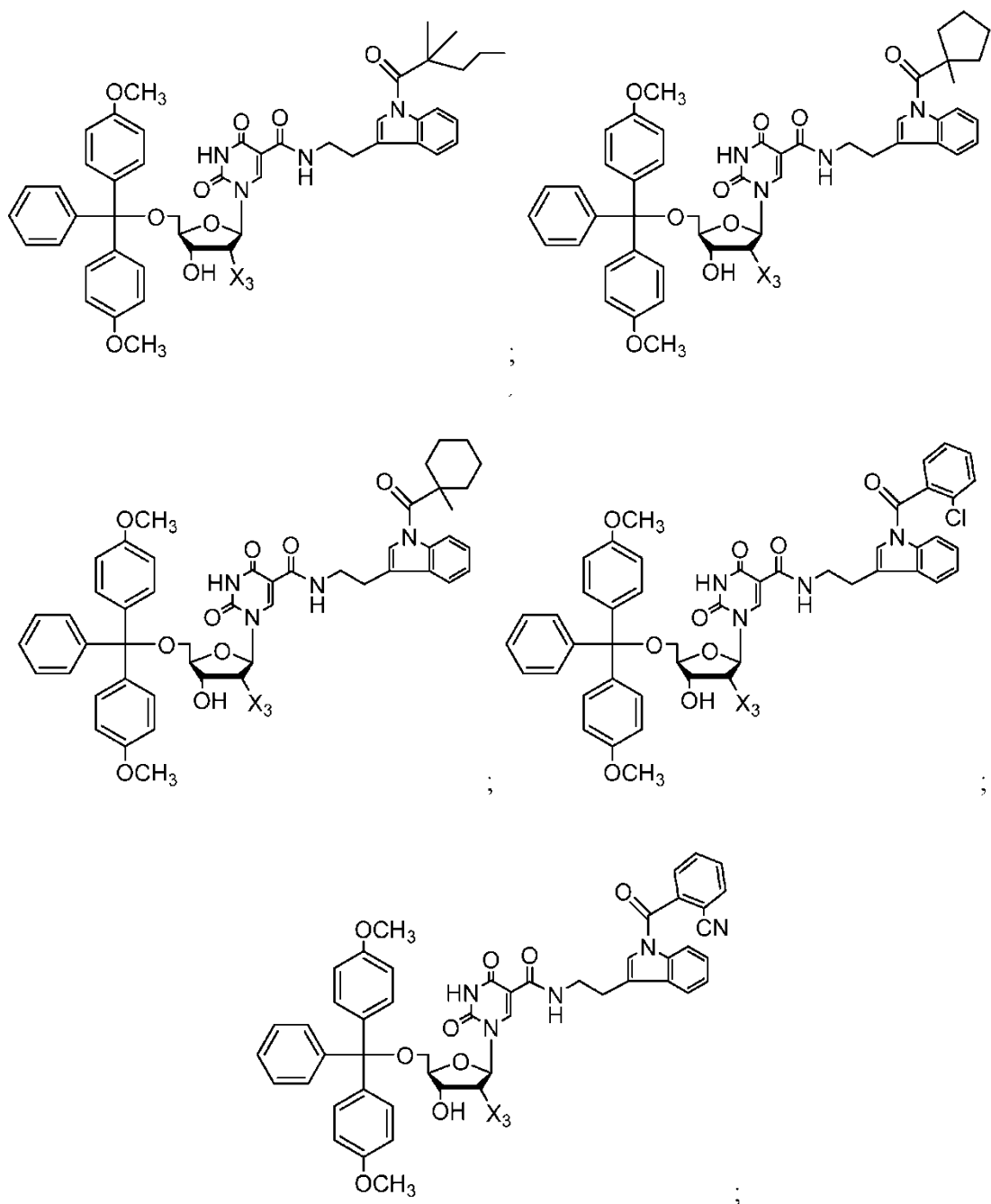


- 10 En algunas realizaciones,  $R_1$  se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetilbutilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones, cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  se selecciona independientemente entre metoxi e hidrógeno. En algunas realizaciones,  $X_3$  se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno, y *tert*-butildimetilsililo.

- 15 En algunas realizaciones,  $R_1$  es *tert*-butilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1,1-dimetil-propilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 2-cianofenilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1-metil-ciclopentilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones,  $X_1$  y  $X_2$  son metoxi. En algunas realizaciones,  $X_3$  es hidrógeno. En algunas realizaciones,  $X_3$  es metoxi. En algunas realizaciones,  $X_3$  es flúor. En algunas realizaciones,  $X_3$  es *tert*-butildimetilsililo.

- 20 En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona entre:



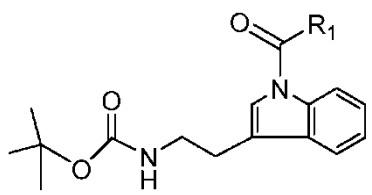


5

y sus sales.

En algunas realizaciones, un compuesto que tiene la estructura:

10



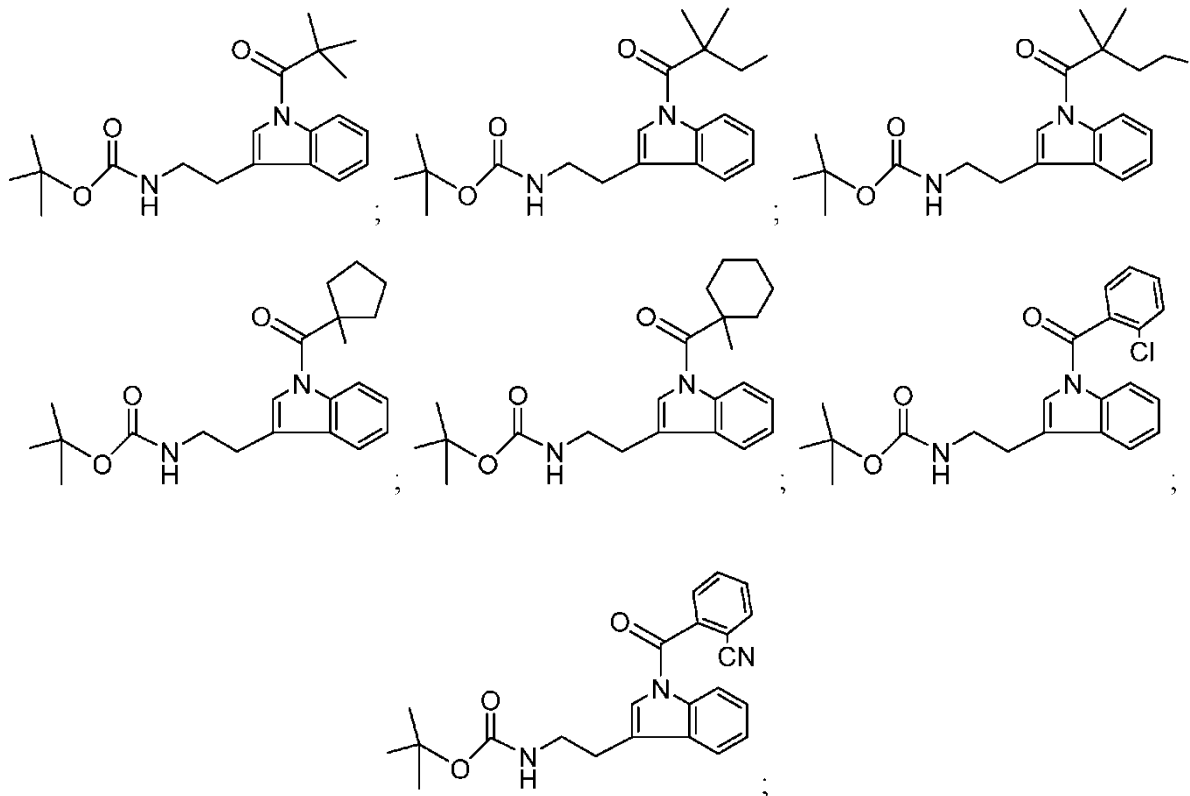
o una de sus sales, se proporciona. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetilbutilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es *tert*-butilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 1,1-dimetil-propilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 1,1-dimetil-butilo;

15

2-clorofenilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 2-cianofenilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 1-metil-ciclopentilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 1-metil-ciclohexilo.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene una estructura seleccionada entre:

5

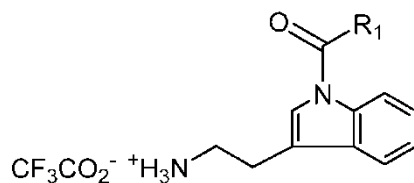


10

y sus sales.

En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto que tiene la estructura:

15

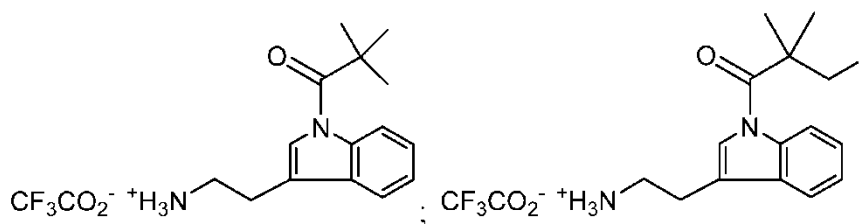


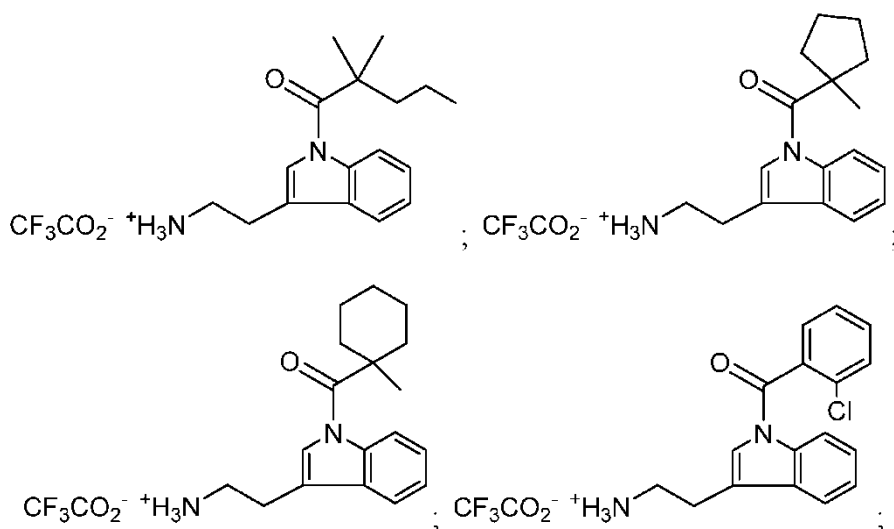
En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es *tert*-butilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 1,1-dimetil-propilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 2-cianofenilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 1-metil-ciclopentilo. En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es 1-metil-ciclohexilo.

20

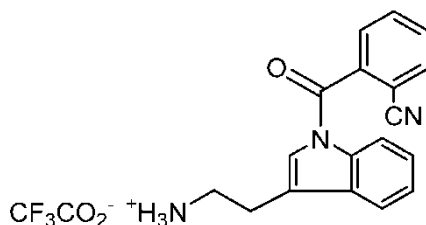
En algunas realizaciones, un compuesto tiene una estructura seleccionada entre:

25

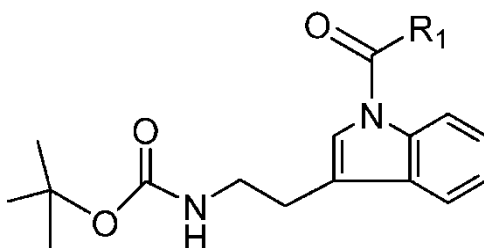




5 y

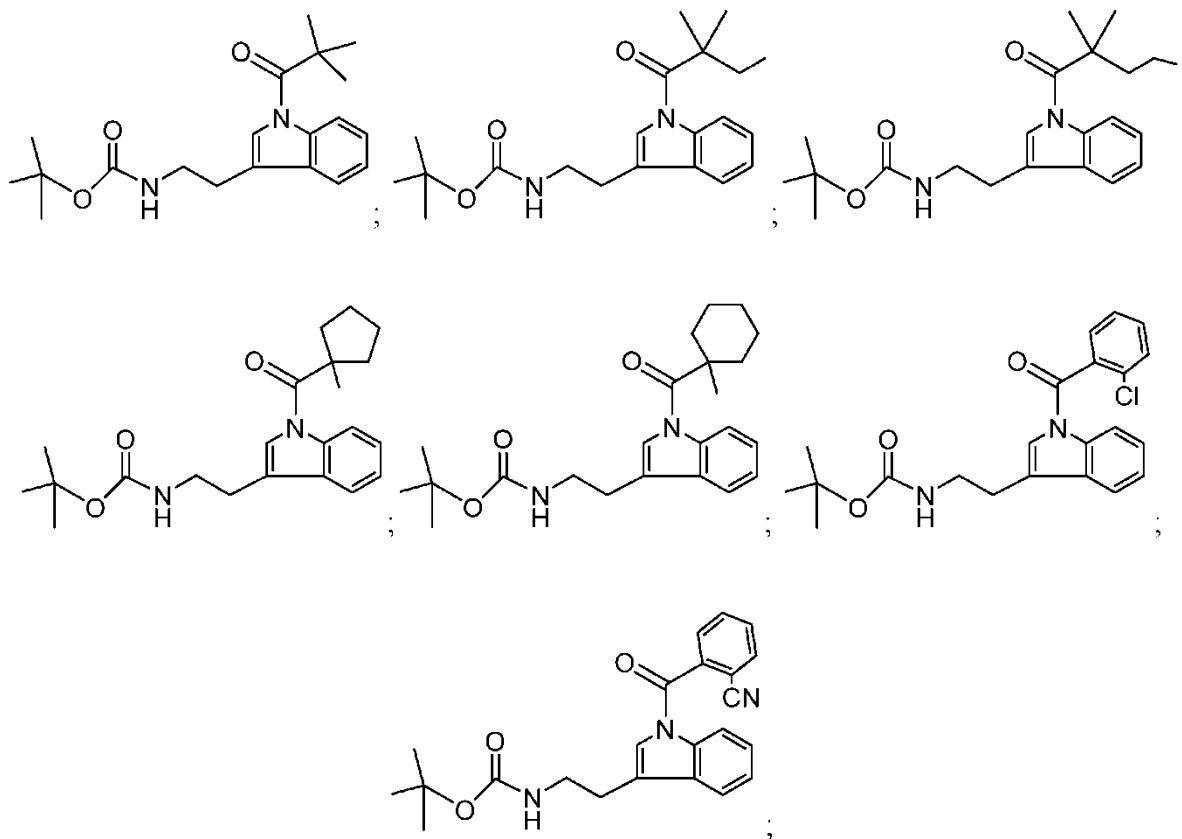


10 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para producir un compuesto que tiene la estructura: o una de sus sales.



15 En algunas realizaciones,  $R_1$  se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetilbutilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es *tert*-butilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1,1-dimetil-propilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 2-cianofenilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1-metil-ciclopentilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutiroilo, cloruro de 2,2-dimetilvaleroilo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo, y cloruro de 2-cianobenzoilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es *tert*-butilo, y en el que el cloruro de ácido es cloruro de pivaloilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1,1-dimetil-propilo y el cloruro de ácido es cloruro de 2,2-dimetilbutiroilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1,1-dimetil-butilo y el cloruro de ácido es cloruro de 2,2-dimetilvaleroilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 2-clorofenilo y el cloruro de ácido es cloruro de 2-clorobenzoilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 2-cianofenilo y el cloruro de ácido es cloruro de 2-cianobenzoilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1-metil-ciclopentilo y el cloruro de ácido es cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo. En algunas realizaciones,  $R_1$  es 1-metil-ciclohexilo y el cloruro de ácido es cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo.

30 En algunas realizaciones, el método produce un compuesto seleccionado entre

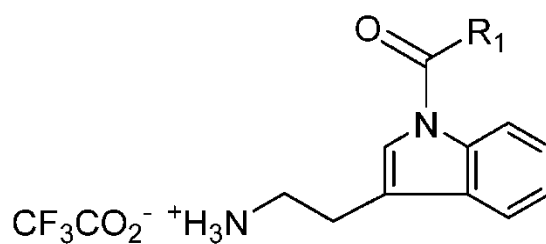


5

y sus sales.

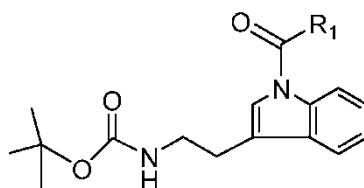
En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un compuesto que tiene la estructura:

10



En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar el compuesto

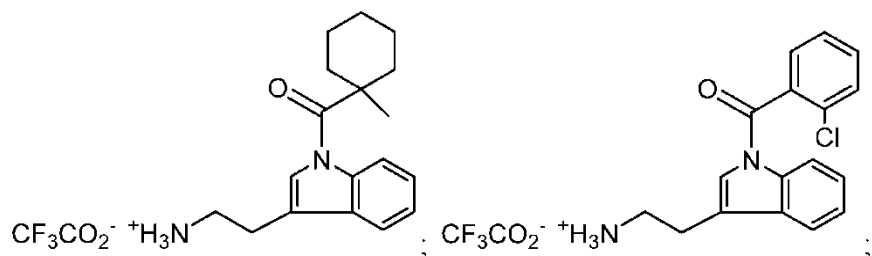
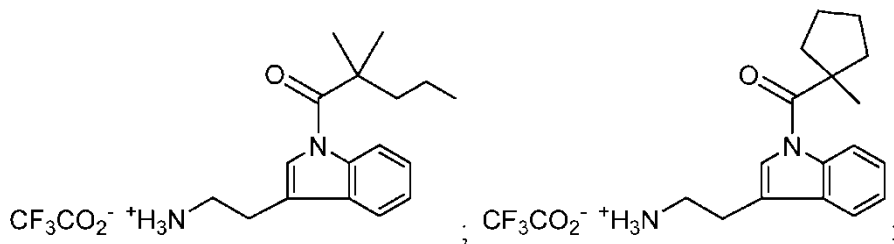
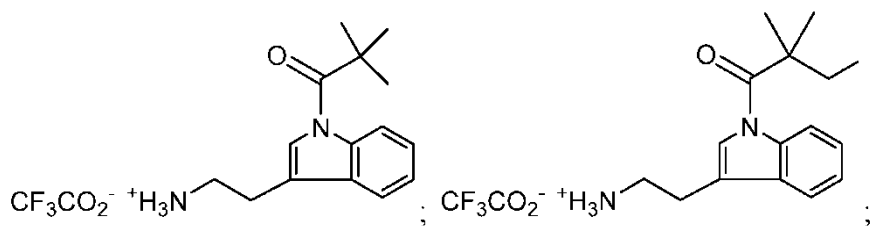
15



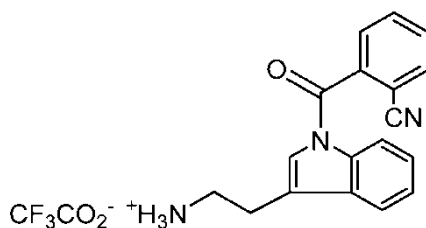
con ácido trifluoroacético.

20

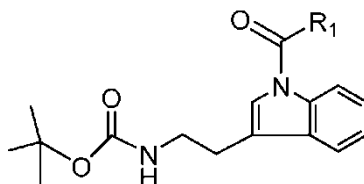
En algunas realizaciones, el método produce un compuesto seleccionado entre:



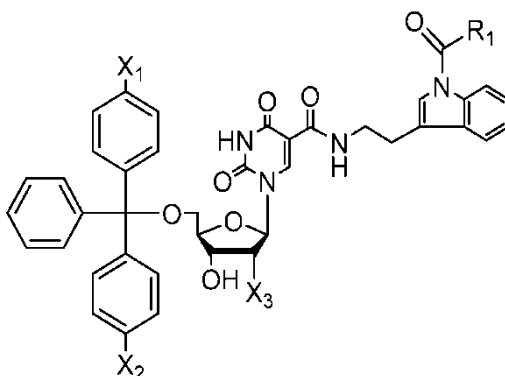
y



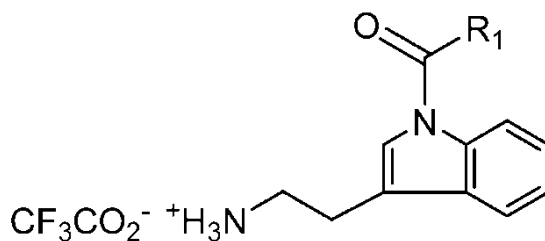
En algunas realizaciones, el método comprende además hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutiroilo, cloruro de 2,2-dimetilvaleroilo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo y cloruro de 2-cianobenzoilo, para formar el compuesto



En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un compuesto que tiene la estructura: o una de sus sales.

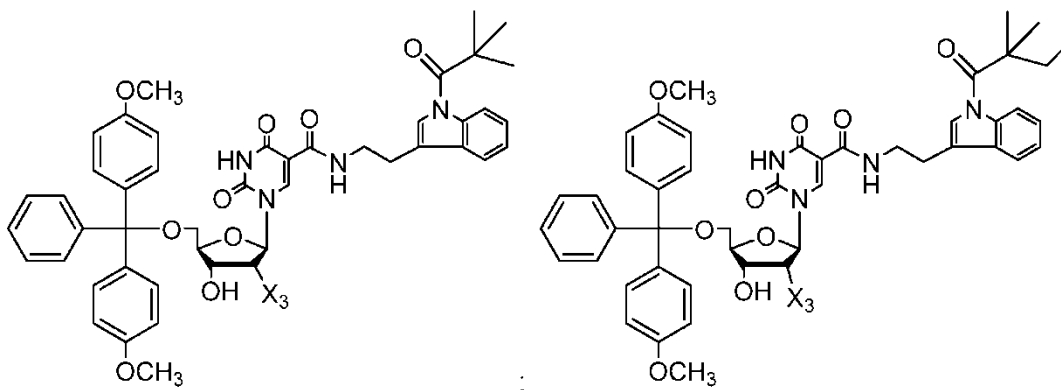


En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetilbutilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones, cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se selecciona  
 5 independientemente entre metoxi e hidrógeno. En algunas realizaciones, X<sub>3</sub> se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno, y *tert*-butildimetilsililo. En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar el compuesto

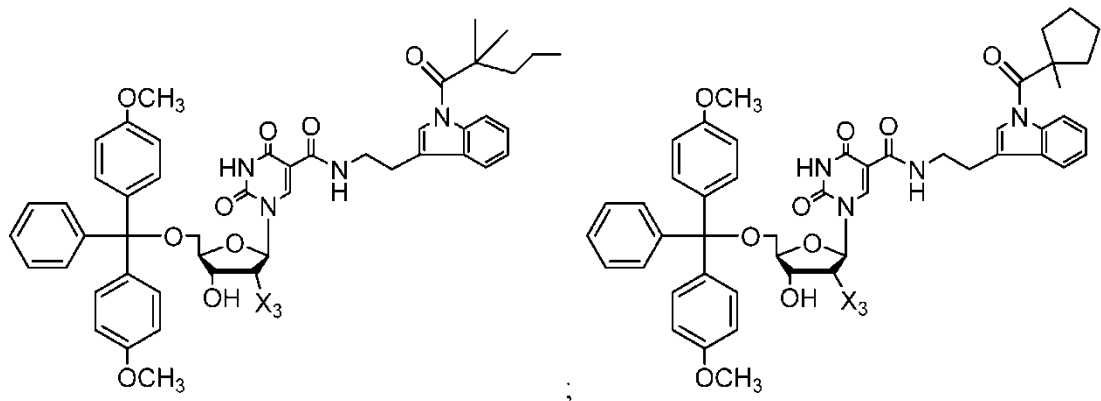


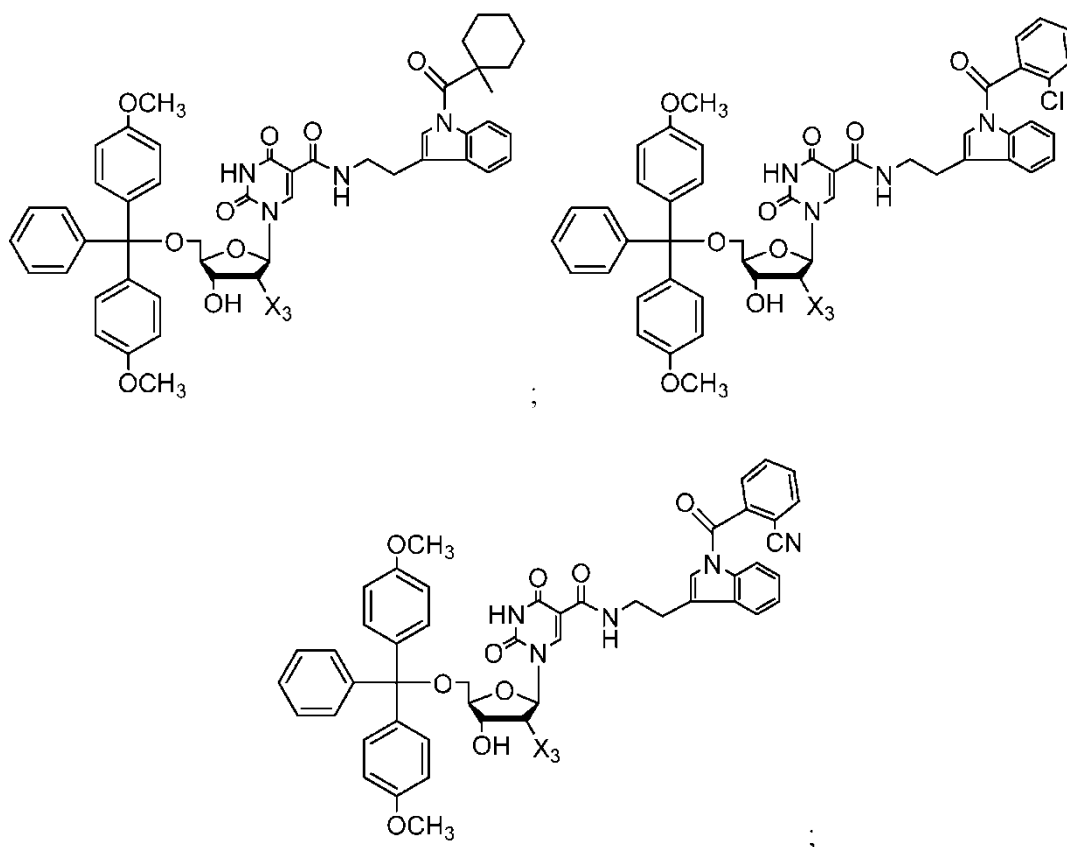
10 con 5'-O-DMT-5-(2,2,2-trifluoroetioxi-carbonil)-2'-desoxiuridina (TFEdU).

En algunas realizaciones, el método produce un compuesto seleccionado entre:



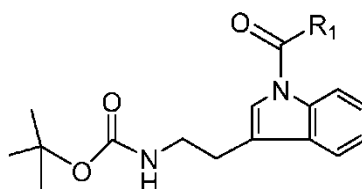
15





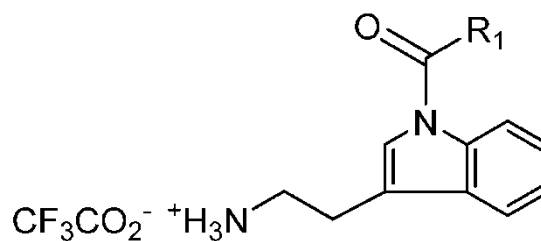
5 y sus sales.

En algunas realizaciones, el método comprende además hacer reaccionar el compuesto

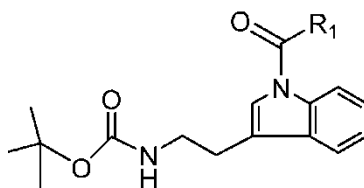


10

con ácido trifluoroacético para formar el compuesto

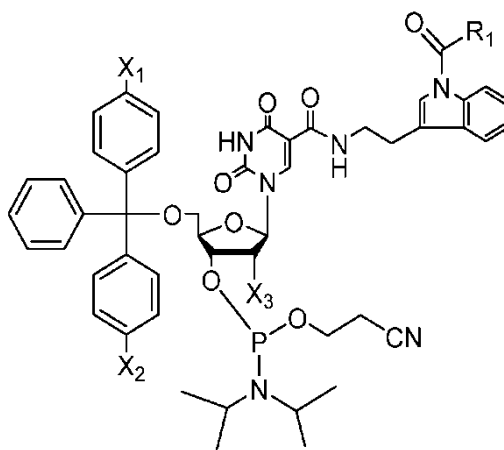


15 En algunas realizaciones, el método comprende además hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutirol, cloruro de 2,2-dimetilvalerilo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo y cloruro de 2-cianobenzoilo, para formar el compuesto



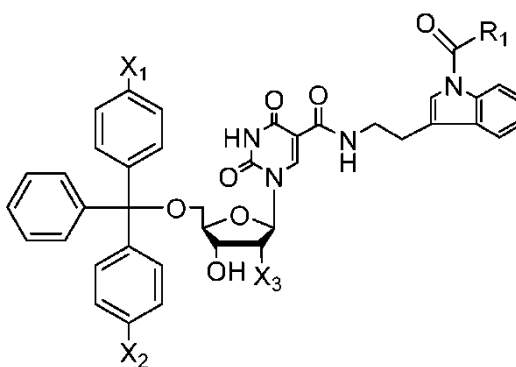
En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un compuesto que tiene la estructura: o una de sus sales.

5



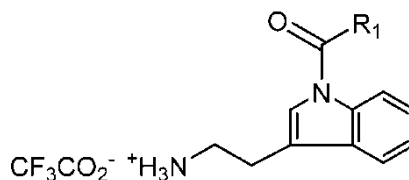
En algunas realizaciones, R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetilbutilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones, cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se selecciona independientemente entre metoxi e hidrógeno. En algunas realizaciones, X<sub>3</sub> se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno, y *tert*-butildimetilsililo. En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar el compuesto

10



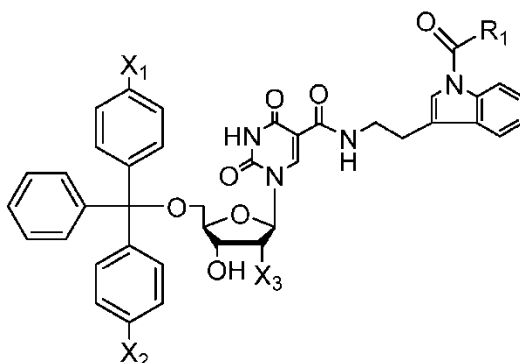
15 con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidita.

En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar el compuesto

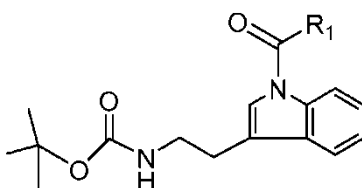


20

con 5'-O-DMT-5-(2,2,2-trifluoroetoxi-carbonil)-2'-desoxiuridina (TFEdU) para formar el compuesto

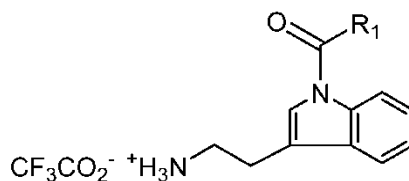


En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar el compuesto



5

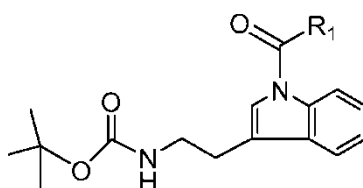
con ácido trifluoroacético para formar el compuesto



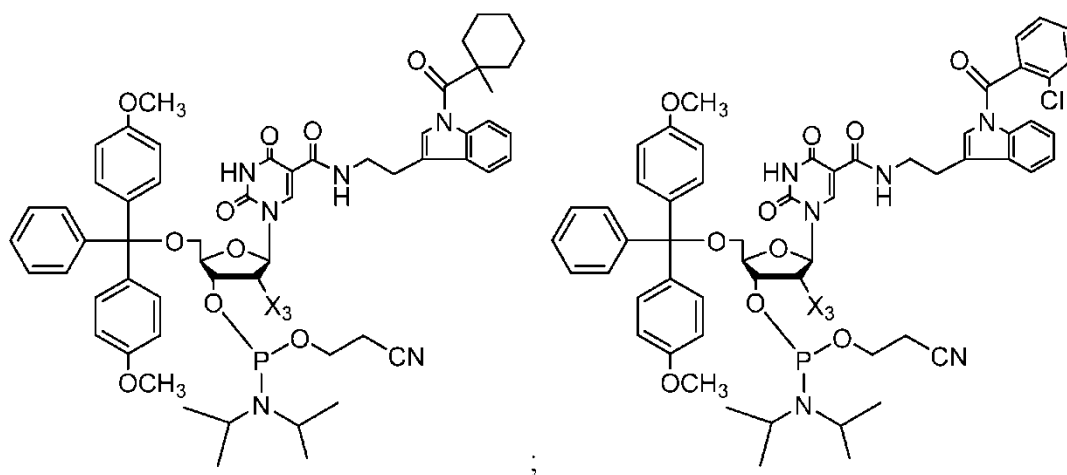
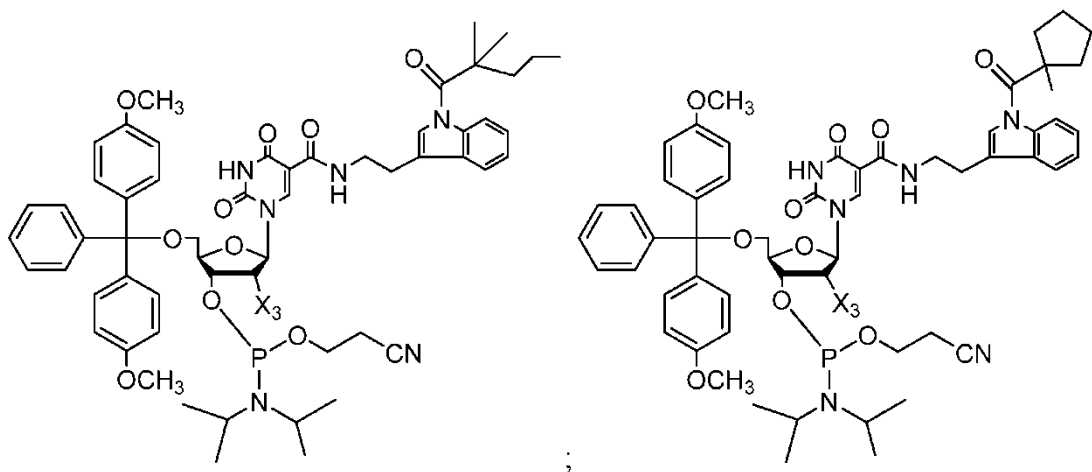
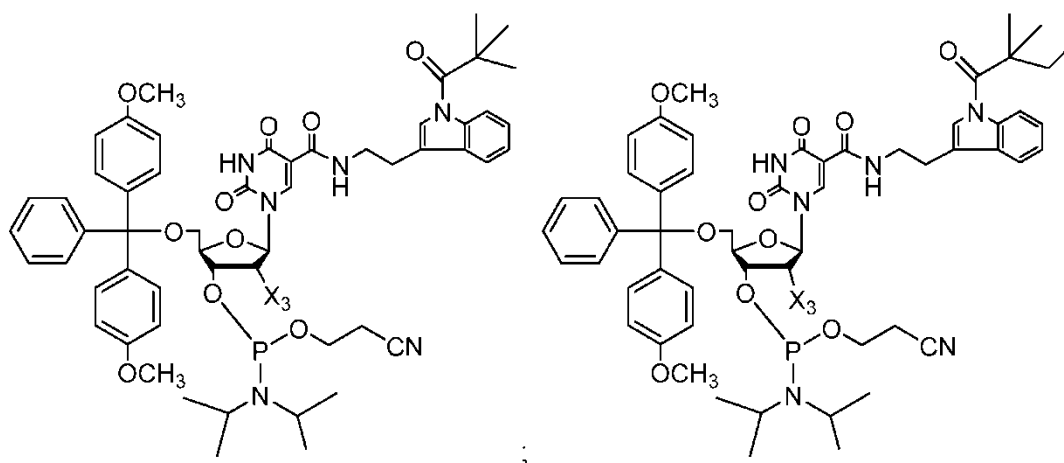
10

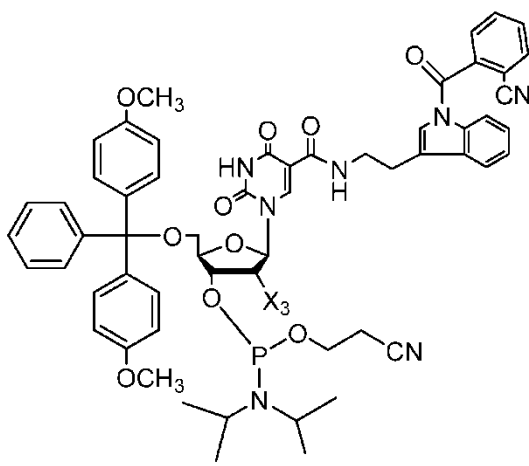
En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutiroylo, cloruro de 2,2-dimetilvaleroilo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo y cloruro de 2-cianobenzoilo, para formar el compuesto

15



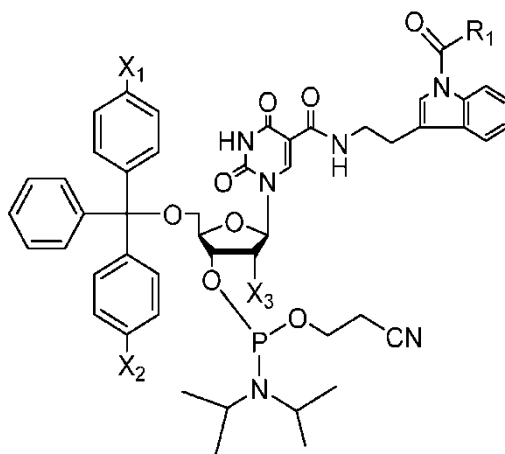
En algunas realizaciones, el método produce un compuesto seleccionado entre:





y sus sales.

- 5 En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un compuesto que tiene la estructura: o una de sus sales,



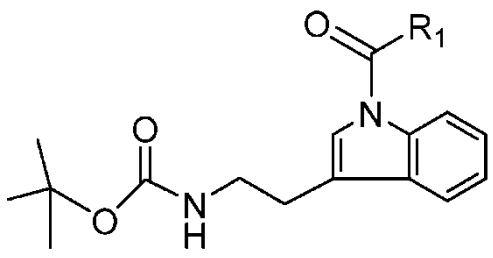
10 en el que,

R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metilciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo;

cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se selecciona independientemente entre metoxi e hidrógeno;

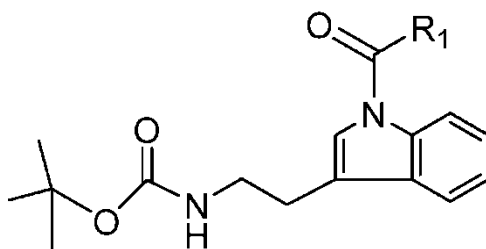
- 15 X<sub>3</sub> se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno y *tert*-butildimetilsililo; que comprende las etapas de:

a) hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutiroilo, cloruro de 2,2-dimetilvaleroilo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo y cloruro de 2-cianobenzoilo, para formar el compuesto

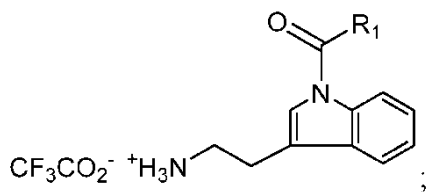


b) hacer reaccionar el compuesto

25

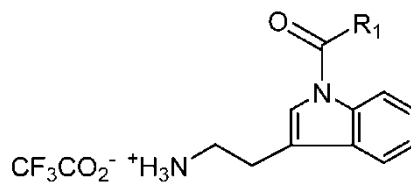


con ácido trifluoroacético para formar el compuesto



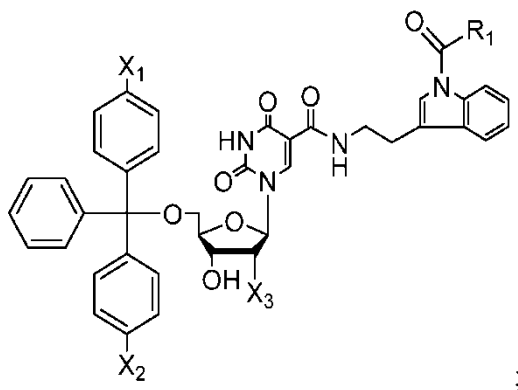
5

c) hacer reaccionar el compuesto



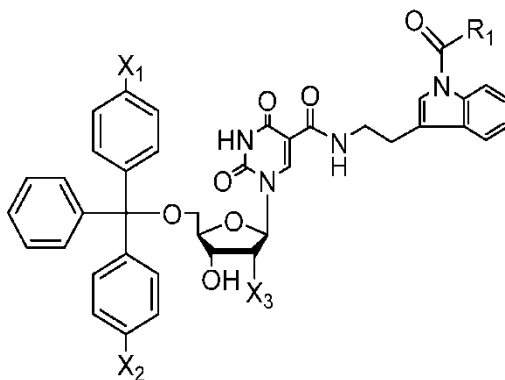
10

con 5'-O-DMT-5-(2,2,2-trifluoroetioxi-carbonil)-2'-desoxiuridina (TFEdU) para formar el compuesto



15

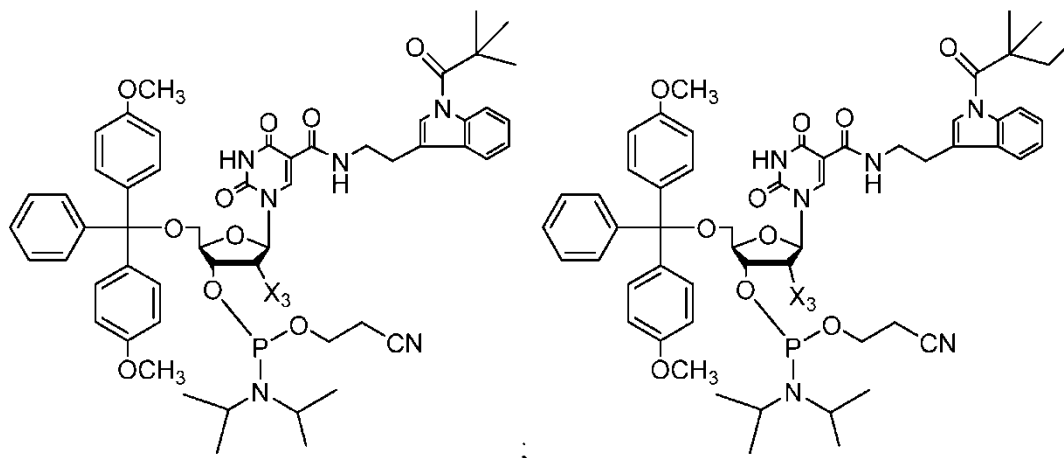
y  
d) hacer reaccionar el compuesto



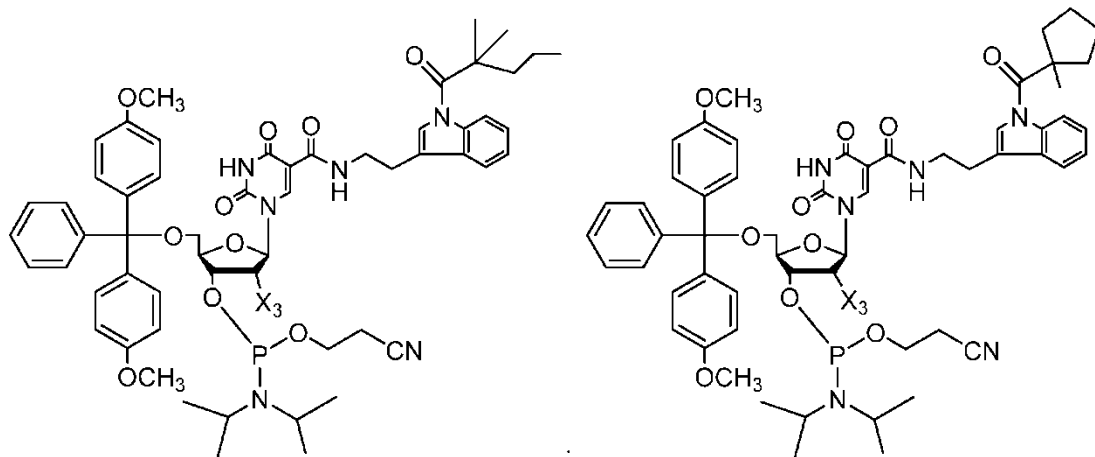
20

con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidita.

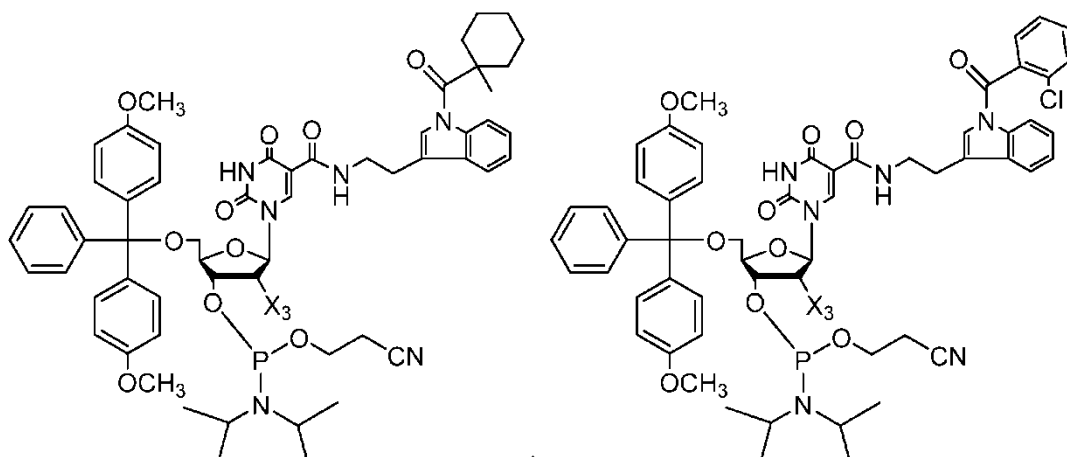
En algunas realizaciones, el método produce un compuesto seleccionado entre:



;

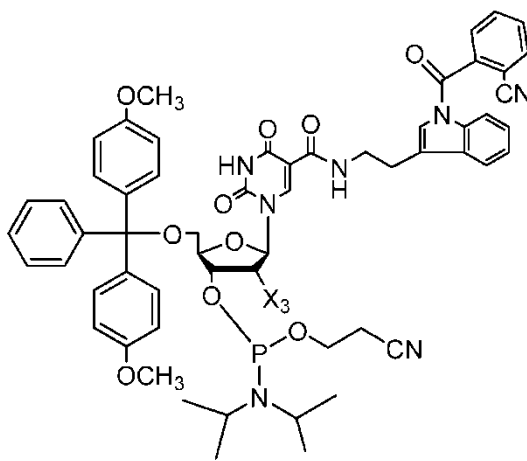


;



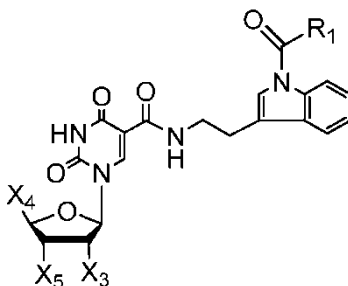
;

5



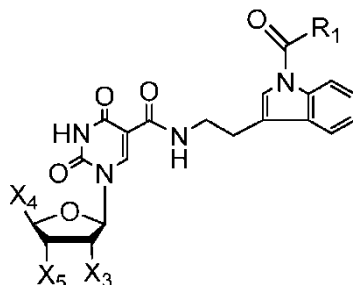
y sus sales.

- 5 En algunas realizaciones, se proporcionan oligonucleótidos, que comprenden al menos un nucleótido TrpU protegido, en el que al menos un nucleótido TrpU protegido en el oligonucleótido tiene la estructura:



- 10 En algunas realizaciones,  $R_1$  se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones,  $X_3$  se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno, y *tert*-butildimetilsililo. En algunas realizaciones,  $X_4$  se selecciona entre OH, -OR, -SR y -Z-P(Z')(Z'')O-R, en la que Z, Z', y Z'' se seleccionan cada uno de manera independiente entre O y S, y R es un nucleótido adyacente en el oligonucleótido. En algunas realizaciones,  $X_5$  se selecciona entre -O-ss, -OR, -SR y -Z-P(Z')(Z'')O-R, en la que ss es un soporte sólido, Z, Z', y Z'' se seleccionan cada uno de manera independiente entre O y S, y R es un nucleótido adyacente en el oligonucleótido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un vidrio de poro controlado (CPG). En algunas realizaciones, Z' es S y Z'' es O. En algunas realizaciones, Z' y Z'' son O.
- 15

- 20 En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido TrpU, que comprende incorporar al menos un nucleótido que tiene la estructura:



en una secuencia de nucleótidos sobre un soporte sólido; y eliminar el

25



grupo protector de al menos un nucleótido TrpU incorporado en el oligonucleótido. En algunas realizaciones,  $R_1$  se

selecciona entre *terc*-butilo, 1,1-dimetil-propilo; 1,1-dimetil-butilo; 2-clorofenilo; 2-cianofenilo; 1-metil-ciclopentilo; y 1-metil-ciclohexilo. En algunas realizaciones,  $X_3$  se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno, y *terc*-butildimetilsililoxi. En algunas realizaciones,  $X_4$  se selecciona entre OH, -OR, -SR y -Z-P(Z')(Z'')O-R, en la que Z, Z', y Z'' se seleccionan cada uno de manera independiente entre O y S, y R es un nucleótido adyacente en el oligonucleótido. En algunas realizaciones,  $X_5$  se selecciona entre -O-ss, -OR, -SR y -Z-P(Z')(Z'')O-R, en la que ss es un soporte sólido, Z, Z', y Z'' se seleccionan cada uno de manera independiente entre O y S, y R es un nucleótido adyacente en el oligonucleótido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un vidrio de poro controlado (CPG). En algunas realizaciones, Z' es S y Z'' es O. En algunas realizaciones, Z' y Z'' son O.

## 10 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructura de TrpdU.

Figura 2. Esquema de síntesis para los compuestos de triptamina N-1-protegidos.

Figura 3. Migración del grupo acilo en la triptamina protegida tras la eliminación de BOC.

15 Figura 4. Perfiles de HPLC de los aptámeros sintetizados usando piv-TrpdU cianoetil-N,N-diisopropil fosforamidita (CEP), TrpdU CEP sin proteger, y NapdU CEP.

Figura 5. Esquema de síntesis del trifluoroacetato de N-1-piv-triptamina.

Figura 6. Esquema de síntesis de la Piv-TrpdU cianoetil-N,N-diisopropil fosforamidita (CEP).

## 20 Descripción detallada

A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con su uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes sobre biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

A menos que se explique de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente divulgación. Los términos en singular "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. "Que comprende A o B" significa que incluye A, o B, o A y B. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción.

Adicionalmente, se entiende que los intervalos proporcionados en el presente documento son una abreviatura de todos los valores comprendidos en el intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 (así como fracciones de los mismos a menos que el contexto indique claramente otra cosa). Cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de número entero se entiende que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), salvo que se indique otra cosa. También, cualquier intervalo numérico citado en el presente documento que se refiere a cualquier característica física, tal como subunidades de polímeros, tamaño o espesores, debe entenderse que incluyen cualquier número entero comprendido en el intervalo enumerado, salvo que se indique otra cosa. Como usa en el presente documento, "aproximadamente" o "que consiste esencialmente de la media  $\pm$  20 % del intervalo, valor o estructura indicados, salvo que se indique otra cosa. Como usa en el presente documento, los términos "incluye" y "comprende" son abiertos y se usan como sinónimos.

Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayos de la presente divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no tienen por objeto ser limitantes.

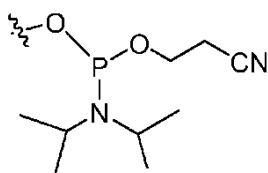
Como usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido o una forma modificada del mismo, así como un análogo del mismo. Los nucleótidos incluyen especies que incluyen purinas (por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina y sus derivados y análogos) así como pirimidinas (por ejemplo, citosina, uracilo, timina y sus derivados y análogos).

Como usa en el presente documento, El término "TrpU" se usa generalmente para referirse a nucleótidos de uridililo que comprenden un grupo N-(3-indol-2-etil)-carboxamida funcional en la posición 5. No se pretende que el uso del término "TrpU" sea limitante con respecto a la posición 2' de la ribosa y el término debe interpretarse para incluir, aunque no de forma limitativa, nucleótidos que comprende -H, -OH, -OMe, o -F en la posición 2', salvo que se indique un resto 2 concreto. El término "TrpdU" se refiere normalmente al nucleótido TrpU que comprende un 2'-H.

Como usa en el presente documento, "ácido nucleico", "oligonucleótido", y "polinucleótido" se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de nucleótidos e incluyen ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y modificaciones de estos tipos de ácidos nucleicos, oligonucleótidos y polinucleótidos, en donde se incluye la unión de varias entidades o restos a las unidades nucleotídicas en cualquier posición. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", y "ácido nucleico" incluyen moléculas bicatenarias o monocatenarias así como moléculas de triple hélice. Ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido son términos más amplios que el término aptámero y, por lo tanto, los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido incluyen polímeros de nucleótidos que son aptámeros, pero los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido no se limitan a aptámeros.

Como usa en el presente documento, la expresión "al menos un nucleótido" cuando se refiere a modificaciones de un ácido nucleico, se refiere a uno, varios o todos los nucleótidos del ácido nucleico, indicando que cualquiera o todas las ocurrencias de cualquiera o todos de A, C, T, G o U en un ácido nucleico pueden estar modificadas o no.

Como usa en el presente documento, una "fosforamidita" es un nucleótido que comprende un



grupo unido al carbono 3' de la ribosa, o una posición equivalente en otro resto azucarado. En algunas realizaciones, una fosforamidita comprende un grupo protector en el 5'-OH de la ribosa, tal como un grupo protector de tritilo, por ejemplo, un grupo protector de dimetoxitritilo.

Como usa en el presente documento, "síntesis en fase sólida" se refiere a la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida que utiliza la química de la fosforamidita, salvo que se indique específicamente otra cosa.

## Compuestos

La presente divulgación proporciona los compuestos que se muestran en la Tabla A, así como sus sales, y los métodos para preparar y usar los compuestos.

Tabla A: Compuestos de la divulgación

| Compuesto | Nombre       | Estructura |
|-----------|--------------|------------|
| 1         | Piv-TrpU CEP |            |

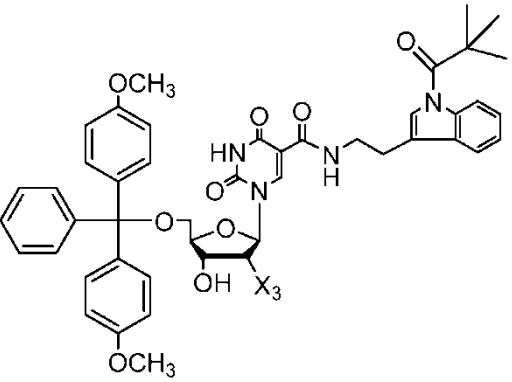
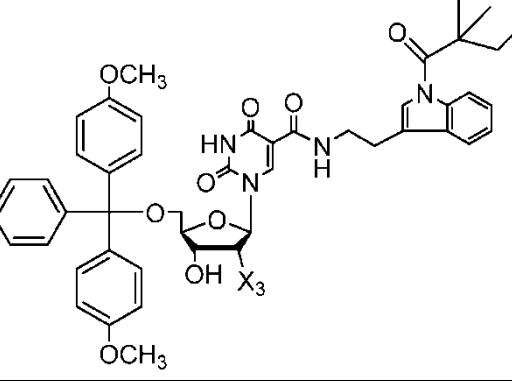
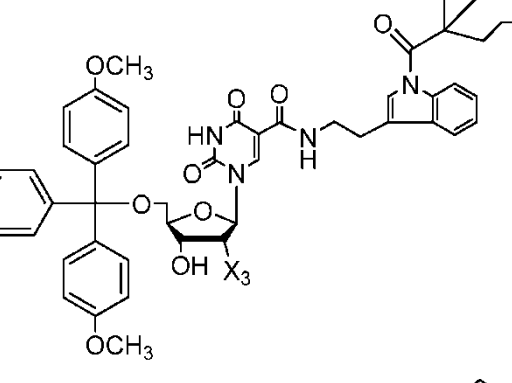
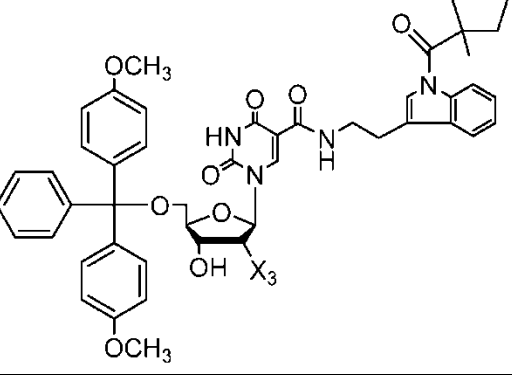
(continuación)

| Compuesto | Nombre       | Estructura |
|-----------|--------------|------------|
| 2         | Dmb-TrpU CEP |            |
| 3         | Dmv-TrpU CEP |            |
| 4         | Mcp-TrpU CEP |            |

(continuación)

| Compuesto | Nombre       | Estructura |
|-----------|--------------|------------|
| 5         | Mch-TrpU CEP |            |
| 6         | Clp-TrpU CEP |            |
| 7         | Cyp-TrpU CEP |            |

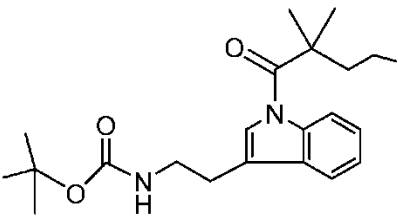
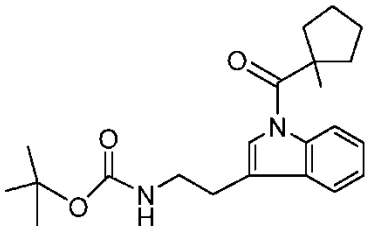
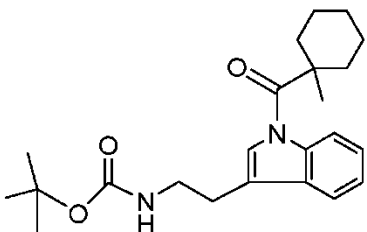
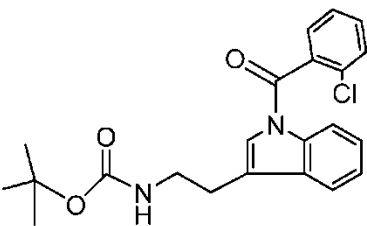
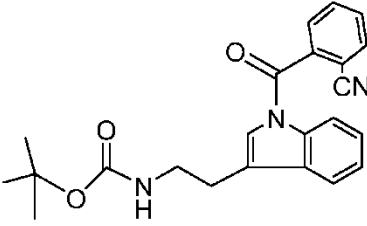
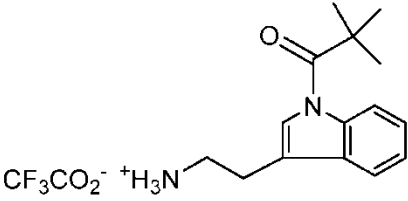
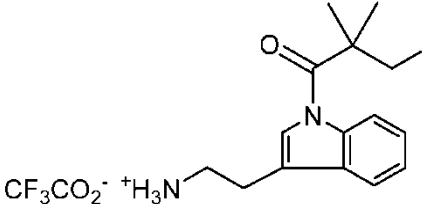
(continuación)

| Compuesto | Nombre       | Estructura                                                                           |
|-----------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 8         | DMT-Piv-TrpU |    |
| 8         | DMT-Dmb-TrpU |   |
| 10        | DMT-Dmv-TrpU |  |
| 11        | DMT-Mcp-TrpU |  |

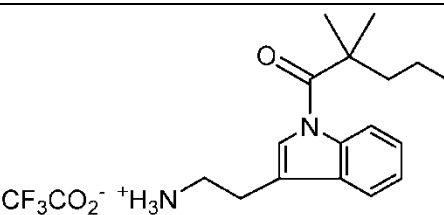
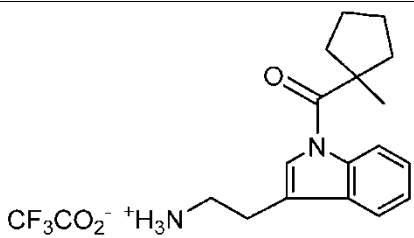
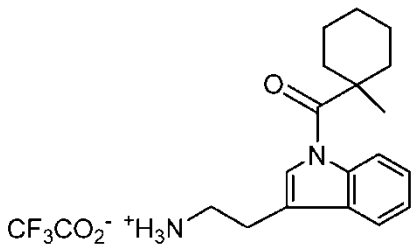
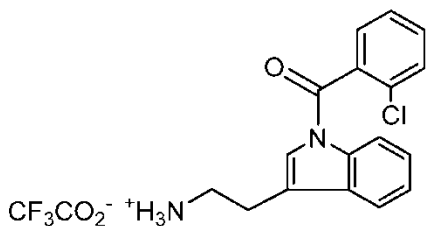
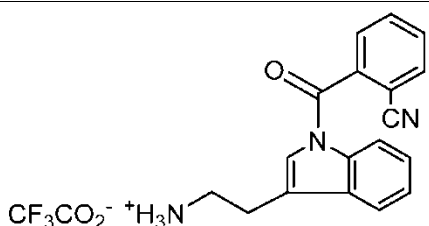
(continuación)

| Compuesto | Nombre       | Estructura |
|-----------|--------------|------------|
| 12        | DMT-Mch-TrpU |            |
| 13        | DMT-Clp-TrpU |            |
| 14        | DMT-Cyp-TrpU |            |
| 15        | Piv-BOC-Trp  |            |
| 16        | Dmb-BOC-Trp  |            |

(continuación)

| Compuesto | Nombre      | Estructura                                                                           |
|-----------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 17        | Dmv-BOC-Trp |    |
| 18        | Mcp-BOC-Trp |    |
| 19        | Mch-BOC-Trp |   |
| 20        | Clp-BOC-Trp |  |
| 21        | Cyp-BOC-Trp |  |
| 22        | Piv-Trp•TFA |  |
| 23        | Dmb-Trp•TFA |  |

(continuación)

| Compuesto | Nombre      | Estructura                                                                           |
|-----------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 24        | Dmv-Trp•TFA |    |
| 25        | Mcp-Trp•TFA |    |
| 26        | Mch-Trp•TFA |   |
| 27        | Clp-Trp•TFA |  |
| 28        | Cyp-Trp•TFA |  |

X<sub>3</sub> en las estructuras Table A puede, en algunas realizaciones, seleccionarse entre metoxi, flúor, hidrógeno, y *tert*-butildimetilsililo. En algunas realizaciones, los compuestos 1 a 7 de la Tabla A pueden usarse en la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida para producir oligonucleótidos que comprenden uno o más nucleótidos de TrpU. Se proporcionan también en el presente documento compuestos que comprenden una estructura seleccionada entre los compuestos 8 a 14, en la que el carbono 3' de la ribosa está unido a una fase sólida, tal como un vidrio de poro controlado, a través de un resto enlazador. En algunas realizaciones, el carbono 3' de la ribosa está unido a una fase sólida a través de un resto enlazador seleccionado entre succinato, diglicolato, y alquilamino.

- 5 Se pueden sintetizar los compuestos de la Tabla A, en algunas realizaciones, usando los métodos descritos en el presente documento, tal como en los Ejemplos del presente documento.

#### Sales

- 15 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto.

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO<sup>-</sup>), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, iones de metales alcalinos tales como Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, cationes alcalinotérreos tales como Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y otros cationes tales como Al<sup>3+</sup>. Los ejemplos de cationes orgánicos

- 20

adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, iones amonio (es decir,  $\text{NH}_4^+$ ) e iones de amonio sustituidos (por ejemplo,  $\text{NH}_3\text{R}^{X+}$ ,  $\text{NH}_2\text{R}^{X+}_2$ ,  $\text{NHR}^{X+}_3$ ,  $\text{NR}^{X+}_4$ ). Los ejemplos de algunos iones amonio sustituido adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitlohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperizina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ .

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo,  $-\text{NH}_2$  puede ser  $-\text{NH}_3^+$ ), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, los obtenidos a partir de los ácidos inorgánicos siguientes: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, los obtenidos a partir de los ácidos orgánicos siguientes: 2-acetioxi benzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluqueptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalencarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, mícico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico y valérico. Los ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, los obtenidos a partir de los ácidos poliméricos siguientes: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular también incluye formas salinas del mismo.

#### Oligonucleótidos modificados

Como usa en el presente documento, los términos "modificar", "modificado", "modificación", y cualquier variación de los mismos, cuando se usan en referencia a un oligonucleótido, significan que al menos una de las cuatro bases nucleotídicas constituyentes (es decir, A, G, T/U y C) del oligonucleótido es un análogo o éster de un nucleótido de origen natural. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado transmite resistencia a nucleasas al oligonucleótido. Las modificaciones adicionales pueden incluir modificaciones de la cadena principal, metilaciones, combinaciones de emparejamiento de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', tales como la protección. Otras modificaciones pueden incluir la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y aquellas con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellas que contienen alquilantes y aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos, alfa anoméricos, etc.). Adicionalmente, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en el azúcar de un nucleótido puede reemplazarse por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse mediante grupos de protección convencionales; o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH terminales 5' y 3' se pueden fosforilar o sustituir con aminas, restos de grupos de protección orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, polímeros de polietilenglicol (PEG) en una realización que varían de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 kDa, polímeros de PEG en otra realización que varían de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 kDa u otros polímeros sintéticos o biológicos hidrófobos o hidrófilos.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son normalmente conocidos en la técnica, incluyendo 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , 2'-fluoro, 2'- $\text{NH}_2$  o 2'-azido, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos de nucleósidos acíclicos y análogos abásicos, tales como metil ribósido. Como se observa en el presente documento, uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en donde el fosfato se reemplaza por  $\text{P}(\text{O})\text{S}$  ("tioato"),  $\text{P}(\text{S})\text{S}$  ("ditiato"),  $(\text{O})\text{NR}^{\text{X}}_2$  ("amidato"),  $\text{P}(\text{O})\text{R}^{\text{X}}$ ,  $\text{P}(\text{O})\text{OR}^{\text{X}}$ ,  $\text{CO}$  o  $\text{CH}_2$  ("formacetal"), en la que cada  $\text{R}^{\text{X}}$  o  $\text{R}^{\text{X}}$  son independientemente H o alquilo (C1-C20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La sustitución de formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, al igual que las estructuras de cadena principal alternativas como una cadena principal de poliamida, por ejemplo.

Los polinucleótidos pueden contener también formas análogas de análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos de nucleósidos acíclicos y análogos abásicos, tales como metil ribósido.

Si están presentes, se puede realizar una modificación en la estructura nucleotídica antes o después del ensamblaje

de un polímero. Se puede interrumpir una secuencia de nucleótidos mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje.

## 5 Preparación de oligonucleótidos

La síntesis automatizada de oligodesoxinucleósidos es una práctica habitual en muchos laboratorios (véase, por ejemplo, Matteucci, M. D. y Caruthers, M. H., (1990) J. Am. Chem. Soc., 103:3185-3191). También es bien conocida la síntesis de oligorribonucleósidos (véase, por ejemplo Scaringe, S. A., et al., (1990) Nucleic Acids Res. 18:5433-5441). Como se observa en el presente documento, las fosforamiditas son útiles para incorporar el nucleósido modificado a un oligonucleótido mediante síntesis química y los trifosfatos son útiles para incorporar el nucleósido modificado a un oligonucleótido mediante síntesis enzimática. (Véanse, p. ej., Vaught, J. D. et al. (2004) J. Am. Chem. Soc., 126:11231-11237; Vaught, J. V., et al. (2010) J. Am. Chem. Soc. 132, 4141-4151; Gait, M. J. "Oligonucleotide Synthesis a practical approach" (1984) IRL Press (Oxford, Reino Unido); Herdewijn, P. "Oligonucleotide Synthesis" (2005) (Humana Press, Totowa, N.J.).

En algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento y, en concreto, los compuestos 1 a 7 de la Tabla A, se pueden usar en los métodos de síntesis convencionales de oligonucleótidos con fosforamidita, incluidos los métodos automatizados que utilizan sintetizadores comercialmente disponibles. Tras la síntesis, el grupo protector del nucleótido TrpU se elimina con métodos de desprotección convencionales, tales como  $t\text{BuNH}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{MeNH}_2$  (gas).

En algunas realizaciones, el uso de los compuestos proporcionados en el presente documento, tales como los compuestos 1 a 7 de la tabla A, en la síntesis de oligonucleótidos mejora el rendimiento del producto de oligonucleótidos deseado. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 4, el uso de Piv-TrpdU CEP en lugar de TrpdU CEP sin proteger mejoró el rendimiento de un oligonucleótido de 51mer que comprende 13 nucleótidos TrpdU en aproximadamente 1,7 veces. Véase la Tabla 10. Para oligonucleótidos más largos, el rendimiento puede aumentarse en 2 veces o más. Véase la Tabla 11.

## 30 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. No se deben interpretar, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la invención. Las personas normalmente expertas en la técnica pueden adoptar fácilmente los principios subyacentes de este descubrimiento para diseñar diferentes compuestos de la investigación actual como se define en las reivindicaciones adjuntas.

### Ejemplo 1: Investigación de grupos protectores para triptamina

Se usó un sistema modelo para determinar la reactividad de diferentes grupos protectores de sulfonilo y acilo en condiciones convencionales de desprotección de oligonucleótidos. El compuesto, N- $\alpha$ -*tert*-butoxicarboniltriptamina (Figura 2, (1)), se usó como modelo de TrpdU. Se pueden sintetizar fácilmente diferentes derivados N-1 mediante tratamiento de (1) con *tert*-butoxido de potasio (1,1 eq) en tetrahidrofurano (THF), seguido por la adición del cloruro o anhídrido de sulfonilo o acilo adecuados (1,0 eq) (Figura 2). Véase Cole, D. C., et al, J. Med. Chem., 50(23), 5535-5538, 2007. Los derivados N-1 resultantes (Tabla 1) se purificaron mediante cristalización, cromatografía, o se usaron directamente en ensayos de desprotección.

Tabla 1. Reactivos para la síntesis de análogos de N-1 protegidos con  $\alpha$ -BOC-Triptamina.

| Cloruro o anhídrido de ácido                            | Nombre PG                    | Código | Fuente     | Análogo de N-1 triptamina | Referencia NB |
|---------------------------------------------------------|------------------------------|--------|------------|---------------------------|---------------|
| $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$                       | metanosulfonilo              | Ms     | Aldrich    | resina                    | 2000-20-0     |
| $4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{COCl}$          | p-toluenosulfonilo           | Ts     | Aldrich    | resina                    | 2000-21-0     |
| $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$                    | Trifluorometanosulfonilo     | Tf     | Aldrich    | cristalina                | 2000-31-1     |
| $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$                      | acetilo                      | Ac     | Aldrich    | cristalina                | 2000-26-1     |
| $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$                      | trifluoroacetilo             | TFA    | Aldrich    | cristalina                | 2000-24-1     |
| $(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO})_2\text{O}$             | benzoílo                     | Bz     | Aldrich    | cristalina                | 2000-30-1     |
| $(\text{CH}_3)_3\text{CCOCl}$                           | trimetilacetilo (pivaloílo)  | Piv    | Aldrich    | cristalina                | 2000-35-1     |
| $2,4,6\text{-(CH}_3)_3\text{-C}_6\text{H}_2\text{COCl}$ | trimetilbenzoílo (mesitoílo) | Ms     | Alfa Aesar | cristalina                | 2000-38-1     |
| $2,4,6\text{-Cl}_3\text{-PhCOCl}$                       | triclorobenzoílo             | Tcb    | Acros      | cristalina                | 2000-43-1     |
| $2\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{COCl}$         | o-toluoílo                   | Tol    | Aldrich    | resina                    | 2000-52-1     |
| $\text{Cl}_3\text{CCOCl}$                               | tricloroacetilo              | Tc     | Aldrich    | Síntesis fallida          | 2000-25-1     |

(continuación)

| Cloruro o anhídrido de ácido                                     | Nombre PG                           | Código | Fuente                           | Análogo de N-1 triptamina | Referencia NB |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------|----------------------------------|---------------------------|---------------|
| $\text{Cl}_3\text{CCH}_2\text{OCOC}$                             | carbonato de 2,2,2-tricloroetilo    | TROC   | Aldrich                          | cera                      | 2000-27-1     |
| $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{CCOCl}$                         | 2,2-dietilbutiroil [trietilacetilo] | Deb    | Etil éster: Alfa Aesar 2000-39-1 | resina                    | 2000-41-1     |
| $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2(\text{CH}_3)\text{CCOC}$<br>         | 2-etil-2metil-butiroilo             | Emb    | 3 etapas* 2000-50                | resina                    | 2000-49-1     |
| $(\text{CH}_3\text{CH}_2)(\text{CH}_3)_2\text{CCOC}$<br>         | 2,2-dimetilbutiroilo                | Dmb    | Alfa Aesar                       | aceite                    | 2000-42-1     |
| $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)(\text{CH}_3)_2\text{CCOCl}$ | 2,2,-dimetilvaleroilo               | Dmv    | Ácido: TCI America 2000-57       | resina                    | 2000-58-1     |
| $((\text{CH}_3)_2\text{CH})(\text{CH}_3)_2\text{CCOCl}$          | 2,2,3-trimetilbutiroilo             | Tmb    | 2 etapas** 2000-54-1             | resina                    | 2000-59-1     |
| $1\text{-CH}_3\text{-(cC}_5\text{H}_{10})\text{COCl}$            | 1-metilciclopentano carbonilo       | Mcp    | Ácido: Aldrich 2000-66-1         | resina                    | 2000-66-1     |
| $1\text{-CH}_3\text{-(cC}_6\text{H}_{12})\text{COCl}$            | 1-metilciclohexano carbonilo        | Mcb    | Aldrich                          | resina                    | 2000-67-1     |
| $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CHCOCl}$             | 2-n-propil-butiroilo                | Dpa    | Alfa Aesar                       | aceite                    | 2000-61-1     |

\* Chuit, C., et al, Tetrahedron, 36(16), 2305-10, 1980; Kudo, Noriaki, K., et al, Chem & Pharm Bull. 44(4), 699-702, 1996; Hoffamn, W. F., et al, J. Med. Chem., 29(5), 842-52, 1986.  
 \*\* Takahashi, Y., et al, Synthetic Communications, 19(11-12), 1945-54, 1989; Fathi, B., et al, Helvetica Chimica Acta, 85(7), 2083-2088, 2002.

Las condiciones del ensayo de desprotección se basaron en dos protocolos: *terc*-butilamina e hidróxido de amonio a 37 °C. Para disolver los compuestos del modelo hidrófobo, se añadió metanol a los reactivos de desprotección (Tabla 2). Las muestras de cada reacción de desprotección a 37 °C se analizaron a 1, 4, y 24 horas. En algunos casos, los sustratos se sometieron también a una condición de desprotección por "Estrés" a 70 °C durante 24 horas.

Tabla 2. Condiciones del modelo para la desprotección de oligonucleótidos

| Condición                                     | Reactivo de desprotección convencional            | Reactivo modificado (este estudio)                |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| tBuNH <sub>2</sub> ( <i>terc</i> -butilamina) | tBuNH <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1:2) | tBuNH <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (1:2:1) |
| NH <sub>4</sub> OH (hidróxido de amonio)      | NH <sub>4</sub> OH conc. (puro)                   | Conc. NH <sub>4</sub> OH:MeOH (2:1)               |

La tasa diana para la escisión alcalina de los grupos protectores en el sistema del modelo se definió mediante un modelo matemático. Se supuso que la desprotección seguiría una cinética de pseudoprimer orden en presencia de base en exceso. La tasa mínima aceptable se definió como una escisión del 99,9% en 24 horas. La tasa de reacción preferida proporcionaría más margen para la variabilidad y se definió como una escisión del 99,9 % en 12 horas. Basándose en estos criterios, el grupo protector deseado se escindiría en un 25-44 % en 1 hora y se escindiría en un 68-90 % en 4 horas y se escindiría  $\geq$  99,9 % en 24 horas.

Se controlaron las reacciones de desprotección mediante cromatografía en capa fina (TLC) clásica sobre placas de gel de sílice, eluyendo con 25 % de acetato de etilo/75 % de hexano. Se descubrió que la técnica de visualización en TLC era más precisa era la tinción alcalina con permanganato. La tinción con yodo puede dar como resultado una sobrerrepresentación del indol sin proteger, mientras que la visualización con luz UV puede dar como resultado una sobrerrepresentación de los derivados de N-1 acilo protegidos.

Se estudiaron en primer lugar los grupos protectores de sulfonilo. Se sintetizaron tres derivados que representan una gama de estructuras y reactividades: trifluorometanosulfonilo (trifilo); metanosulfonilo (mesilo); y bencenosulfonilo (besilo) (Tabla 1). Se descubrió que los tres derivados de sulfonilo eran completamente estables (escindidos un 0 %) en las condiciones de protección del modelo de oligonucleótidos (Tabla 3). Se concluyó que las condiciones alcalinas severas (NaOH + calor) descritas en la bibliografía para escindir los grupos protectores de N-1-indol sulfonilo son necesarias e incluso el muy reactivo grupo trifluorometanosulfonilo (Tf) es estable en condiciones de desprotección de oligonucleótidos más suaves.

Se sintetizó un conjunto de 16 análogos de acilo (4 arilo y 12 alquilo) a partir de BOC-triptamina y el reactivo de cloruro de ácido adecuado. Se obtuvieron comercialmente los 16 cloruros de ácido, o se sintetizaron a partir del ácido carboxílico comercialmente disponible mediante reacción con cloruro de tionilo, o se sintetizaron de novo en 2-3 etapas (Tabla 1).

Los grupos protectores de acilo mostraron una gama de reactividades en condiciones de desprotección alcalinas. Los cuatro derivados de aril acilo mostraron un espectro de reactividad (Tabla 4). El grupo benzoilo sin sustituir era demasiado reactivo y se escindió completamente en menos de 1 hora, mientras que los análogos 2,4,6-trisustituidos, Mes y Tcb, fueron demasiado estables y no mostraron escisión detectable en condiciones convencionales. Entre estos extremos estaba el análogo de 2-metilbenzoilo (Tol) moderadamente impedido, que se ajustó a las tasas de escisión diana deseadas. Se seleccionó el grupo Tol para evaluación adicional.

Tabla 3. Porcentaje de desprotección de los grupos sulfonilo ("Demasiado lenta").

| Reactivo           | Condición   | Diana   | Tf  | Ms  | Bs  |
|--------------------|-------------|---------|-----|-----|-----|
| tBuNH <sub>2</sub> | 37 °C, 1 h  | 25-44 % | 0 % | 0 % | 0 % |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-90 % | 0 % | 0 % | 0 % |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %   | 0 % | 0 % | 0 % |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %   | 0 % | 0 % | 0 % |
| NH <sub>4</sub> OH | 37 °C, 1 h  | 25-44 % | 0 % | 0 % | 0 % |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-90 % | 0 % | 0 % | 0 % |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %   | 0 % | 0 % | 0 % |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %   | 0 % | 0 % | 0 % |

Tabla 4. Porcentaje de desprotección para grupos aril acilo ("Adecuado" = Tol).

| Reactivo           | Condición   | Diana     | Bz    | Tol          | Tcb  | Mes |
|--------------------|-------------|-----------|-------|--------------|------|-----|
| tBuNH <sub>2</sub> | 37 °C, 1 h  | 25-58 %   | 100 % | <b>60 %</b>  | 0 %  | 0 % |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-99,9 % | -     | <b>95 %</b>  | 0 %  | 0 % |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %     | -     | <b>100 %</b> | 5 %  | 0 % |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %     | -     | -            | 50 % | 0 % |
| NH <sub>4</sub> OH | 37 °C, 1 h  | 25-58 %   | 100 % | <b>60 %</b>  | 0 %  | 0 % |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-99,9 % | -     | <b>95 %</b>  | 0 %  | 0 % |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %     | -     | <b>100 %</b> | 5 %  | 0 % |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %     | -     | -            | 50 % | 0 % |

Ninguno de los 12 grupos protectores de alquil acilo cumple la tasa diana deseada. Se descubrió que los análogos eran bien demasiado reactivos (Tabla 5) o bien demasiado estables (Tabla 6). Se descubrió que pequeños cambios estructurales cambian drásticamente la tasa de escisión alcalina. Por ejemplo, dimetiletilacetilo (Dmb) es demasiado rápido mientras que el dietilmetilacetilo (Meb) es demasiado lento.

Ninguno de los análogos demasiado estables (Tabla 5) se consideraron para desarrollo adicional ya que la desprotección incompleta generalmente es no aceptable en la síntesis de oligonucleótidos.

Hubo cinco análogos en el grupo de demasiado rápidos (Tabla 5) con actividad aproximadamente equivalente: Piv, Mcp, Mch, Dmv, y Dmb. Todos mostraron una escisión del -90 % en 1 hora y una escisión del 100 % en 4 horas, que fue más rápida que las tasas diana deseadas. No obstante, Piv y Dmb se seleccionaron para evaluación adicional.

En resumen, el sistema modelo de la N- $\alpha$ -BOC-triptamina inicial permitió la identificación de tres líderes como posibles grupos N-1 protectores: Tol, Dmb, y Piv. Los tres líderes presentaron una gama de reactividades en condiciones de desprotección SOS alcalinas: Piv > Dmb > Tol.

Tabla 5. Porcentaje de desprotección de los grupos alquil acilo ("Demasiado rápida")

| Reactivo           | Condición   | Diana     | TFA   | Ac    | Piv          | Mcp   | Mch   | Dmv   | Dmb          |
|--------------------|-------------|-----------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------------|
| tBuNH <sub>2</sub> | 37 °C, 1 h  | 25-58 %   | 100 % | 100 % | <b>95 %</b>  | 90 %  | 90 %  | 90 %  | <b>80 %</b>  |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-99,9 % | -     | -     | <b>100 %</b> | 100 % | 100 % | 100 % | <b>100 %</b> |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %     | -     | -     | -            | -     | -     | -     | -            |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %     | -     | -     | -            | -     | -     | -     | -            |
| NH <sub>4</sub> OH | 37 °C, 1 h  | 25-58 %   | 100 % | >50 % | <b>90 %</b>  | 90 %  | 90 %  | 90 %  | <b>80 %</b>  |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-99,9 % | -     | 100 % | <b>100 %</b> | 100 % | 100 % | 100 % | <b>100 %</b> |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %     | -     | -     | -            | -     | -     | -     | -            |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %     | -     | -     | -            | -     | -     | -     | -            |

Tabla 6. Porcentaje de desprotección de los grupos alquil acilo ("Demasiado lenta")

| Reactivo           | Condición  | Diana     | Dpa  | Tmb  | Emb  | Deb |
|--------------------|------------|-----------|------|------|------|-----|
| tBuNH <sub>2</sub> | 37 °C, 1 h | 25-58 %   | 20 % | 20 % | 20 % | 0 % |
|                    | 37 °C, 4 h | 68-99,9 % | 70 % | 60 % | 60 % | 0 % |

(continuación)

| Reactivo           | Condición   | Diana     | Dpa  | Tmb   | Emb   | Deb  |
|--------------------|-------------|-----------|------|-------|-------|------|
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %     | 98 % | 95 %  | 90 %  | 0 %  |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %     | -    | 100 % | 100 % | 10 % |
| NH <sub>4</sub> OH | 37 °C, 1 h  | 25-58 %   | 20 % | 10 %  | 20 %  | 0 %  |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-99,9 % | 70 % | 50 %  | 60 %  | 0 %  |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %     | 95 % | 95 %  | 90 %  | 0 %  |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %     | -    | 100 % | 100 % | 10 % |

**Ejemplo 2: Uso de grupos protectores seleccionados en TrpU**

Se observaron reactividades diferentes de los tres grupos protectores N-1 (Piv > Dmb > Tol) se observaron tras la eliminación del grupo N- $\alpha$ -BOC y la conversión a forma de base libre. La base libre protegida con N-1 es inestable debido a que el grupo acilo N-1 (amina aromática) migra al N-a (alquilamina primaria), que forma un enlace amida más fuerte (Figura 4). Esta redistribución autodegradativa es análoga a la desprotección alcalina convencional.

Los tres análogos, Piv > Dmb > Tol, se trataron con ácido trifluoroacético en diclorometano para escindir el grupo protector de N- $\alpha$ -BOC. Las reacciones se inactivaron con carbonato de sodio al 5 % y las bases exentas de triptamina protegidas con N-1 se extrajeron con acetato de isopropilo. Se llevó a cabo un ensayo de estabilidad calentando los extractos de bases libre (-100 mM) a 70 °C durante la noche. Se descubrió que el compuesto Piv estaba completamente descompuesto, el compuesto Dmb se descompuso al -50 %, y el compuesto Tol se descompuso <5 %. Se observó un grado similar de degradación cuando se concentraron los extractos en el rotovap y las aminas puras se mantuvieron durante la noche a temperatura ambiente. Se descubrió que los extractos eran estables si se almacenaban en el congelador.

Los tres líderes (Tol, Dmb, Piv) se convirtieron a continuación en las correspondientes 5'-DMT-2'-desoxiuridina-5-carboxamidas eliminando el grupo BOC y condensación de las triptaminas protegidas con N-1 con 5'-O-DMT-5-(2,2,2-trifluoroetioxi-carbonil)-2'-desoxiuridina (TFEdU) para obtener los nucleósidos TrpdU protegidos con N-1: Tol-TrpdU, Dmb-TrpdU y Piv-TrpdU. Para minimizar la autodegradación de las aminas, la TFEdU se añadió directamente a los extractos secos derivados de de-BOC antes de la concentración en el rotovap. Se descubrió que, usando este método, predomina la ruta de reacción deseada, dando como resultado las 5'-DMT-2'-desoxiuridina-5-carboxamidas puras, que se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice.

Estos nucleósidos se evaluaron a continuación en los ensayos de desprotección alcalina modelo (Tabla 7). Se descubrió que la escisión de los grupos protectores de acilo, Tol y Dmb, fue más lenta en los compuestos nucleósidos TrpdU que en el modelo de BOC-triptamina inicial (Tabla 6).

Tabla 7. Porcentaje de desprotección de los nucleósidos de TrpdU protegidos con N-1.

| Reactivo           | Condición   | Diana   | Tol   | Dmb   | Piv   |
|--------------------|-------------|---------|-------|-------|-------|
| tBuNH <sub>2</sub> | 37 °C, 1 h  | 25-44 % | 10 %  | 70 %  | 95 %  |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-90 % | 50 %  | 100 % | 100 % |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %   | 90 %  | -     | -     |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %   | 100 % | -     | -     |
| NH <sub>4</sub> OH | 37 °C, 1 h  | 25-44 % | 10 %  | 30 %  | 95 %  |
|                    | 37 °C, 4 h  | 68-90 % | 50 %  | 70 %  | 100 % |
|                    | 37 °C, 24 h | 100 %   | 95 %  | 100 % | -     |
|                    | 70 °C, 24 h | 100 %   | 100 % | -     | -     |

**Ejemplo 3: Síntesis de Piv-TrpdU CEP**

Se desarrolló un proceso en 3 etapas eficaz para preparar la cadena lateral de N-1-Piv-triptamina (como la sal de trifluoroacetato [TFA] estable), que implica tres intermedios cristalinos y no requiere cromatografía. La sal de TFA se acopla a continuación con TFEdU. En las Figuras 5 y 6 se muestra el proceso completo.

**N- $\alpha$ -BOC-triptamina.** Un método de preparar N- $\alpha$ -BOC-triptamina que evita que se desarrollara la cromatografía en gel de sílice. El uso de acetato de isopropilo como disolvente permite al producto cristalizar directamente desde la mezcla de reacción. Véase la Figura 5.

El material de partida, triptamina, es un sólido cristalino regular, de color naranja pálido o castaño claro, tal como el comercialmente disponible actualmente de Alfa Aesar (producto A11116). La triptamina de color marrón con olor fecal, debe recrystalizarse antes del uso. El anhídrido de BOC (dicarbonato de di-*tert*-butilo); producto 205249), y el resto de disolventes y reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich y se usaron según se recibieron.

Un matraz de fondo redondo de 1 l agitado mecánicamente se cargó con triptamina (49,32 g, 308 mmol), y acetato de isopropilo (200 ml). La mezcla se agitó rápidamente con un borboteador de argón y se añadió gota a gota una solución de dicarbonato de di-*tert*-butilo (70,53 g, 323 mmol) en acetato de isopropilo (100 ml) durante 30 minutos. El gas comenzó a desprenderse de forma continua tras haber añadido ~40 ml y todos los sólidos se habían disuelto casi al finalizar de la adición, dando como resultado una solución de color amarillo. Se continuó la agitación durante otros 30 minutos y la comprobación mediante TLC confirmó el consumo de la triptamina de partida (SG60, 10 % de MeOH/90 % de diclorometano,  $R_f(\text{SM}) = 0,1$ ,  $R_f(\text{producto}) = 0,8$ ).

La solución se filtró para eliminar algo de arena y polvo. El filtrado (~395 g) se concentró en el rotovap hasta ~250 g y la solución caliente (40 °C) se diluyó lentamente con hexanos (~220 ml), hasta el inicio de la turbiedad. La solución se sembró con 10 mg de producto auténtico y cristalizó inmediatamente. La suspensión se envejeció agitando 1 hora a temperatura ambiente y 1 hora en hielo, a continuación se filtró y enjuagó adicionalmente con 25 % de *i*PrOAc/75 % de hexanos (75 ml). La torta del filtro se lavó con hexanos (100 ml) y se secó al vacío para dar como resultado la *N*- $\alpha$ -BOC-triptamina como un sólido cristalino de color blanco (pf 86-88 °C), 61,75 g, rendimiento del 77 %).

***N*- $\alpha$ -BOC-*N*-1-trimetilacetil-triptamina.** Basándose en el trabajo de Cole, D. C., et al, J. Med. Chem., 50(23), 5535-5538, 2007, se usó inicialmente *tert*-butóxido de potasio en THF como la base y el disolvente de la reacción, pero se produjo ~5 % de un subproducto dimérico polar (estructura exacta no determinada), que fue difícil de eliminar mediante cristalización. Se intentaron algunos disolventes y combinaciones de bases, que desvelaron que el subproducto dimérico podría suprimirse usando *tert*-butóxido de sodio en dietil éter. Se añadió el cloruro de trimetilacetilo en porciones pequeñas al final para valorar volumétricamente el anión *N*-1, sin generar subproductos sobreacilados. Véase la Figura 5.

Un matraz de fondo redondo de 1 l relleno de argón seco con una barra de agitación magnética (1,5") grande se cargó con *N*- $\alpha$ -BOC-triptamina (28,63 g, 110 mmol) y polvo de *tert*-butóxido de sodio (11,63 g, 121 mmol, precaución: polvo irritante). Se añadió dietil éter (anhidro, 400 ml) mediante cánula bajo argón y la agitación durante 10 min dio como resultado una suspensión uniforme blanquecina. Se colocó un embudo de adición calibrado, se cargó con una solución de cloruro de trimetilacetilo (14,6 g, 121 mmol, 110 % teórico) en dietil éter (~50 ml) para un volumen total de 60 ml. La suspensión se enfrió en hielo y se agitó rápidamente y se añadió gota a gota la mayoría de la solución de cloruro de ácido (54,5 ml, 110 mmol, 100 % teórico) durante ~40 min. La solución se agitó durante otros 20 min y se tomó una muestra para la TLC [una alícuota de 0,2 ml en 1 ml de diclorometano] (SG60, 25 % de acetato de etilo/75 % de hexanos;  $R_f(\text{SM}) = 0,2$ ,  $R_f(\text{producto}) = 0,4$ ). Si el material de partida es detectable (>1 %), entonces se añadió una carga adicional correspondiente de solución de cloruro de ácido (1-10 % teórico, como se indicó por el análisis de TLC) y la agitación continuó durante 1 hora.

La reacción se inactivó con bicarbonato de sodio al 5 % (200 ml) y acetato de isopropilo (100 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera de NaCl (50 ml), se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó hasta sequedad al vacío para proporcionar un sólido de color castaño (~37 g). Este producto en bruto se recrystalizó en una solución caliente de acetato de isopropilo (74 ml) y hexanos (296 ml). Tras el enfriamiento a ~35 °C, la solución agitada se sembró con producto auténtico (50 mg) y cristalizó inmediatamente. La suspensión se agitó rápidamente 1 hora a temperatura ambiente y 1 hora en hielo. La suspensión se filtró, se enjuagó directamente con una porción del filtrado (30 ml), y a continuación la torta se lavó con hexanos (60 ml) y se secó al vacío. Se obtuvo la *N*- $\alpha$ -BOC-*N*-1-trimetilacetil-triptamina como un sólido cristalino de color blanco a blanquecino (pf 95-97 °C), 30,7 g, rendimiento del 81 %).

Si se desea, el producto puede reprocesarse mediante recrystalizaciones adicionales a partir de acetato de isopropilo (2 ml/g) y hexanos (8 ml/g).

**Trifluoroacetato de *N*-1-trimetilacetil-triptamina.** Esta sal es un sólido cristalino de color blanco que se filtra y lava fácilmente y es estable y no higroscópica. La sal cristaliza directamente a partir de la mezcla de reacción. Véase la Figura 5.

Se equipó un matraz de fondo redondo de 500 ml con un adaptador Claisen y un borboteador de aceite configurado para barrer lentamente el espacio superior con argón. Esto facilita la eliminación del gas isobutileno de la mezcla de reacción y reduce los productos secundarios.

Un matraz de fondo redondo de 500 ml (configurado como anteriormente), con una gran barra de agitación mecánica, se cargó con *N*- $\alpha$ -BOC-*N*-1-trimetilacetil-triptamina (30,0 g, 87,1 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (90 ml), y se añadió ácido trifluoroacético (53 ml, 693 mmol, 8 equiv.). La solución se agitó rápidamente a medida que se desprendía isobutileno gaseoso que se barría a través del borboteador de aceite. Después de 1 hora, comenzaron a formarse cristales en la mezcla y el análisis de TLC mostró que el material de partida se había consumido completamente (SG60, 25 % de acetato de etilo/75 % de hexanos;  $R_f(\text{SM}) = 0,4$ ;  $R_f(\text{producto}) = 0$ ). Se añadió Dietil éter (~275 ml) gota a gota a la mezcla bien agitada, haciendo que espese, y la suspensión resultante se agitó rápidamente durante 1 hora a temperatura ambiente. Se derribó algo de torta de pared blanda con la barra de agitación y la suspensión se filtró y enjuagó abundantemente con dietil éter (100 ml). La torta se lavó cuidadosamente con dietil éter (100 ml) y se secó al vacío para dar como resultado la sal de trifluoroacetato de *N*-1-

trimetilacetil-triptamina como un polvo cristalino blanco (pf 150-152 °C), 30,0 g, rendimiento del 96 %).

La sal de trifluoroacetato de N-1-trimetilacetil-triptamina no es significativamente higroscópica y puede enviarse a temperatura ambiente, protegida de la luz en un recipiente cerrado herméticamente. Los ensayos de estabilidad informales mostraron que la sal era estable a 70 °C durante diez días en un vial cerrado herméticamente. Para el almacenamiento a largo plazo (>1 mes), se pueden usar condiciones de almacenamiento refrigeradas o congeladas como una precaución.

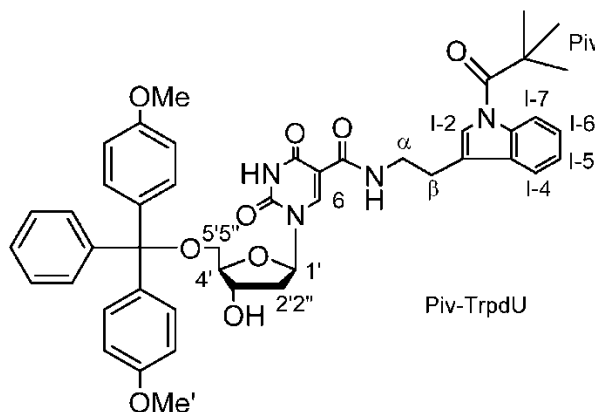
En la Tabla 8 se muestra un sumario de las características de <sup>1</sup>H-RMN de determinados compuestos de triptamina.

Tabla 8. <sup>1</sup>H-RMN Sumario de los compuestos de triptamina (ppm frente a TMS).

|                        | Material de partida            | Intermedios           | Intermedios                | Intermedios             | Subproductos              | Subproductos         |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|
| 300 MHz                | <b>triptamina</b>              | <b>N-α-BOC-Trp</b>    | <b>N-α-BOC-N-1-Piv-Trp</b> | <b>N-1-Piv-Trpe-TFA</b> | <b>N-α-N-1-di-Piv-Trp</b> | <b>N-α-Piv-Trp</b>   |
| Disolvente             | DMSO-d6                        | CDCl3                 | CDCl3                      | DMSO-d6                 | CDCl3                     | CDCl3                |
| <b>α-CH2</b>           | 2,73-2,83 m                    | 3,50, m               | 3,49, m                    | 3,17, t, J = 7 Hz       | 3,61, q, J = 7 Hz         | 3,61, q, J = 7 Hz    |
| <b>β-CH2</b>           | 2,73-2,83 m                    | 2,99, t a, J = 6,8 Hz | 2,94, t, J = 6,8 Hz        | 3,05, t, J = 7 Hz       | 2,94, dt, J = 1,7 Hz      | 3,00, q, J = 7 Hz    |
| <b>N-1-H</b>           | 10,79 sa                       | 8,33 sa               | ninguna                    | ninguna                 | ninguna                   | 8,76 sa              |
| <b>N-α-H</b>           | 1,31, 2H, sa,                  | 4,70 sa               | 4,73 sa                    | 8,14, 3H, vsa (NH3+)    | 5,89, t a, J = 7 Hz       | 5,85 sa              |
| <b>2-H</b>             | 7,12 da, J = 2 Hz              | 7,02, ssa             | 7,58, sa                   | 8,00, ssa               | 7,57, sa                  | 7,01, d, J = 2 Hz    |
| <b>4-H</b>             | 7,51, d a, J = 8 Hz            | 7,64, d a, J = 8 Hz   | 7,54, d a, J = 7 Hz        | 7,65, dd, J = 1,8 Hz    | 7,55, d a, J = 8 Hz       | 7,64d J = 8 Hz       |
| <b>5-H</b>             | 6,96, dt, J = 1,8 Hz           | 7,16, dt, J = 1,8 Hz  | 7,29, dt, J = 1,7 Hz       | 7,29, dt, J = 1,8 Hz    | 7,27, dt, J = 1,8 Hz      | 7,14 dt J = 1,8 Hz   |
| <b>6-H</b>             | 7,05, dt, J = 1,8 Hz           | 7,24, dt, J = 1,8 Hz  | 7,36, dt, J = 1,7 Hz       | 7,34, dt, J = 1,8 Hz    | 7,35, dt J = 1,8 Hz       | 7,22 dt J = 1,8 Hz   |
| <b>7-H</b>             | 7,33, dt, J = 8,1 Hz           | 7,39, dd, J = 1,8 Hz  | 8,52, dd, J = 1,8 Hz       | 8,40, d a, J = 8 Hz     | 8,51, dt, J = 8,1 Hz      | 7,39, dt, J = 8,1 Hz |
| <b>BOC</b>             | ninguna                        | 1,49, s, 9H           | 1,52, s, 9H                | ninguna                 | ninguna                   | ninguna              |
| <b>Piv</b>             | ninguna                        | ninguna               | 1,45, sa, 9H               | 1,45, s, 9H             | 1,49, N-1, s, 9H          | 1,16, s, 9H          |
|                        |                                |                       |                            |                         | 1,15, N-α, s, 9H          |                      |
| <b>Ref</b>             | 2000-88-SM                     | 1488-133, 2000-88     | 2000-90                    | 2000-113                | 2000-85-F5, 2000-121      | 2000-120-1           |
| <b>PM</b>              | 160,22                         | 260,34                | 344,45                     | 358,36                  | 328,46                    | 244,34               |
| <b>EM-(encontrado)</b> | 144,1/161,1 (EM <sup>+</sup> ) | 259,1                 | 343,1                      | sin ensayo              | 327,2                     | sin ensayo           |
| <b>19RMNF</b>          | ninguna                        | ninguna               | ninguna                    | 73,64 s                 | ninguna                   | ninguna              |

**5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-5-[N-(((N-1-trimetilacetil)-3-indol)-2-etil)carboxamida]-2'-desoxiuridina (Piv-TrpdU).** Un matraz de fondo redondo de 200 ml se cargó con 5'-O-DMT-5-(2,2,2-trifluoroetioxi-carbonil)-2'-desoxiuridina (TFEdU, calidad técnica ca. 90 %, 13,1 g, 20 mmol sin corregir) y la sal de trifluoroacetato de N-1-trimetilacetil-triptamina (9,23 g, 26 mmol, 1,3 eq). acetonitrilo anhidro (104 ml) se añadió mediante jeringuilla, seguido por trietilamina (5,6 ml, 40 mmol, 2,0 eq). La solución de color naranja resultante se calentó con argón a 60 °C durante 24 horas. Se retiró una alícuota de 0,1 ml y se diluyó con diclorometano para el análisis de la TLC (SG60, eluyente: 1:1 acetona:hexano). Véase la Figura 6. Si el material de partida de TFEdU sigue siendo detectable (>1 %), entonces se añadió una carga correspondiente (1-5 %) de trifluoroacetato de N-1-trimetilacetil-triptamina y se continuó el calentamiento. Si se consumió el TFEdU (<1 %), entonces, la mezcla de reacción se evaporó hasta una espuma en el rotovap. Redisolver la espuma (~33 g) en diclorometano (30 ml) para la cromatografía.

Se acondicionó una columna de gel de sílice ultrarrápida 4"D x 6"H con 2/2/96 de TEA/MeOH/DCM (4 l), a continuación se enjuagó con 2/98 de MeOH/DCM (2 l). El producto en bruto se aplicó y eluyó con 1/99 de MeOH/DCM (2 l), seguido por 2/98 de MeOH/DCM. Se recogieron las fracciones (250 ml) y se combinaron las fracciones 8-19 para proporcionar un nucleósido de piv-TrpdU como un sólido de color amarillo pálido, 14,8 g (rendimiento del 66 %). La manipulación del sólido húmedo con argón minimiza el amarilleamiento.



<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>CN, 300 MHz): δ 8,76 (1H, t, J = 6 Hz, CONHCH<sub>2</sub>), 8,54 (s, 1H, H-6), 8,41 (1H, d, J = 8 Hz, 1-7), 7,73 (1H, sa, 1-2), 7,60 (1H, dt, J = 8,1 Hz, 1-4), 6,81-7,43 (15H, m, trilito y solapamiento de 1-5 y 1-6), 6,09 (1H, t, J = 6,5 Hz, H-1'), 4,24-4,28 (1H, m, H-3'), 3,98 (1H, q, J = 4 Hz, H-4'), 3,701 (3H, s, MeO), 3,700 (3H, s, MeO'), 3,62-3,69 (2H, m, CH<sub>2</sub>-α), 3,25-3,27 (2H, m, H-5' y H-5''), 2,95 (2H, t, J = 6,8 Hz, CH<sub>2</sub>-β), 2,18-2,34 (2H, m, H-2' y H-2''), 1,41 (9H, s, Piv).

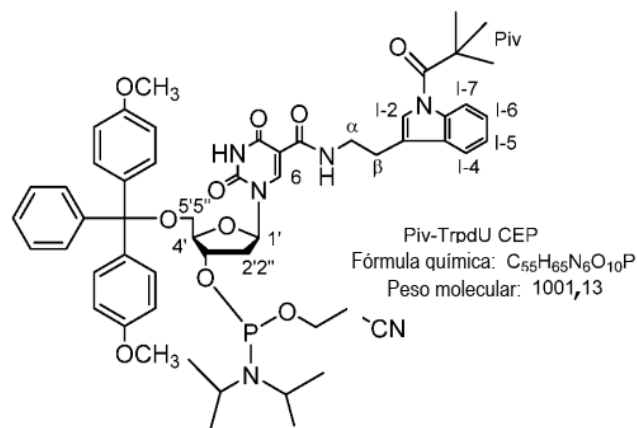
<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>CN, 100 MHz, 33°C): δ 177,0, 163,0, 161,8, 158,6, 149,5, 145,6, 145,1, 137,1, 135,8, 130,1, 129,5, 128,0, 127,9, 126,8, 125,0, 123,8, 123,2, 118,7, 118,6, 117,0, 113,1, 105,7, 86,3, 86,2, 71,0, 63,6, 54,8, 40,9, 40,2, 38,3, 27,8, 24,8.

Espectro de masas  $[M-H]^-$ : calculado para  $C_{46}H_{48}N_4O_9$ : 800.91; parte experimental: 799.3.

**5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-5-[N-(((N-1-trimetiacetil)-3-indol)-2-etil)carboxamida]-2'-desoxiuridina-3'-O-(N,N-diisopropil-O-2-cianoetilfosforamidita (Piv-TrpdU CEP)).** Todos los disolventes cromatográficos se desoxigenaron rociando con argón usando un tubo fino de dispersión de gas. En preparación para la reacción, se acondicionó una columna de gel de sílice ultrarrápida 6"D x 6"H con 2/30/68 de Et<sub>3</sub>N/hexanos/ETOAc (8 l) y a continuación se enjuagó con 30/70 de hexanos/ETOAc (4 l). Se preparó eluyente 30/70 adicional (16 l) y se desgasificó.

Se cargó un matraz de fondo redondo seco en argón con Piv-TrpdU (41,3 g, 51,5 mmol), diclorometano anhidro (83 ml), 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosoramidita (18,0 ml, 56,7 mmol, 1.1 eq), y por último, polvo de trifluoroacetato de piridina (10,95 g, 56,7 mmol, 1.1 eq). La mezcla se agitó rápidamente, dando como resultado una solución de color amarillo y después de 30 minutos, se retiró una alícuota para el análisis de la TLC (SG60, eluyente: 1/1 EtOAc/hexano) que mostró que se consumió el material de partida y se formaron dos productos no polares. Véase la Figura 6.

La mezcla de reacción total se aplicó a la columna ultrarrápida preparada y se eluyó con 30/70 de hexanos/EtOAc, recoger 10 x 0,5 l, a continuación se rellenaron fracciones de 10 x 1 l en frascos de suero rellenos con argón. El producto (dos diastereómeros) se recogió a partir de las fracciones 8-17 combinadas, que se evaporaron con argón, se filtró con filtro de pulido, y se expulsó con ACN anhidro (2 x 500 ml). El secado a alto vacío dio como resultado Piv-TrpdU CEP como una espuma blanquecina (42,9 g, rendimiento del 83 %).



<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>CN, 300 MHz) δ 9,61 (1H, sa, NH-3), 8,73/8,72 (1 H, 2ta, J = 5,6/ 5,6 Hz, CONHCH<sub>2</sub>), 8,58/8,56 (1H, 2s, H-6), 8,43/8,41 (1H, 2da, J = 8 Hz, Indol-7), 7,74 (1H, sa, Indol-2), 7,60 (1H, d a, J = 8 Hz, Indol-4), 6,83-7,45 (15 H, m, 13xtrilito e Indol-5 e Indol-6, solapamiento), 6,11/6,09 (1H, 2t, J = 6,6/6,6 Hz), 3,72 (3H, s, OMe), 4,38-4,47 (1H, m, H-3'), 4,12-4,15 (1H, m, H-4'), 3,71 (3H, s, OMe'), 3,51-3,76 (6H, m, CONHCH<sub>2</sub>, 2 x Me<sub>2</sub>CH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, solapamiento), 3,29-3,35 (2H, m, H-5' y H-5"), 2,50/2,61 (2H, 2t, J = 6/ 6 Hz, CH<sub>2</sub>CN), 2,27-2,54 (2H, m, H-2' y H-2"), 1,41 (9H, s, Piv), 1,01-1,16 (12H, m, 2 x [CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>CH).

<sup>31</sup>P-RMN (CD<sub>3</sub>CN, 161 MHz) δ 148,12, 148,09.

- 10 Se proporciona en la Tabla 9 un resumen de datos analíticos adicionales y un historial de desarrollo discontinuo para los tras análogos de TrpdU CEP N-1 protegidos.

Tabla 9. Historial de desarrollo discontinuo para análogos de TrpdU CEP N-1 protegidos

| Lote de CEP | Análogo   | Nucleósido SM (lote)              | Rendimiento y color de CEP | PM de CEP | [M-H] <sup>-</sup> (encontrado) | HPLC: (isómeros $\leq$ 2) | <sup>1</sup> H y <sup>31</sup> P RMN |
|-------------|-----------|-----------------------------------|----------------------------|-----------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Lote 1      | Tol-TrpdU | 6,0 g (2000-62-1)                 | 6,0 g (80 %) color blanco  | 1035,15   | 1033,3/1034,3                   | 99,04 %                   | aprobado                             |
| Lote 1      | Dmb-TrpdU | 5,9 g (2000-76-1)                 | 3,4 g (47 %) color blanco  | 1015,16   | 1013,4/1014,4                   | 99,39 %                   | aprobado                             |
| Lote 1      | Piv-TrpdU | 10,8 g (2000-85-1)                | 11,0 g (81 %) color blanco | 1001,1    | 999,3/1000,3                    | 99,69 %                   | aprobado                             |
| Lote 2      | Piv-TrpdU | 41,3 g (4 lotes = <99,26 %> HPLC) | 42,9 g (83 %) color blanco | 1001,1    | 999,4/1000,4                    | 99,43 %                   | aprobado                             |

#### 15 Ejemplo 4: Uso de grupos protectores seleccionados en TrpdU Fosforamiditas

Los tres análogos principales protegidos con N-1, Tol-TrpdU, Dmb-TrpdU y Piv-TrpdU, se convirtieron en cianoetil-N,N-diisopropil fosforamiditas (CEP), sustancialmente como se ha descrito anteriormente y se evaluó su uso en la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.

Las tres TrpdU CEP protegidas trabajaron bien en la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, pero Tol-TrpdU mostró una desprotección incompleta en algunos casos, consistente con el sistema modelo de nucleósidos (Tabla 7). Dmb-TrpdU y Piv-TrpdU estuvieron completamente desprotegidos en todas las condiciones convencionales (tBuNH<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; MeNH<sub>2</sub> (gas)).

Los aptámeros que tienen la misma secuencia de nucleótidos se sintetizaron tanto con Piv-TrpdU CEP, el TrpdU CEP original sin proteger como con NapdU CEP (control positivo; Tabla 10) con cada dU modificado ocupando la posición de la base U en la secuencia. El aptámero es un 51-mer que tiene 13 restos en la posición dU.

Tabla 10: Aptámeros sintetizados usando Piv-TrpdU, TrpdU, y NapdU

| Reactivo de CEP: | Aptámero   | Longitud | n.º de TrpdU | Area%FL |
|------------------|------------|----------|--------------|---------|
| TrpdU            | Aptámero 1 | 51       | 13           | 25,1    |
| Piv-TrpdU        | Aptámero 2 | 51       | 13           | 44,1    |
| NapdU            | Aptámero 3 | 51       | 0            | 45,6    |

La Figura 4 muestra los resultados de los tres aptámeros que tienen cualquiera de Piv-TrpdU, TrpdU, y NapdU incorporados. TrpdU CEP sin proteger proporciona un amplio pico eluyendo muchos subproductos de forma temprana y tardía. Piv-TrpdU CEP proporciona un perfil notablemente más limpios con una anchura de pico más estrecha, comparable al aptámero del control que tiene la NapdU CEP.

La Piv-TrpdU CEP se usó para sintetizar seis aptámeros diferentes para demostrar la mejora en el rendimiento usando la nueva fosforamidita sobre TrpdU sin proteger. Los primeros cuatro aptámeros en la Tabla 11 (Aptámeros 1 a 4) se sintetizaron en un sintetizador MerMade (AME Bioscience) a una escala de 1 µmol usando condiciones convencionales, y que han dado como resultado anteriormente bajos rendimientos usando TrpdU sin proteger. El quinto aptámero en la tabla 11 (Aptámero 5) se sintetizó en un sintetizador ABI usando un flujo de trabajo y condiciones de desprotección convencionales, y mostraron rendimientos aceptables con TrpdU sin proteger. El sexto aptámero (Aptámero 6) se sintetizó en un sintetizador ABI usando un flujo de trabajo y condiciones de desprotección convencionales y proporcionaron previamente rendimientos bajos usando TrpdU sin proteger.

La Tabla 11 muestra los resultados de este experimento.

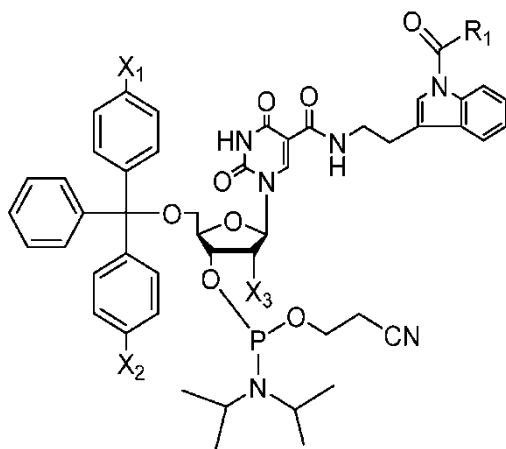
Tabla 11: Rendimientos de síntesis (% de SOMAmer de longitud completa) usando Piv-TrpdU frente a TrpdU

|                 |                       |                             | <b>TrpdU CEP</b> | <b>Piv-TrpdU CEP</b>                            |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------|------------------|-------------------------------------------------|
| <b>Aptámero</b> | <b>Longitud (nts)</b> | <b>n.º de posiciones dU</b> | <b>%de FL</b>    | <b>%de FL</b>                                   |
| Aptámero 1      | 74                    | 12                          | 17,5             | <b>37,1</b>                                     |
| Aptámero 2      | 74                    | 13                          | 11,0             | <b>35,7</b>                                     |
| Aptámero 3      | 74                    | 13                          | 13,0             | <b>43,5</b>                                     |
| Aptámero 4      | 49                    | 11                          | 17,0             | <b>42,0</b>                                     |
| Aptámero 5      | 50                    | 13                          | 57,0             | <b>72,0</b>                                     |
| Aptámero 6      | 38                    | 11                          | 22               | <b>55,8</b><br><b>56,4</b><br><b>(2 ciclos)</b> |

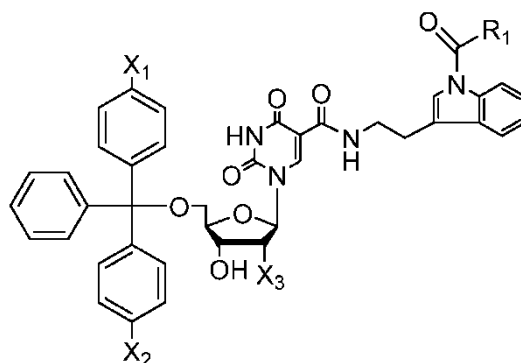
El uso de la Piv-TrpdU CEP en la síntesis de oligonucleótidos de los aptámeros 1-4 y 6 aumentó el rendimiento de síntesis de los aptámeros en aproximadamente 250-300 % de los rendimientos de síntesis de los aptámeros con TrpdU sin proteger. El uso de la Piv-TrpdU CEP en la síntesis de oligonucleótidos del aptámero 5 aumentó el rendimiento de síntesis en aproximadamente un 25 % sobre el rendimiento de síntesis del aptámero con en no protegido con TrpdU. Por tanto, aunque diferentes sintetizadores pueden proporcionar diferentes rendimientos, la tendencia general es que el uso de la Piv-TrpdU CEP mejora los rendimientos de la síntesis de oligonucleótidos en comparación con el uso de TrpdU sin proteger.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula A o fórmula B:



A



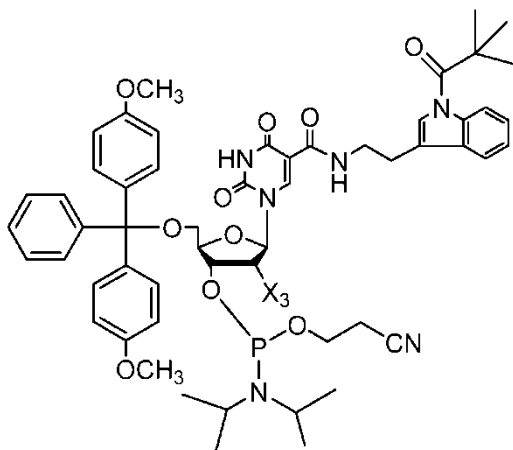
B,

o una de sus sales;  
en el que,

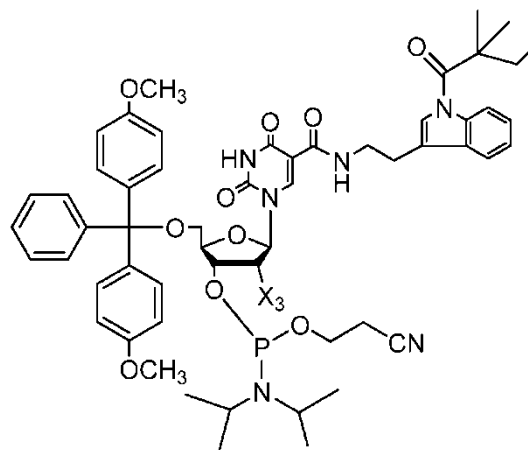
10  $R_1$  se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo, 1,1-dimetil-butilo, 2-clorofenilo, 2-cianofenilo, 1-metilciclopentilo y 1-metil-ciclohexilo;  
cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  se selecciona independientemente entre metoxi e hidrógeno;  
 $X_3$  se selecciona entre metoxi, flúor, hidrógeno y *tert*-butildimetilsiloxi.

15 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que (i)  $R_1$  es *tert*-butilo; y/o (ii)  $X_1$  y  $X_2$  son metoxi; y/o (iii)  $X_3$  es hidrógeno, metoxi o flúor.

3. El compuesto de la reivindicación 1, seleccionado entre:

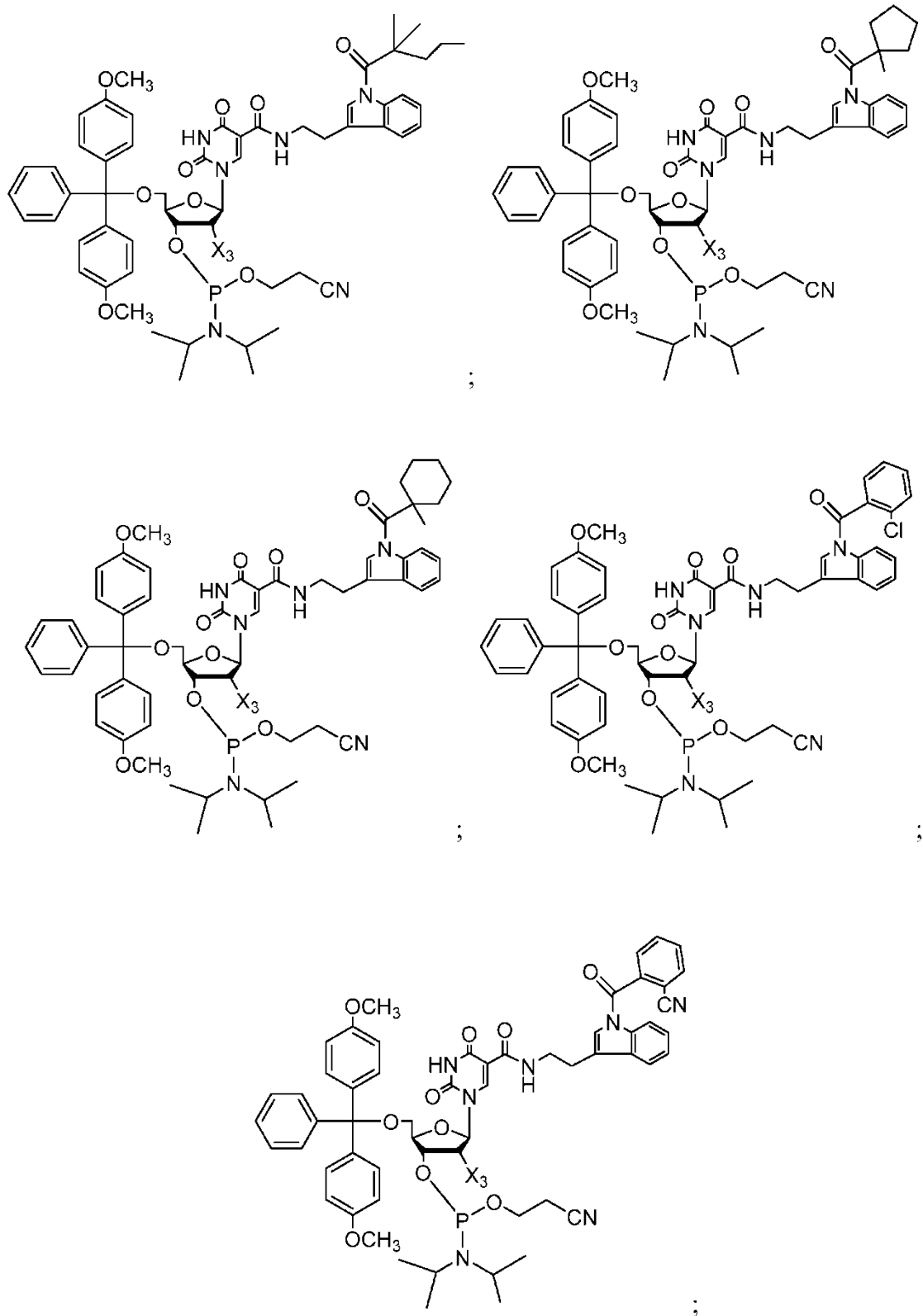


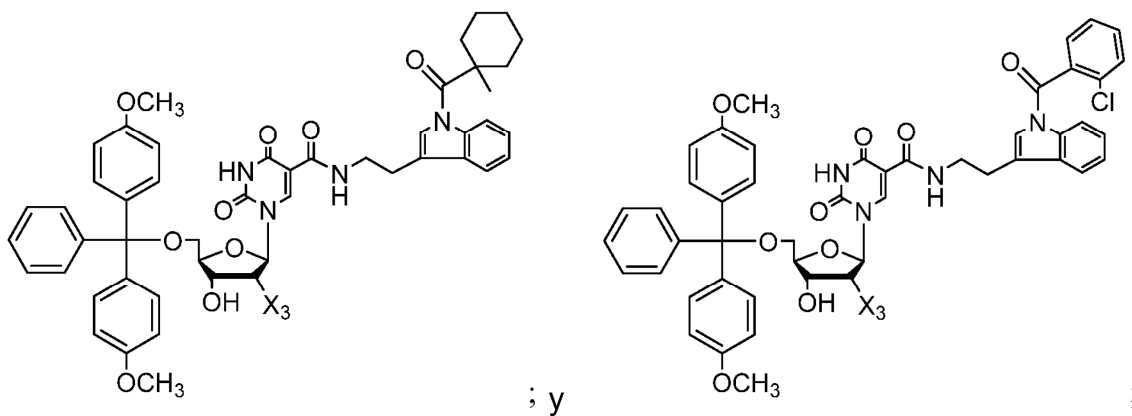
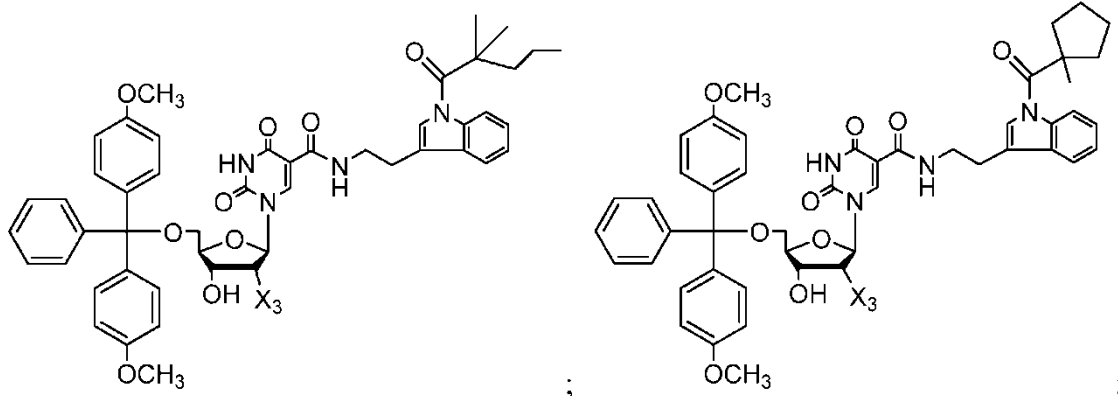
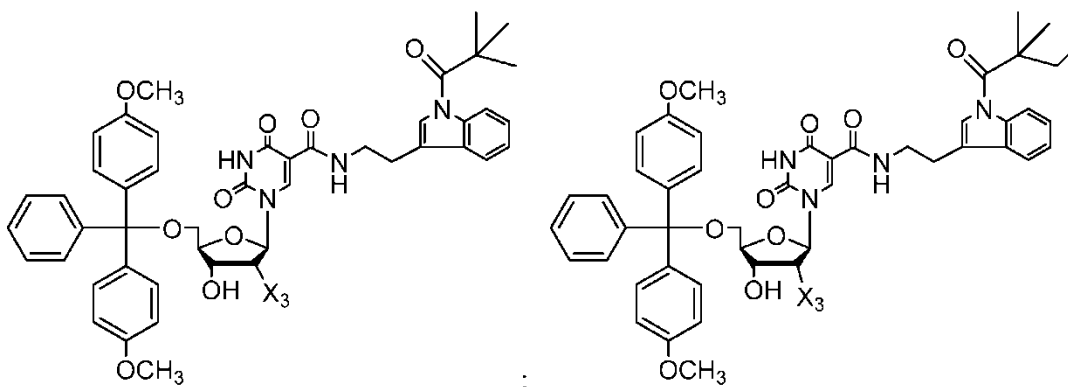
;



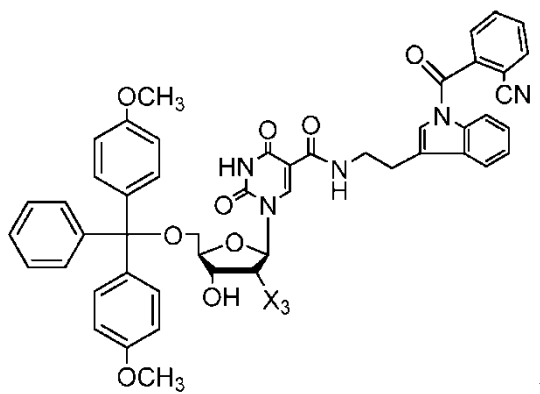
;

20





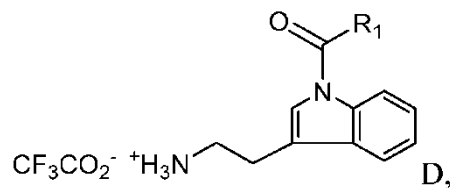
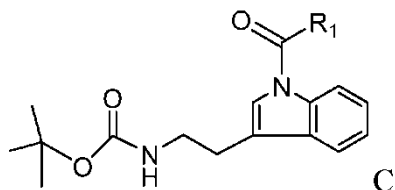
5



y sus sales.

10

4. Un compuesto de fórmula C o fórmula D:



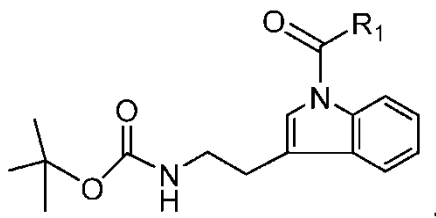
5 o una de sus sales;

en el que,

R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo, 1,1-dimetil-butilo, 2-clorofenilo, 2-cianofenilo, 1-metilciclopentilo y 1-metil-ciclohexilo.

10 5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R<sub>1</sub> es *tert*-butilo.

6. Un método de producir un compuesto de fórmula:



15

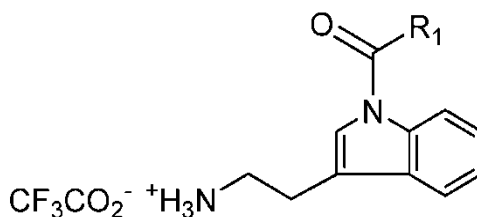
o una de sus sales;

en el que,

20 R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo, 1,1-dimetil-butilo, 2-clorofenilo, 2-cianofenilo, 1-metilciclopentilo y 1-metil-ciclohexilo; comprendiendo el método hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutiroilo, cloruro de 2,2-dimetilvaleroilo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo y cloruro de 2-cianobenzoilo.

25 7. El método de la reivindicación 6, en el que R<sub>1</sub> es *tert*-butilo, y en donde el cloruro de ácido es cloruro de pivaloilo.

8. Un método de producir un compuesto de fórmula:



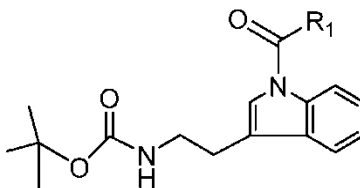
30

en el que,

R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo, 1,1-dimetil-butilo, 2-clorofenilo, 2-cianofenilo, 1-metilciclopentilo y 1-metil-ciclohexilo;

comprendiendo el método hacer reaccionar el compuesto

35

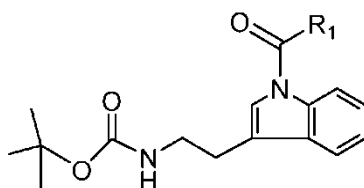


con ácido trifluoroacético,

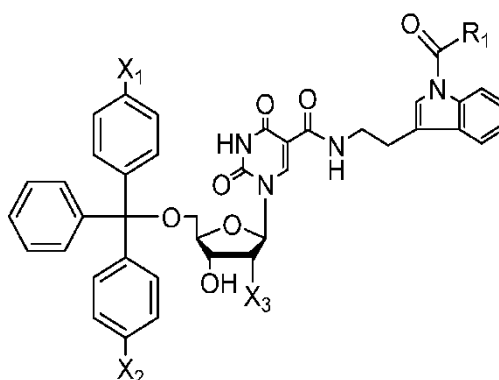
comprendiendo opcionalmente además hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutiroilo, cloruro de 2,2-dimetilvaleroilo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo y cloruro de 2-

40

cianobenzoílo, para formar el compuesto

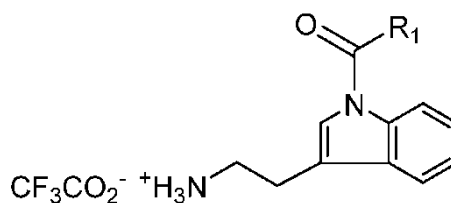


- 5 9. El método de la reivindicación 8, en el que R<sub>1</sub> es *terc*-butilo.
10. Un método de producir un compuesto de fórmula:

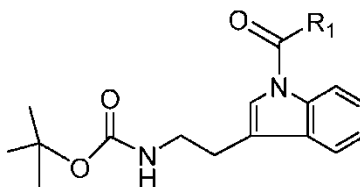


- 10 o una de sus sales;  
en el que,

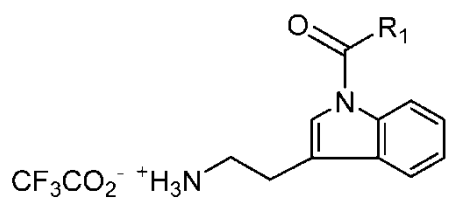
- 15 R<sub>1</sub> se selecciona entre *terc*-butilo, 1,1-dimetil-propilo, 1,1-dimetil-butilo, 2-clorofenilo, 2-cianofenilo, 1-metilciclopentilo y 1-metil-ciclohexilo;  
cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se selecciona independientemente entre metoxi e hidrógeno;  
X<sub>3</sub> se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno y *terc*-butildimetilsililo; comprendiendo el método hacer reaccionar el compuesto



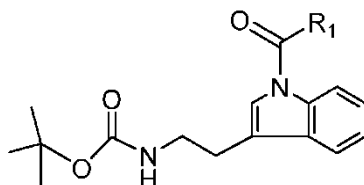
- 20 con 5'-O-DMT-5-(2,2,2-trifluoroetioxi-carbonil)-2'-desoxiuridina (TFEdU), en donde el método comprende opcionalmente hacer reaccionar el compuesto



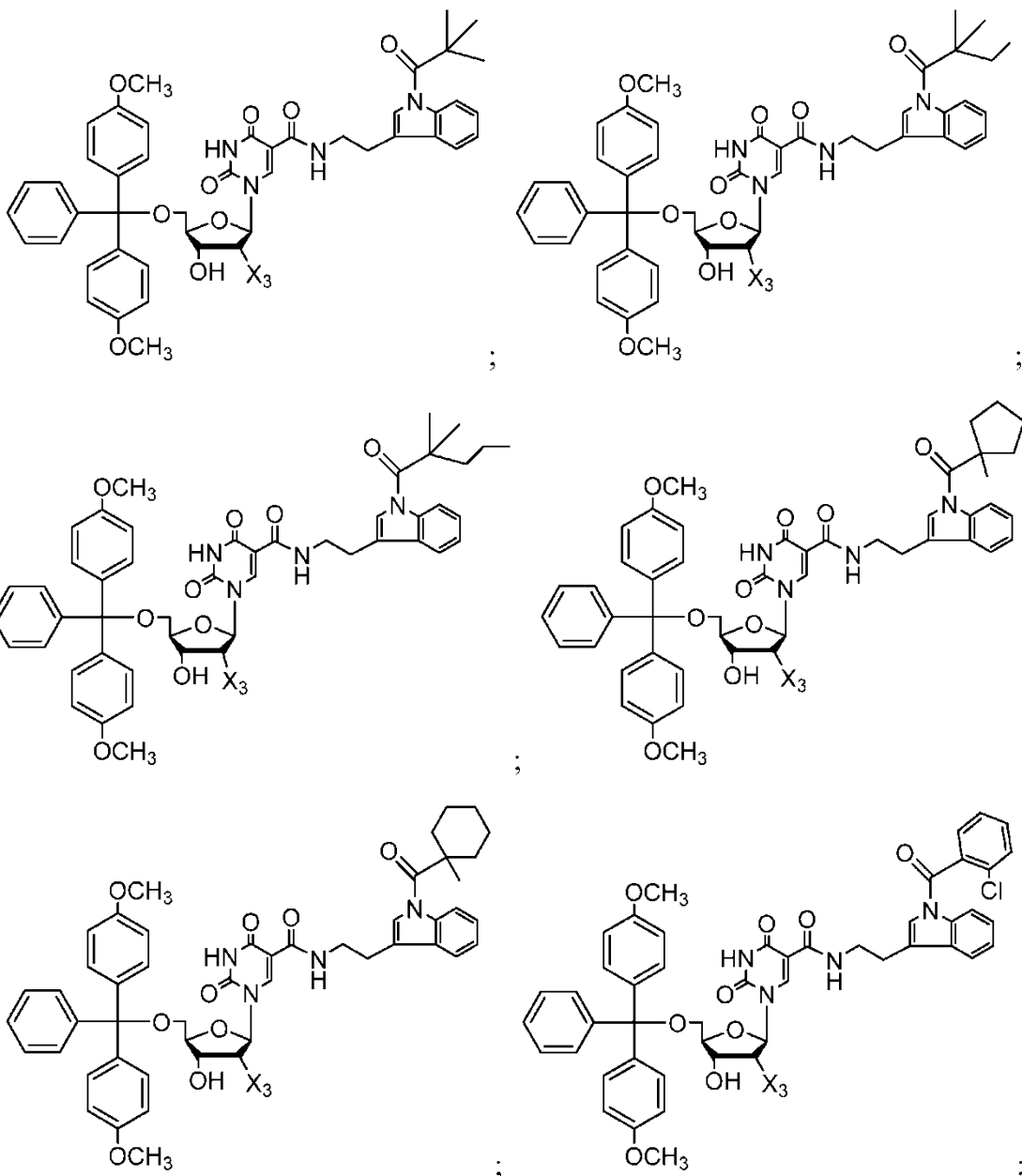
- 25 con ácido trifluoroacético para formar el compuesto



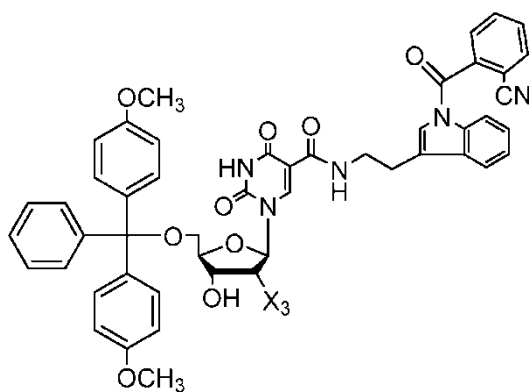
comprendiendo opcionalmente además hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutirol, cloruro de 2,2-dimetilvaleroilo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo y cloruro de 2-cianobenzoilo, para formar el compuesto



11. El método de la reivindicación 10, en donde el método produce un compuesto seleccionado entre:

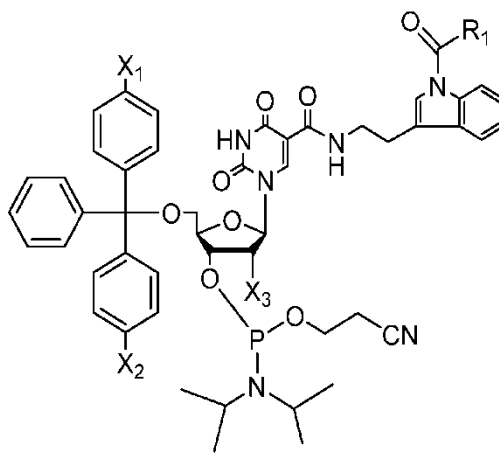


y



y sus sales.

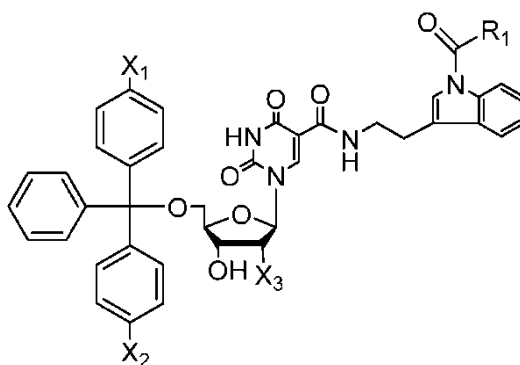
- 5 12. Un método de producir un compuesto de fórmula:



o una de sus sales;  
10 en el que,

- R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo, 1,1-dimetil-butilo, 2-clorofenilo, 2-cianofenilo, 1-metilciclopentilo y 1-metil-ciclohexilo;  
cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se selecciona independientemente entre metoxi e hidrógeno;  
15 X<sub>3</sub> se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno y *tert*-butildimetilsililo;

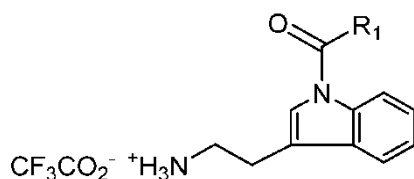
comprendiendo el método hacer reaccionar el compuesto



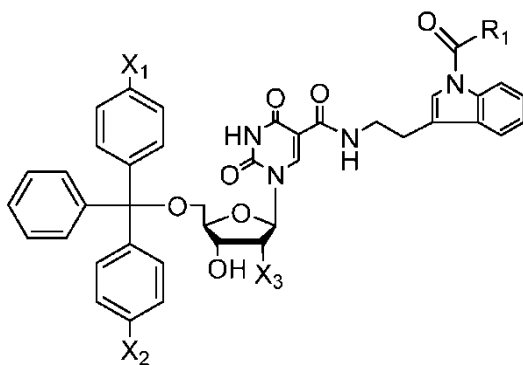
20 con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidita.

13. El método de la reivindicación 12, en el que (i) R<sub>1</sub> es *tert*-butilo y/o (ii) X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son metoxi y/o (iii) X<sub>3</sub> es hidrógeno, metoxi o flúor.

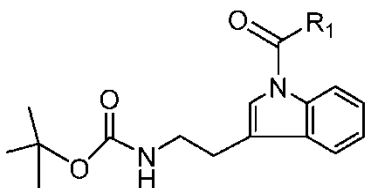
14. El método de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, en donde el método comprende hacer reaccionar el compuesto



5 con 5'-O-DMT-5-(2,2,2-trifluoroetioxi-carbonil)-2'-desoxiuridina (TFEdU) para formar el compuesto

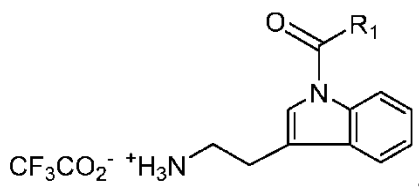


10 opcionalmente en donde el método comprende hacer reaccionar el compuesto



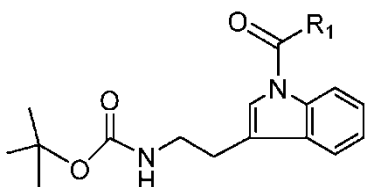
con ácido trifluoroacético para formar el compuesto

15

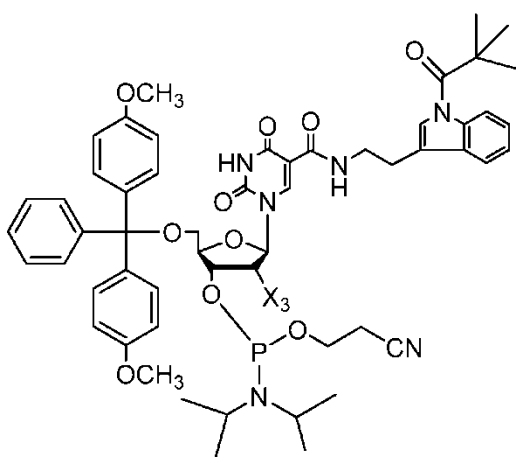


opcionalmente en donde el método comprende hacer reaccionar N- $\alpha$ -BOC-triptamina con un cloruro de ácido seleccionado entre cloruro de pivaloilo, cloruro de 2,2-dimetilbutiroylo, cloruro de 2,2-dimetilvaleroylo, cloruro de 1-metilciclopentano-1-carbonilo, cloruro de 1-metilciclohexano-1-carbonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo y cloruro de 2-cianobenzoilo, para formar el compuesto

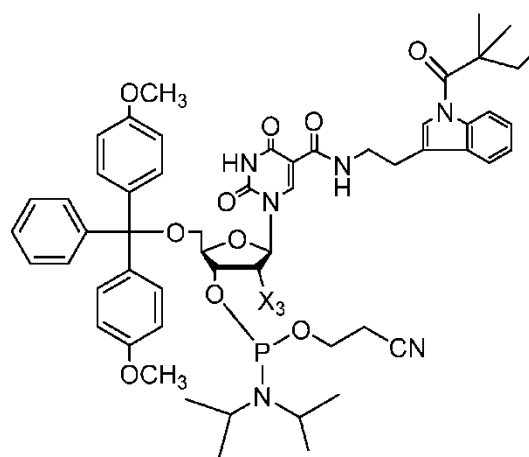
20



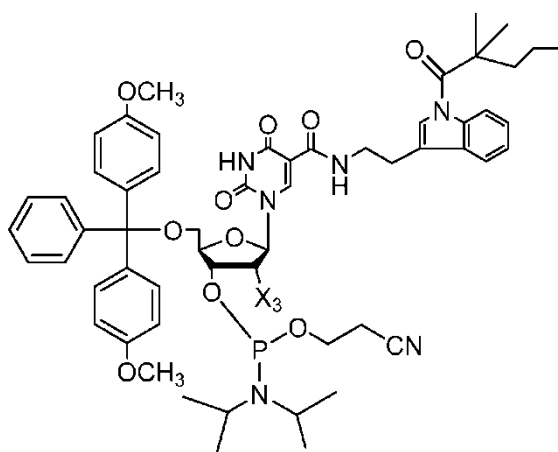
25 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que produce un compuesto seleccionado entre:



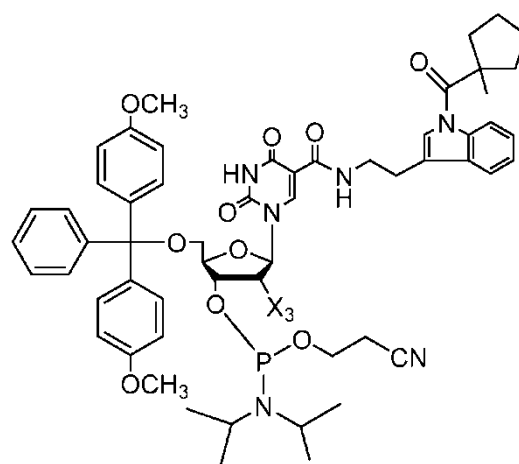
;



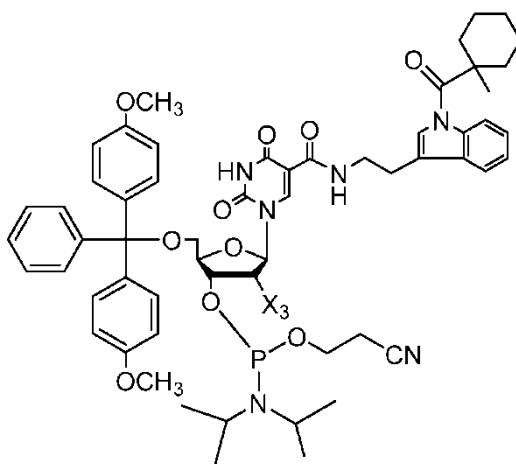
;



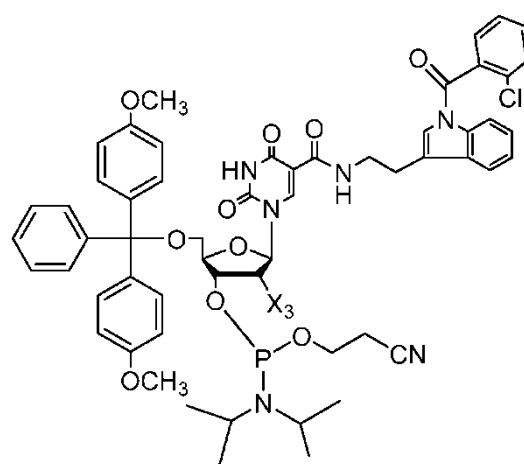
;



;

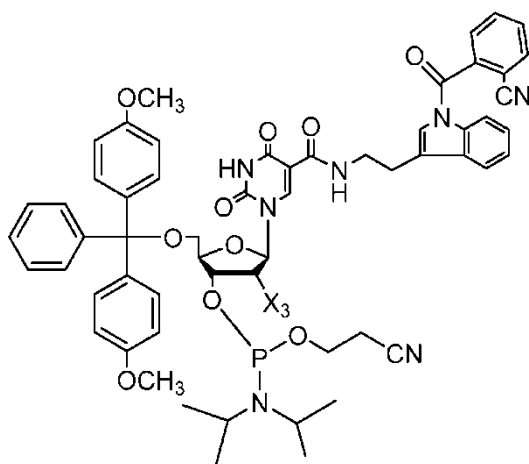


;



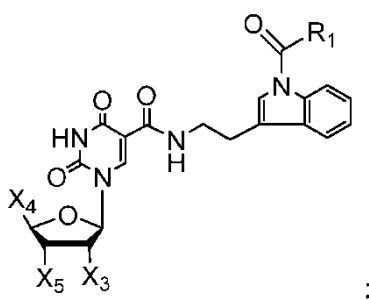
;

y



y sus sales.

- 5 16. Un oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido TrpU protegido, en donde al menos un nucleótido TrpU protegido en el oligonucleótido tiene la estructura:



10 en el que,

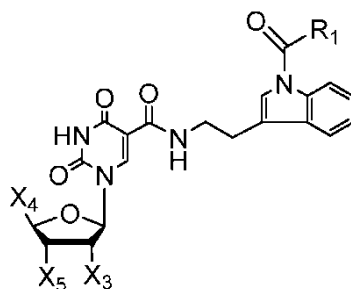
R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo, 1,1-dimetil-butilo, 2-clorofenilo, 2-cianofenilo, 1-metilciclopentilo y 1-metil-ciclohexilo;

X<sub>3</sub> se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno y *tert*-butildimetilsililo;

15 X<sub>4</sub> se selecciona entre OH, -OR, -SR y -Z-P(Z')(Z'')O-R, en donde Z, Z', y Z'' se seleccionan cada uno de manera independiente entre O y S, y R es un nucleótido adyacente en el oligonucleótido; y

X<sub>5</sub> se selecciona entre -O-ss, -OR, -SR y -Z-P(Z')(Z'')O-R, en donde ss es un soporte sólido, Z, Z' y Z'' se seleccionan cada uno de manera independiente entre O y S, y R es un nucleótido adyacente en el oligonucleótido.

- 20 17. Un método para producir un oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido TrpU, que comprende incorporar al menos un nucleótido que tiene la estructura:



25 en el que,

R<sub>1</sub> se selecciona entre *tert*-butilo, 1,1-dimetil-propilo, 1,1-dimetil-butilo, 2-clorofenilo, 2-cianofenilo, 1-metilciclopentilo y 1-metil-ciclohexilo;

30 X<sub>3</sub> se selecciona entre un metoxi, flúor, hidrógeno y *tert*-butildimetilsililo;

X<sub>4</sub> se selecciona entre OH, -OR, -SR y -Z-P(Z')(Z'')O-R, en donde Z, Z' y Z'' se seleccionan cada uno de manera independiente entre O y S, y R es un nucleótido adyacente en el oligonucleótido; y

X<sub>5</sub> se selecciona entre -O-ss, -OR, -SR y -Z-P(Z')(Z'')O-R, en donde ss es un soporte sólido, Z, Z' y Z'' se seleccionan cada uno de manera independiente entre O y S, y R es un nucleótido adyacente en el oligonucleótido;

5. seleccionar una base de manera independiente entre C, G, A, T de un nucleótido; en una secuencia de nucleótidos sobre un soporte sólido; y eliminar el grupo protector



10 de al menos un nucleótido TrpU incorporado en el oligonucleótido.

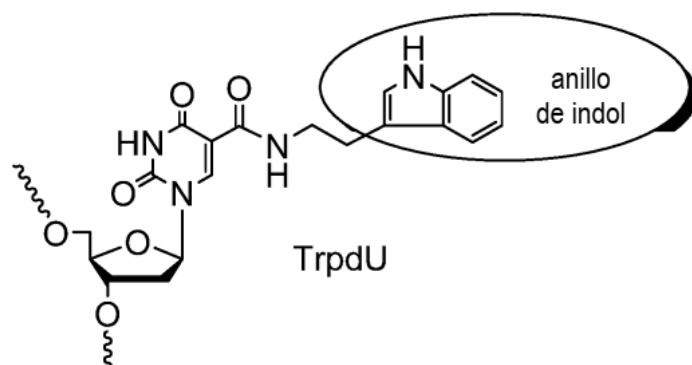


FIG. 1

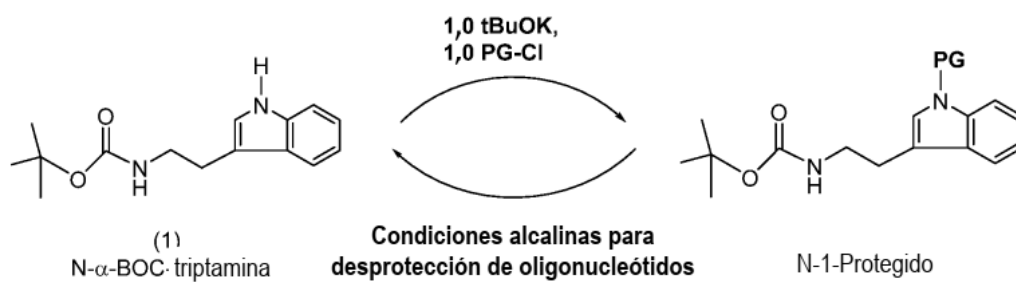


FIG. 2

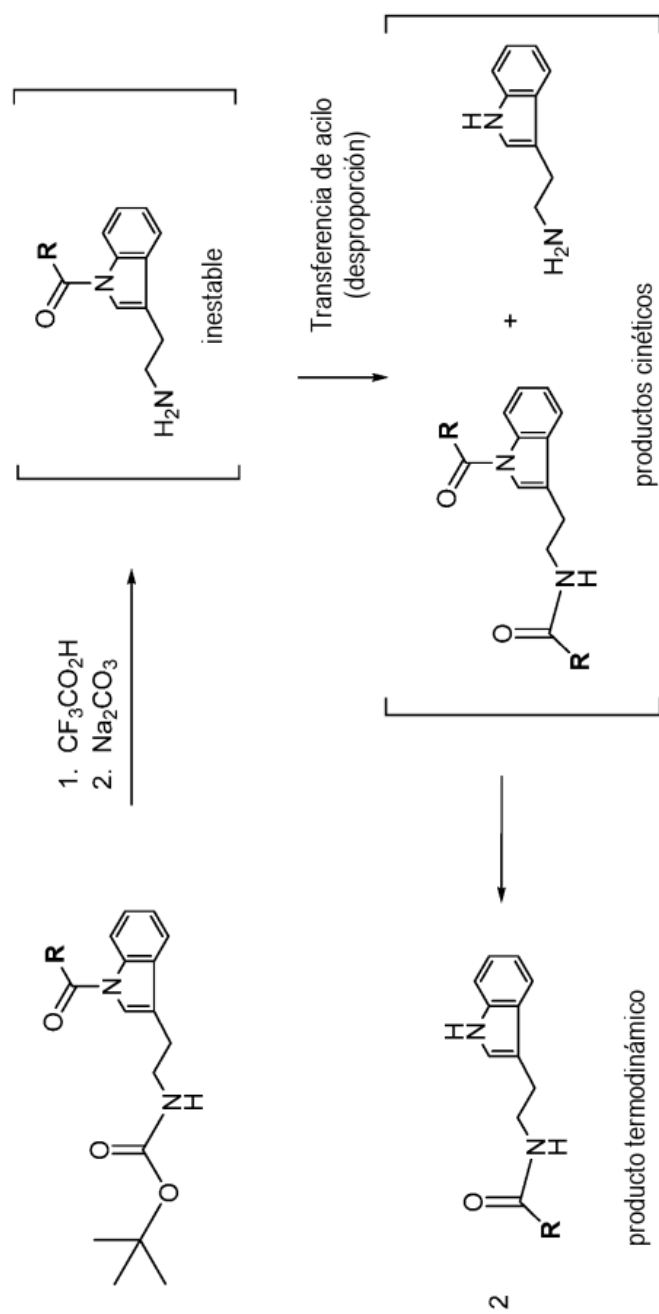
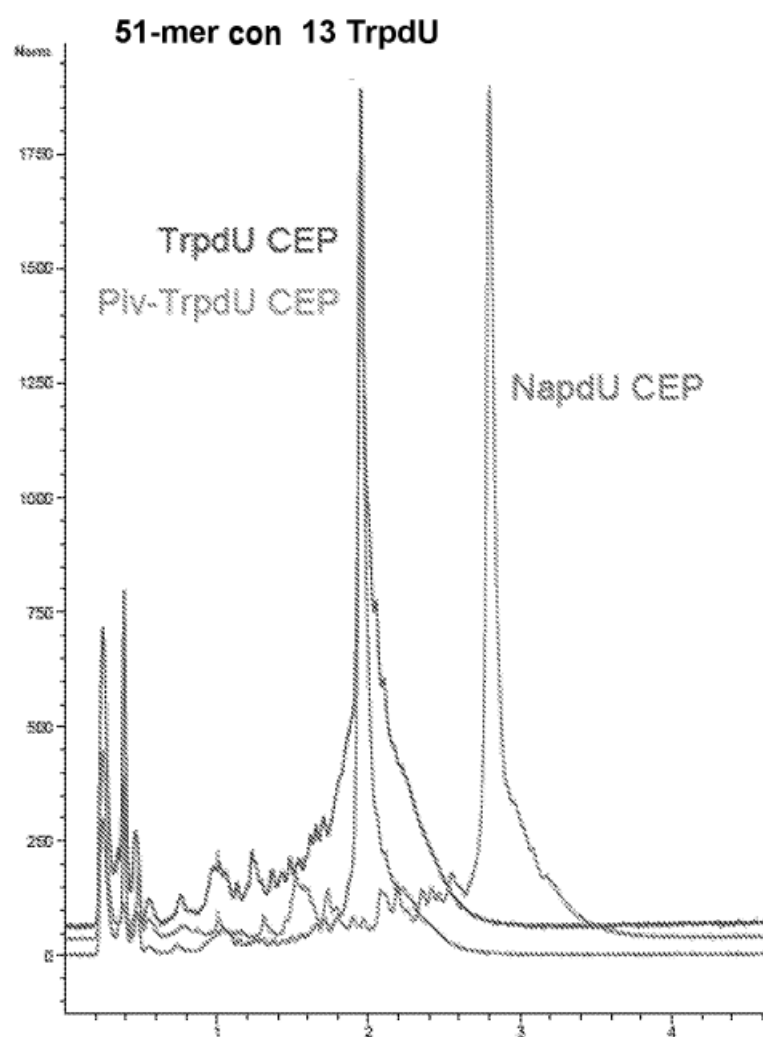


FIG. 3



**FIG. 4**

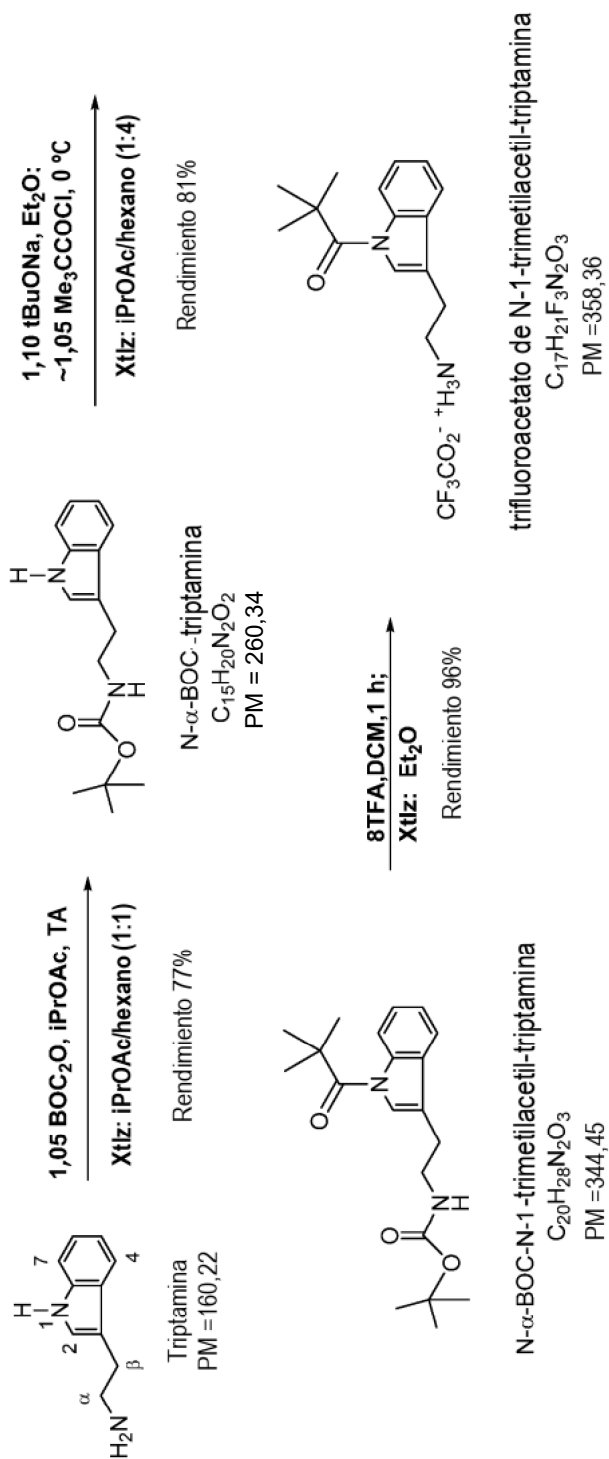


FIG. 5

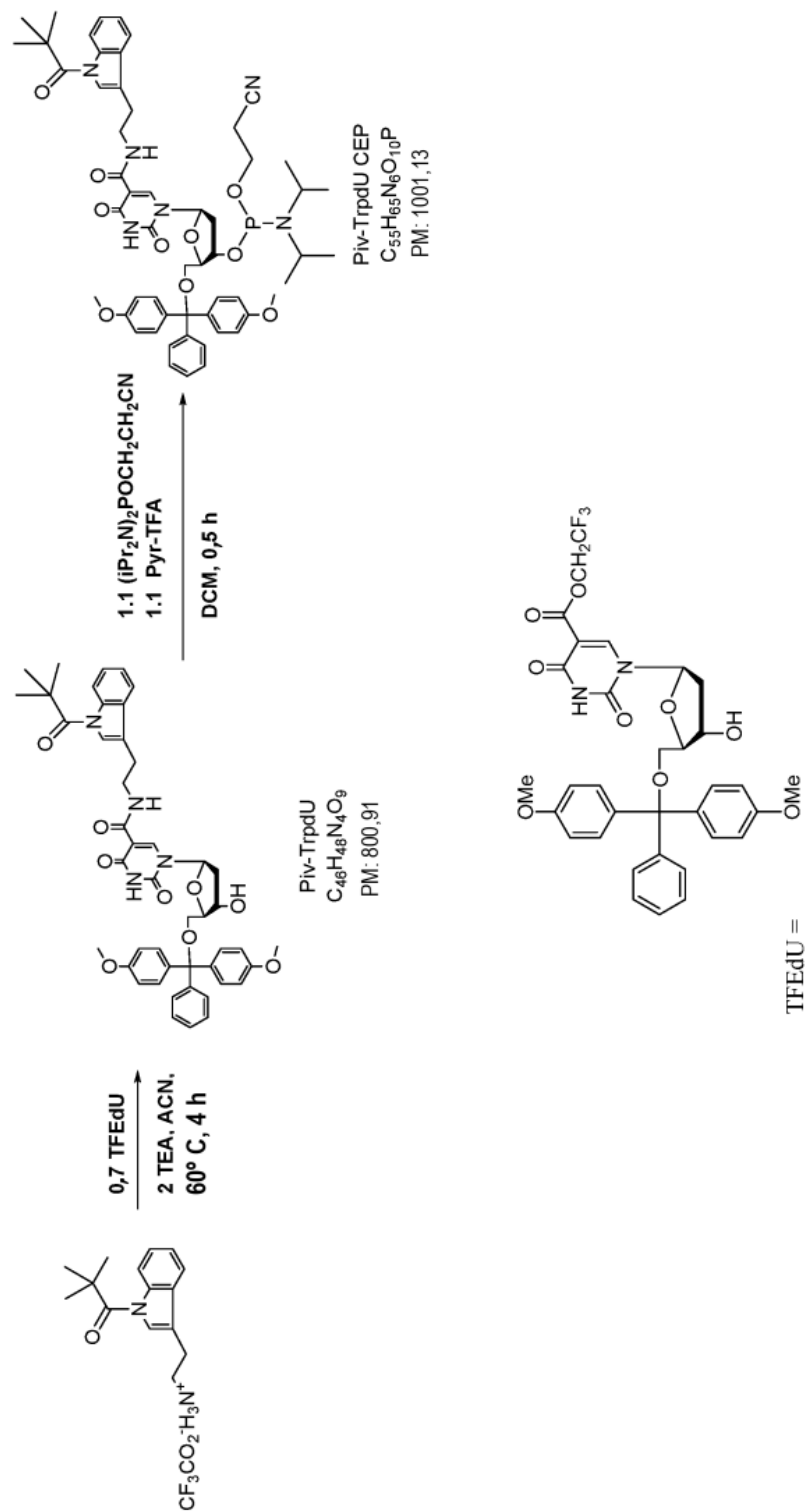


FIG. 6