

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 656**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04	(2006.01)
C07H 19/10	(2006.01)
C07H 19/06	(2006.01)
C12N 15/115	(2010.01)
A61P 43/00	(2006.01)
A61P 37/08	(2006.01)
A61P 17/00	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)
A61P 17/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2011** **E 17200661 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.11.2021** **EP 3345915**

54 Título: **Pirimidinas modificadas en posición 5 y su uso**

30 Prioridad:

12.04.2010 US 323145 P

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

11.04.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ROHLOFF, JOHN;
JANJIC, NEBOJSA;
CARTER, JEFFREY D. y
FOWLER, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 905 656 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

Pirimidinas modificadas en posición 5 y su uso

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 61/323.145, presentada el 12 de abril de 2010.

10 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere al campo de la química de ácidos nucleicos, específicamente a uridinas modificadas en posición 5 así como a derivados de trifosfatos y fosforamiditas de las mismas. La divulgación incluye el uso de los nucleósidos modificados como parte de un oligonucleótido o un aptámero.

15

Antecedentes

La siguiente descripción proporciona un resumen de información relevante para la presente divulgación y no es una admisión que cualquier información proporcionada o publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento sea técnica anterior de la presente divulgación.

20

Ha habido un interés considerable en desarrollar nucleósidos modificados como agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y para la incorporación en oligonucleótidos. Por ejemplo, se han utilizado nucleósidos modificados tales como AZT, ddI, d4T y otros para tratar el SIDA. La 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina es activa contra la queratitis herpética y la 5-yodo-1-(2-desoxi-2-fluoro-b-D-arabinofuranosil)citosina tiene actividad contra CMV, VZV, HSV-1, HSV-2 y EBV (A Textbook of Drug Design and Development, Povl Krosggaard-Larsen y Hans Bundgaard, Eds., Harwood Academic Publishers, 1991, cap. 15).

25

Los nucleósidos modificados han demostrado utilidad en aplicaciones de diagnóstico. En estas aplicaciones, los nucleósidos se incorporan en ADN en ubicaciones determinables y se utilizan diversos métodos de diagnóstico para determinar la ubicación de los nucleósidos modificados. Estos métodos incluyen: radiomarcaje, marcaje fluorescente, biotilación y escisión de cadena. Un ejemplo de escisión de cadena implica hacer reaccionar el nucleósido con hidrazina para producir nucleósidos de urea, después hacer reaccionar el nucleósido de urea con piperidina para causar la escisión de cadena (el método de Maxam-Gilbert).

30

35

También se han incorporado nucleósidos modificados en oligonucleótidos. Hay diversos modos en los que los oligonucleótidos pueden ser útiles como agentes terapéuticos. Los oligonucleótidos antisentido pueden unirse a ciertas regiones codificantes genéticas en un organismo para prevenir la expresión de proteínas o para bloquear diversas funciones celulares. Además, un proceso conocido como el proceso SELEX o evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, permite identificar y producir oligonucleótidos (denominados "aptámeros") que se unen selectivamente a moléculas diana. El proceso SELEX se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.270.163.

40

El método SELEX implica la selección de oligonucleótidos a partir de una mezcla de candidatos para lograr prácticamente cualquier criterio deseado de selectividad y afinidad de unión. Empezando a partir de una mezcla aleatoria de oligonucleótidos, el método implica poner en contacto la mezcla con una diana en condiciones favorables para la unión (o interacción), separar los oligonucleótidos no unidos de los oligonucleótidos que se han unido a (o interaccionado con) moléculas diana, disociar los pares oligonucleótido-diana, amplificar los oligonucleótidos disociados a partir de los pares oligonucleótido-diana para producir una mezcla enriquecida en ligandos de oligonucleótidos, y después repetir las fases de unión, separación, disociación y amplificación a través de tantos ciclos como se desee.

45

50

Se pueden incorporar nucleósidos modificados en oligonucleótidos antisentido, ribozimas y oligonucleótidos utilizados en o identificados mediante el proceso SELEX. Estos nucleósidos pueden impartir estabilidad *in vivo* e *in vitro* de los oligonucleótidos a endo y exonucleasas, alterar la carga, hidrofiliidad o lipofiliidad de la molécula y/o proporcionar diferencias en la estructura tridimensional.

55

Las modificaciones de nucleósidos que se han descrito anteriormente incluyen modificaciones de azúcar en posición 2', modificaciones de pirimidina en posición 5, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones en aminos exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificaciones de cadena principal y metilaciones. Las modificaciones también incluyen modificaciones en 3' y 5' tales como la protección. El documento PCT WO 91/14696 describe un método para modificar químicamente oligonucleótidos antisentido para mejorar la entrada en una célula.

60

Las patentes de Estados Unidos números 5.428.149, 5.591.843, 5.633.361, 5.719.273 y 5.945.527 describen la modificación de nucleósidos de pirimidina a través de reacciones de acoplamiento de paladio. En algunas realizaciones, un nucleófilo y monóxido de carbono se acoplan a nucleósidos de pirimidina que contienen un grupo

65

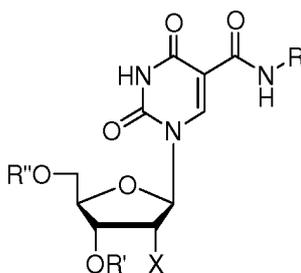
saliente en la posición 5 del anillo de pirimidina, preferentemente formando derivados de amida y éster.

Se han utilizado diversos métodos para producir oligonucleótidos resistentes a la degradación mediante exonucleasas. El documento PCT WO 90/15065 describe un método para fabricar oligonucleótidos resistentes a exonucleasas mediante la incorporación de dos o más enlaces fosforamídita, fosforomonotionato y/o fosforoditionato en los extremos 5' y/o 3' del oligonucleótido. El documento PCT WO 91/06629 desvela oligonucleótidos con uno o más enlaces fosfodiéster entre nucleósidos adyacentes sustituidos mediante la formación de un enlace tipo acetal/cetal que es capaz de unirse a ARN o ADN. El documento US 2009098549 A1 se refiere a métodos SELEX mejorados para generar ligandos de ácidos nucleicos que son capaces de unirse a moléculas diana y métodos photoSELEX mejorados para generar ligandos de ácidos nucleicos fotorreactivos que son capaces tanto de unirse como de entrecruzarse covalentemente con moléculas diana.

Sería ventajoso proporcionar nuevos nucleósidos para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas y para la inclusión en oligonucleótidos. Cuando se incorporan en oligonucleótidos, sería ventajoso proporcionar nuevos oligonucleótidos que exhiban unión de alta afinidad diferente a moléculas diana y/o que muestren resistencia aumentada a exonucleasas y endonucleasas que oligonucleótidos preparados a partir de nucleósidos de origen natural. También sería útil proporcionar nucleótidos con modificaciones que impartan una actividad biológica distinta de, o además de, la resistencia a endonucleasas y exonucleasas.

Sumario

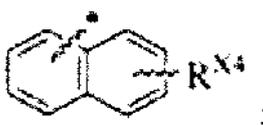
La presente divulgación proporciona uridinas modificadas en la posición 5 de la siguiente fórmula general:



en la que

R es $-(CH_2)_n-R^{X1}$;

R^{X1} es:



*Indica el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo de conexión $(CH_2)_n$

en el que

R^{X4} es un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br, I;

en el que $n = 0-10$;

en el que

X se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃ y -azido;

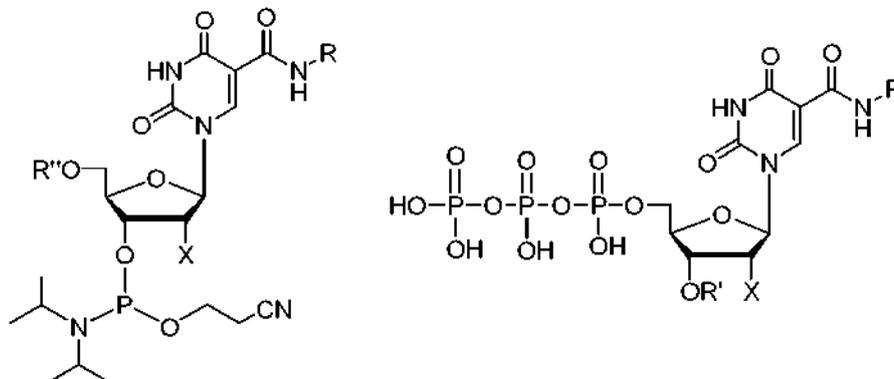
en el que

R' se selecciona entre el grupo que consiste en -Ac; -P(N(iPr)₂(O(CH₂)₂)CN); -Bz y -SiMe₂tBu; y

en el que

R'' se selecciona entre el grupo que consiste en H, DMT y trifosfato (-P(O)(OH)-OP(O)(OH)-O-P(O)(OH)₂) o una sal de los mismos.

Se incluyen derivados de 3'-fosforamidita y 5'-trifosfato de dichos compuestos que tienen las siguientes fórmulas generales, respectivamente o sales de los mismos:



5

en las que todos los restos son como se han definido anteriormente.

Los compuestos de la presente divulgación pueden incorporarse a oligonucleótidos o aptámeros usando métodos de preparación enzimáticos o sintéticos convencionales de tales compuestos.

10

Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a realizaciones representativas de la invención. Si bien la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no se pretende que la invención se limite a esas realizaciones.

15

Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían usarse en el ámbito de la práctica de la presente descripción.

20

Salvo que definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia o materias a la cual pertenece la invención. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, en la práctica o prueba de la invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

25

Todas las publicaciones, documentos de patentes publicados y solicitudes de patentes citados en esta divulgación son indicativos del nivel de habilidad en la(s) materia (s) a la(s) que pertenece la divulgación.

30

Como se usa en esta divulgación, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales, a menos que el contenido imponga claramente otra cosa, y se usan indistintamente con "al menos uno" y "uno o más". Por lo tanto, la referencia a "un aptámero" incluye mezclas de aptámeros, y similares.

35

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" representa una modificación o variación poco importante del valor numérico de modo que la función básica del elemento con el que se relaciona el valor numérico no cambia.

40

El término "cada" cuando se usa en el presente documento para referirse a una pluralidad de artículos pretende referirse a al menos dos de los artículos. No se requiere que todos los artículos que forman la pluralidad satisfagan una limitación adicional asociada.

45

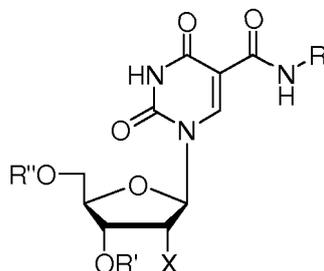
Como se usa en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "contiene", "que contiene" y cualquier variación de los mismos, están destinados a cubrir una inclusión no exclusiva, tal como un proceso, método, producto definido por su proceso o composición de la materia que comprende, incluye o contiene un elemento o lista de elementos no incluye solo esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a tal proceso, método, producto definido por su proceso o composición de la materia.

50

Como se 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).

Compuestos

En una realización, la presente divulgación proporciona compuestos de la siguiente fórmula:



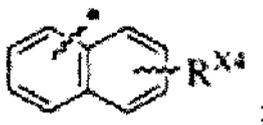
5

en la que

R es $-(CH_2)_n-R^{X1}$;

10

R^{X1} es



15

*Indica el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo de conexión $(CH_2)_n$ en el que

R^{X4} es un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br, I;

en el que $n = 0-10$;

20

en el que

X se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃ y -azido;

25

en el que

R' se selecciona entre grupo que consiste en -Ac, -P(N(iPr)₂(O(CH₂)₂)₂CN, -Bz y -SiMe₂tBu; y

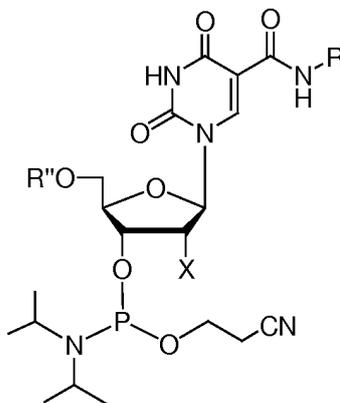
30

en el que

R'' se selecciona entre el grupo que consiste en -H, 4,4'-dimetoxitritilo (DMT) y trifosfato (-P(O)(OH)-OP(O)(OH)-OP(O)(OH)₂) o una de sal de los mismos.

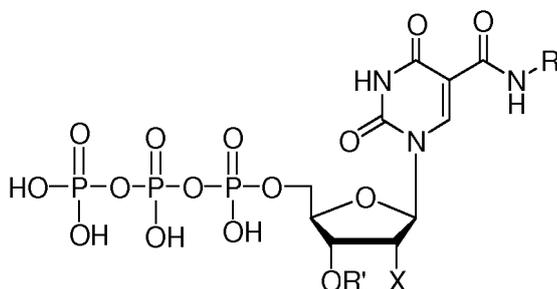
En otra realización, la presente divulgación proporciona compuestos de la siguiente fórmula o sales de los mismos:

35



en la que R, R'' y X son como se han definido anteriormente. Los compuestos de esta fórmula general son útiles para incorporar el nucleósido modificado a un oligonucleótido mediante síntesis química.

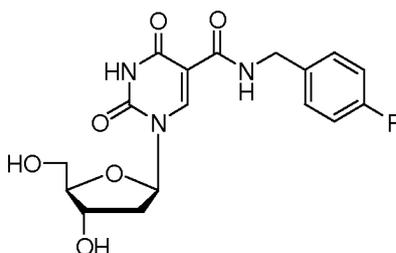
Aún en otras realizaciones, la presente divulgación proporciona compuestos de la fórmula o sales de los mismos:



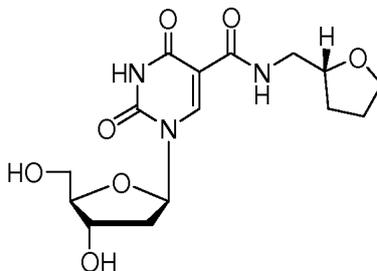
5 en la que R, R' y X son como se han definido anteriormente. Los compuestos de esta fórmula general son útiles para incorporar el nucleósido modificado a un oligonucleótido mediante síntesis enzimática.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "carboxiamidauridina modificada en el C-5" o "aminocarboniluridina modificada en el C-5" se refiere a una modificación de uridina con una carboxiamida (-C(O)NH-) en la posición del C-5 de la uridina que incluye, pero sin limitación, los restos (R) ilustrados anteriormente. Ejemplos de carboxiamidauridinas modificadas en el C-5 incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos con números 5.719.273 y 5.945.527, así como, en la solicitud provisional de Estados Unidos con n.º de serie 61/422.957 (la solicitud '957), presentada el 14 de diciembre de 2010, titulada "Nuclease Resistant Oligonucleotides". Las pirimidinas modificadas en el C-5 representativas incluyen: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina o 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina). Estos no están de acuerdo con la invención.

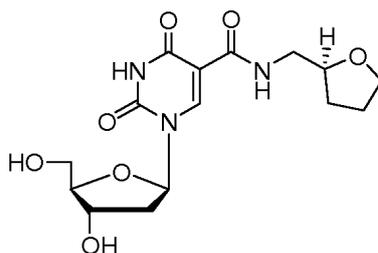
25 Ejemplos específicos de aminocarboniluridinas modificadas en el C-5, descritos en el presente documento, solo con fines ilustrativos, incluyen los siguientes compuestos así como los 5'-trifosfatos y 3'-fosforamiditas y sales de los mismos de dichos compuestos, las síntesis de los cuales se describen en los Ejemplos de referencia 1-5. Estos no están de acuerdo con la invención.



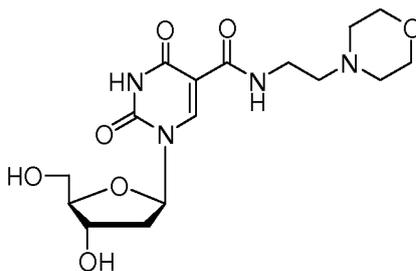
30 5-(4-Fluorobencilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina,



35 5-((R)-2-Furfurilmetilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina,

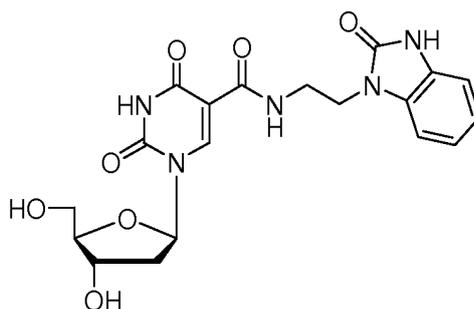


5-((S)-2-Furfurilmetilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina,



5

5-(2-(4-Morfolino)etilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina; y



10

5-(2-(1-(3-Acetil-benzoimidazoloni)etilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina.

Las modificaciones químicas de las uridinas modificadas en el C-5 descritas en el presente documento también pueden combinarse con, individualmente o en cualquier combinación, modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones en aminas exocíclicas y sustitución de 4-tiouridina y similares.

15

Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se discuten en Berge et al. "Pharmaceutically Acceptable Salts" (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19.

20

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, iones de metal alcalino, tales como Na⁺ y K⁺, cationes de metal alcalinotérreo, tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes, tales como Al³⁺. Ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, ion amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R^{X+}, NH₂R₂^{X+}, NHR₃^{X+}, NR₄^{X+}). Ejemplos de algunos iones amonio sustituido adecuados son los procedentes 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 N(CH₃)₄⁺.

25

30

Si el compuesto es catiónico o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

35

Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetioxi benzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético,

etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluqueptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico y valérico. Ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular también incluye formas salinas de los mismos.

Preparación de oligonucleótidos

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para utilizar los nucleósidos modificados descritos en el presente documento, solos o en combinación con otros nucleósidos modificados y/o nucleósidos de origen natural, para preparar oligonucleótidos modificados. 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., 103:3185-319 1). También es bien conocida la síntesis de oligorribonucleósidos (véase, por ejemplo Scaringe, S. A., et al., Nucleic Acids Res. 18:5433-5441 (1 990)). Tal como se ha señalado anteriormente, las fosforamiditas son útiles para la incorporación del nucleósido modificado en un oligonucleótido mediante síntesis química y los trifosfatos son útiles para la incorporación del nucleósido modificado en un oligonucleótido mediante síntesis enzimática. (Véase, por ejemplo, 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, UK); Herdewijn, P. "Oligonucleotide Synthesis" (2005) (Humana Press, Totowa, NJ).

Como se 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 confiere resistencia a nucleasa al oligonucleótido. Otras modificaciones adicionales pueden incluir modificaciones de 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 sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con 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 radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellas que contienen alquilantes y aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Además, 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 estándar; 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-CH₂CH₂OCH₃, 2'-fluoro- o 2'-azido, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Tal como se ha señalado anteriormente, uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en donde el fósforo se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR^x₂ ("amidato"), P(O)R^x, P(O)OR^x, CO o CH₂ ("formacetal"), en donde cada R^x o R^x son independientemente H o alquilo (C1-C20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser 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.

Si está presente, se puede realizar una modificación a la estructura nucleotídica antes o después del ensamblaje de un polímero. Se puede interrumpir una secuencia de nucleótidos mediante componentes no nucleotídicos. Además se puede modificar un polinucleótido después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje.

Como se 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 de cadena simple o doble así como moléculas de triple hélice. Ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido son términos más amplios que el término aptámero y, por 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 se 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 en el ácido nucleico, lo cual indica que se pueden modificar o no todas y cada una de las apariciones de todas y cada una de las A, C, T, G o U en un ácido nucleico.

En otros aspectos, los métodos de la presente divulgación para utilizar los nucleósidos modificados descritos en el presente documento, solos o en combinación con otros nucleósidos modificados y/o nucleósidos de origen natural, para preparar aptámeros y SOMAmers (descritos a continuación). En realizaciones específicas, los aptámeros y SOMAmers se preparan utilizando el proceso SELEX general o SELEX mejorado como se describe a continuación.

Como se usa en el presente documento, "ligando de ácido nucleico", "aptámero", "SOMAmer" y "clon" se utilizan indistintamente para referirse a un ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable sobre una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero sin limitación, unirse a la diana, cambiar catalíticamente la diana, reaccionar con la diana de una forma que modifica o altera la diana o la actividad funcional de la diana, unirse covalentemente a la diana (como en un inhibidor suicida) y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En una realización, la acción es afinidad de unión específica por una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional distinta de un polinucleótido que se une al ligando de ácido nucleico a través de un mecanismo que es independiente de la formación de triple hélice o emparejamiento de bases de Watson/Crick, en donde el aptámero no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de unirse a la molécula diana. Los aptámeros para una diana dada incluyen ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos, donde el aptámero es un ligando de la diana, mediante un método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se pueden separar del resto de la mezcla candidata; (b) separar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada de los restos de la mezcla candidata; y (c) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos, con lo que se identifican los aptámeros de la molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son una cuestión de grado; sin embargo, en este contexto, la "afinidad de unión específica" de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une a su diana normalmente con un grado mucho más alto de afinidad que si se une a otros componentes, no diana, en una mezcla o muestra. Un "aptámero", "SOMAmer" o "ligando de ácido nucleico" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. "Aptámeros" se refiere a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser de cadena simple, de cadena doble o contener regiones de cadena doble o cadena triple.

Como se usa en el presente documento, un "SOMAmer" o aptámero modificado de tasa de disociación lenta se refiere a un aptámero que tiene características de tasa de disociación mejorada. Se pueden generar SOMAmers usando los métodos SELEX mejorados descritos en la publicación de Estados Unidos n.º 20090004667, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates."

Como se usa en el presente documento, "proteína" se utiliza como sinónimo de "péptido", "polipéptido" o "fragmento peptídico". Un polipéptido, proteína, péptido o fragmento peptídico "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula, tejido o fuente libre de células de la cual se obtiene la secuencia de aminoácidos o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

El método SELEX

Los términos "SELEX" y "proceso SELEX" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse, normalmente, a una combinación de (1) la selección de ácidos nucleicos que interactúan con una molécula diana de una forma deseable, por ejemplo, unión con alta afinidad a una proteína, con (2) la amplificación de esos ácidos nucleicos seleccionados. El proceso SELEX se puede utilizar para identificar aptámeros con alta afinidad por una molécula diana específica o biomarcador.

Normalmente, SELEX incluye preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, unir la mezcla candidata a la molécula diana deseada para formar un complejo de afinidad, separar los complejos de afinidad de los ácidos nucleicos candidatos no unidos, separar y aislar el ácido nucleico del complejo de afinidad, purificar el ácido nucleico e identificar una secuencia de aptámero específica. El proceso puede incluir múltiples ciclos para perfeccionar adicionalmente la afinidad del aptámero seleccionado. El proceso puede incluir fases de amplificación en uno o más puntos en el proceso. Véase, *por ejemplo*, La patente de Estados Unidos n.º 5.475.096, titulada "Nucleic Acid Ligands." El proceso SELEX se puede utilizar para generar un aptámero que se une covalentemente a su diana así como un aptámero que

se une no covalentemente a su diana. Véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 5.705.337 titulada "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX."

5 El proceso SELEX se puede utilizar para identificar aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas en el aptámero, tal como, por ejemplo, características de administración mejoradas o estabilidad *in vivo* mejorada. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de base y/o ribosa y/o fosfato. Se describen aptámeros identificados con el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados en la patente de Estados Unidos n.º 5.660.985, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5' y 2' de pirimidinas. La patente de Estados Unidos n.º 5.580.737, véase más arriba, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). Véase también, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090098549, titulada "SELEX and PHOTOSELEX", que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades químicas y físicas expandidas y su uso en SELEX y photoSELEX.

15 También puede utilizarse SELEX para identificar aptámeros que tienen características de tasa de disociación deseables. Véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20090004667, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates", que describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que pueden unirse a moléculas diana. Se describen métodos para producir aptámeros y fotoaptámeros que tienen tasas más lentas de disociación de sus respectivas moléculas diana. Los métodos implican poner en contacto la mezcla candidata con la molécula diana, permitir que ocurra la formación de complejos ácido nucleico-diana y realizar un proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta en donde los complejos ácido nucleico-diana con tasas de disociación rápidas se disocian y no se reforman, mientras que los complejos con tasa de disociación lenta permanecen intactos. Adicionalmente, los métodos incluyen el uso de nucleótidos modificados en la producción de mezclas de ácidos nucleicos candidatos para generar aptámeros con rendimientos de tasa de disociación mejorados (véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20090098549), titulada "SELEX and PhotoSELEX"). (Véanse también la patente de Estados Unidos n.º 7.855.054 y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20070166740).

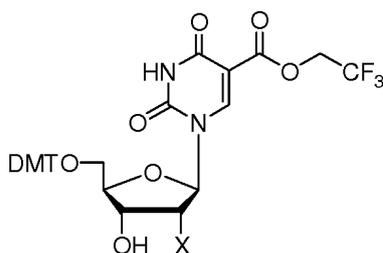
30 "Diana" o "molécula diana" u "objetivo" se refiere en el presente documento a cualquier compuesto sobre el cual un ácido nucleico puede actuar de una forma deseable. Una molécula diana puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido, polisacárido, glucoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, patógeno, sustancia tóxica, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, cualquier porción o fragmento de cualquiera de los anteriores, etc., sin limitación. Prácticamente cualquier efector químico o biológico puede ser una diana adecuada. Pueden servir como dianas moléculas de cualquier tamaño. También se puede modificar una diana de ciertas maneras para mejorar la probabilidad o resistencia de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. Una diana también puede incluir cualquier variación menor de una molécula o compuesto particular, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones menores en la secuencia de aminoácidos, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje, que no altera sustancialmente la identidad de la molécula. Una "molécula diana" o "diana" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. "Moléculas diana" o "dianas" se refiere a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Se describen realizaciones del proceso SELEX en donde la diana es un péptido en la patente de Estados Unidos n.º 6.376.190, titulada "Modified SELEX Processes Without Purified Protein."

45 **Síntesis química**

Los métodos para la síntesis química de compuestos proporcionados en la presente divulgación se describen en el presente documento. Estos y/u otros métodos bien conocidos se pueden modificar y/o adaptar de maneras conocidas para facilitar la síntesis de compuestos adicionales proporcionados en la presente divulgación.

55 Con referencia al Esquema 1, en un enfoque, las aminocarbonilpirimidinas modificadas en la posición C-5 de la presente divulgación se preparan haciendo reaccionar una pirimidina modificada en la posición 5 con un trifluoroetoxicarbonilo con una amina en presencia de una base; y aislando dicha aminocarbonilpirimidina modificada en el C-5.

En algunas realizaciones, la trifluoroetoxicarbonilpirimidina se selecciona entre el grupo de compuestos que incluye, pero sin limitación, los compuestos que tienen la siguiente estructura:

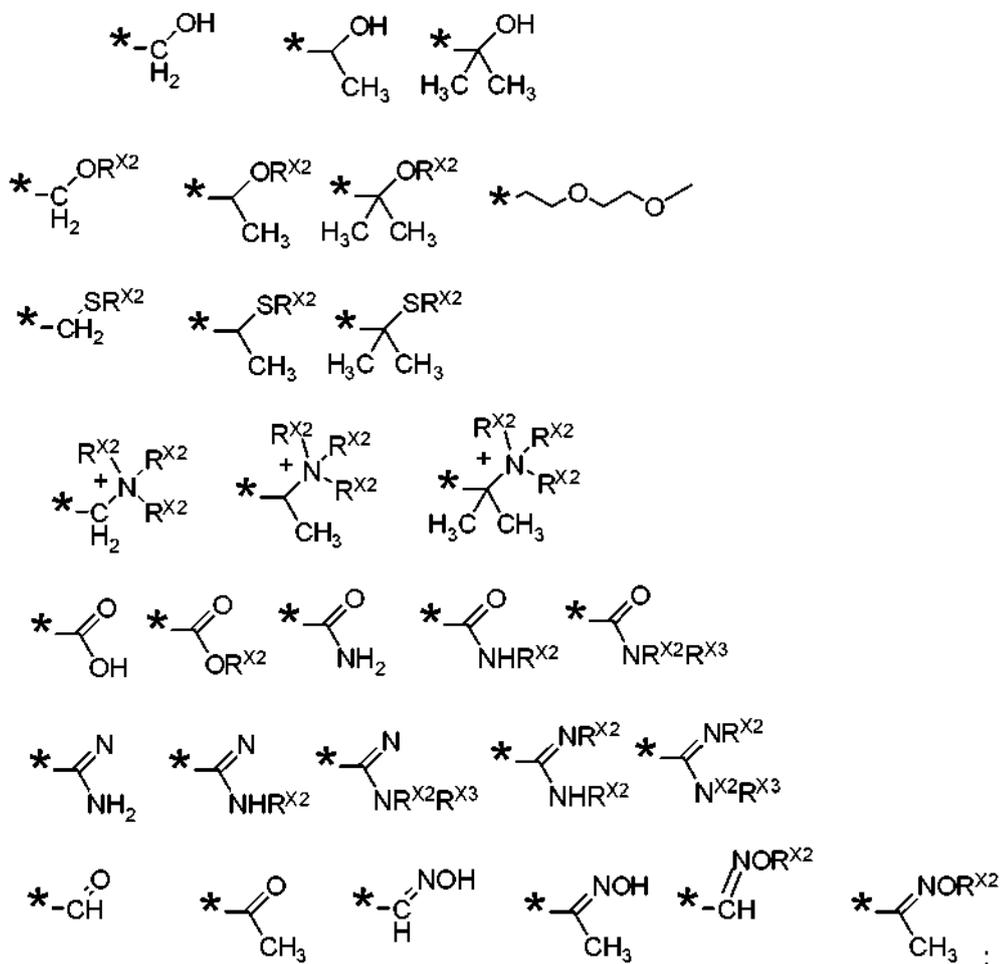


en la que

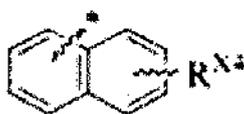
- 5 X se selecciona entre el grupo que incluye, pero sin limitación -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃ y -azido. En algunas realizaciones, la amina se selecciona entre el grupo que incluye, pero sin limitación, compuestos de la fórmula RNH₂, en la que R es -(CH₂)_n-R^{X1};

R^{X1} es:

10



*Indica el punto de union del grupo R^{X1} al grupo de conexión (CH₂)_n



15

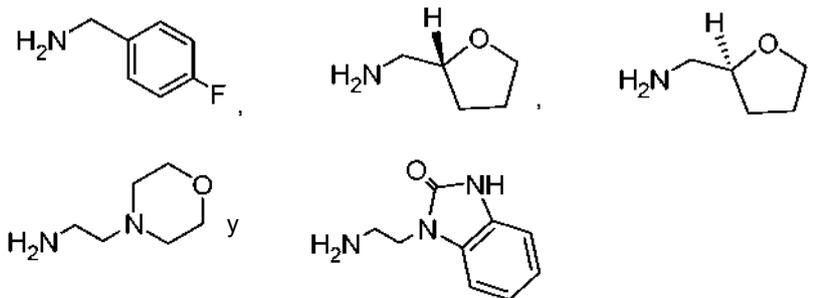
*Indica el punto de union del grupo the R^{X1} al grupo de conexión (CH₂)_n

en el que

R^{X4} es un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br, I; y

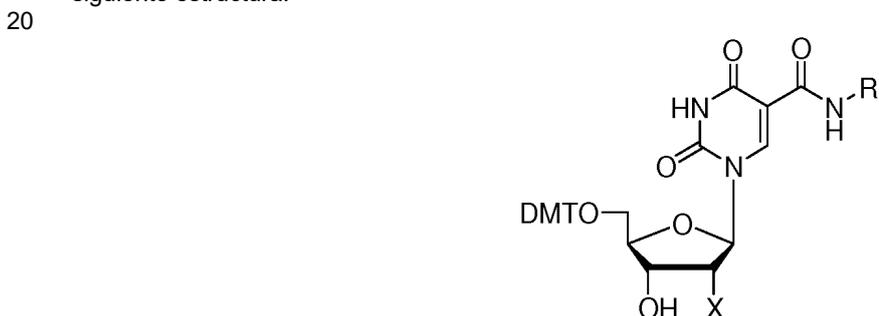
en el que n = 0-10.

5 Para los Ejemplos de referencia 1 a 5, que no están de acuerdo con la invención, la amina se selecciona entre el grupo que consiste en:



10 En algunas realizaciones, la base es una amina terciaria seleccionada entre el grupo que consiste en trietilamina, diisopropilamina y similares.

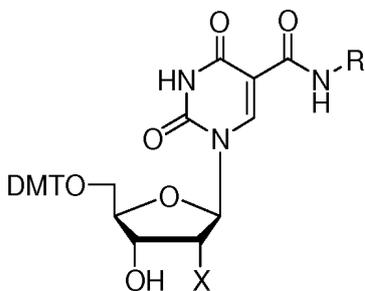
15 Con referencia al Esquema 1, la presente divulgación también proporciona un método para la síntesis de una 3'-fosforamidita de una aminocarbonilpiridina modificada en el C-5 que comprende: hacer reaccionar dicha aminocarbonilpirimidina modificada en el C-5 con cianoetildiisopropil-clorofosforamidita en presencia de una base; y aislar dicha 3'-fosforamidita. En algunas realizaciones, la aminocarbonilpirimidina modificada en el C-5 tiene la siguiente estructura:



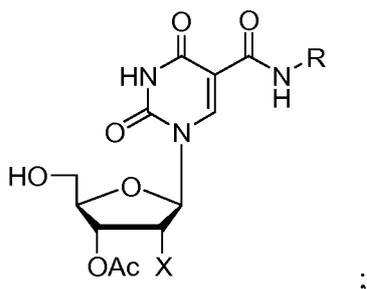
25 en la que R y X son como se han definido anteriormente. En algunas realizaciones, la base es una amina terciaria seleccionada entre el grupo que consiste en trietilamina, diisopropilamina y similares.

De nuevo, con referencia al Esquema 1, la presente divulgación también proporciona un método para la síntesis de un 5'-trifosfato de una aminocarbonilpiridina modificada en el C-5 que comprende:

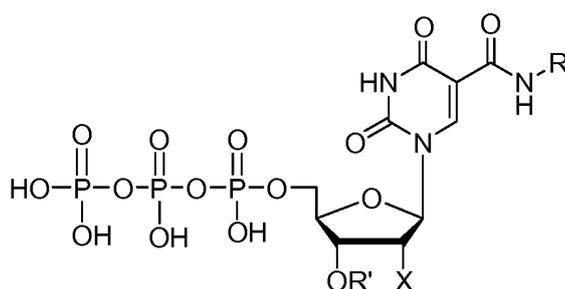
30 a) hacer reaccionar una aminocarbonilpirimidina modificada en el C-5 que tiene la fórmula:



35 en la que R y X son como se han definido anteriormente, con anhídrido acético en presencia de una base, seguido de la escisión del grupo 5'-DMT con un ácido para formar un 3'-acetato de la siguiente estructura:

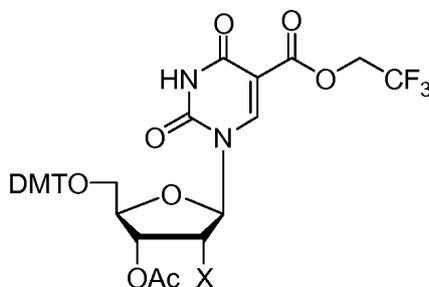


- 5 b) realizar una reacción de Ludwig-Eckstein seguida de cromatografía de intercambio aniónico en el 3'-acetato de la etapa a); y
 c) aislar un 5'-trifosfato de una aminocarbonilpirimidina modificada en el C-5 que tiene la siguiente estructura o una sal de la misma:



- 10 La base usada se selecciona entre el grupo que incluye, pero sin limitación, una amina terciaria. En algunas realizaciones, la base es piridina. El ácido usado en la etapa a se selecciona entre el grupo que incluye, pero sin limitación, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol.

- 15 En un enfoque alternativo, la trifluoroetoxicarbonilpirimidina tiene la siguiente estructura:



- 20 Con referencia al Esquema 2, este compuesto se forma mediante la reacción del compuesto (7) del Esquema 2 con monóxido de carbono y trifluoroetanol en presencia de un catalizador de paladio y una base. La base se selecciona entre el grupo que incluye, pero sin limitarse a, una amina terciaria seleccionada entre trietilamina y similares.

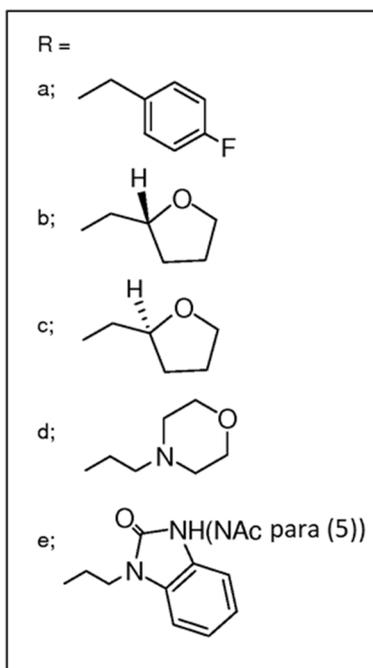
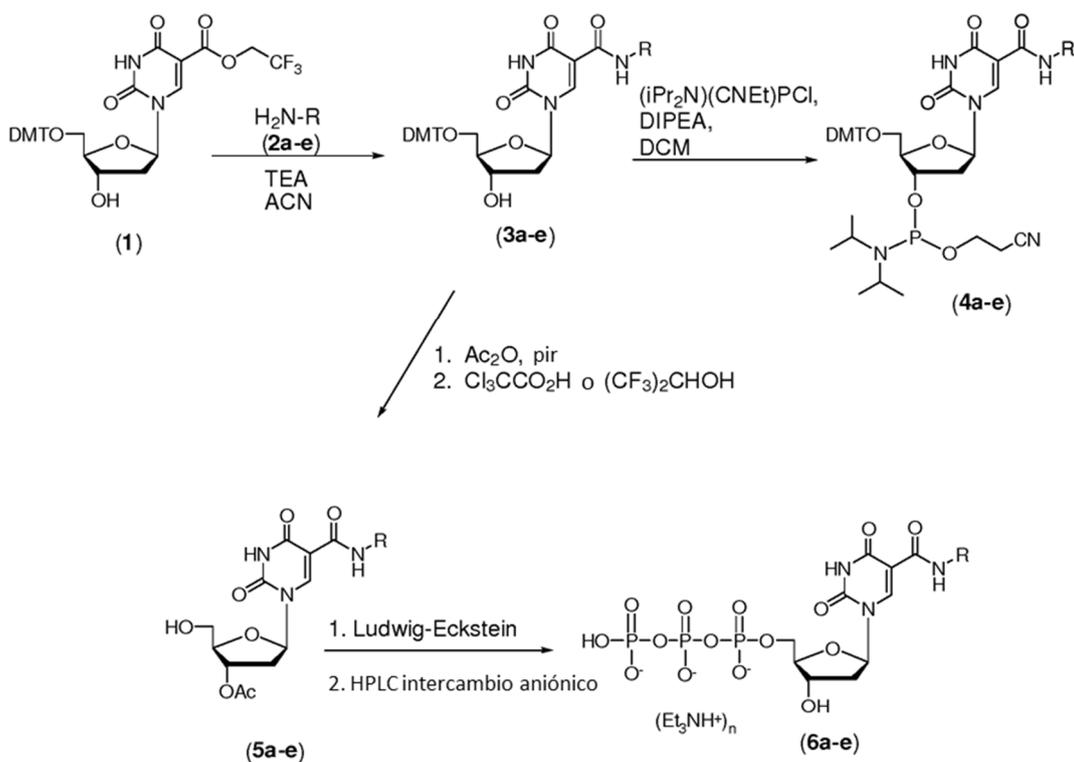
La presente divulgación incluye compuestos preparados por cada uno de los métodos descritos anteriormente.

Ejemplos

- 25 Los siguientes ejemplos de referencia se proporcionan únicamente con fines ilustrativos. Todos los ejemplos de referencia descritos en el presente documento se llevaron a cabo usando técnicas convencionales, las cuales son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia. Las técnicas de biología molecular rutinarias descritas en los siguientes ejemplos de referencia pueden llevarse a cabo tal como se describe en los manuales de laboratorio
 30 convencionales, tal como Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001).

- 35 Los siguientes procedimientos generales se emplearon para producir los nucleósidos modificados descritos en los Ejemplos 1-3 y 5. La nomenclatura utilizada en el presente documento se basa en el sistema descrito por Matsuda et al. Nucleic Acids Research 1997, 25:2784-2791.

Esquema 1



Ejemplo de referencia 1. Síntesis de 5'-O-DMT-dU-5-Carboxamidas (3a-e)

- 5 **5'-O-Dimetoxitritil-5-(4-fluorobencilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina (3a).** El material de partida, 5'-O-dimetoxitritil-5-trifluoroetoxicarbonil-2'-desoxiuridina (1) se preparó mediante el procedimiento de Matsuda *et al* (Nomura, Y.; Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Research* 1997, 25:2784-2791; Ito, T., Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Research* 2003, 31:2514-2523). Una solución de (1) (9,85 g, 15 mmol), 4-fluorobencilamina (2a) (2,25 g, 18 mmol, 1,3 equiv.), trietilamina (4,2 ml, 30 mmol) y acetonitrilo anhidro (30 ml) se calentó en una atmósfera inerte a 60-70 °C durante 2-24 horas. La conversión cuantitativa de (1) a amida (3a) se confirmó mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice
- 10

60, metanol al 5 %/diclorometano) o HPLC. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. J. Org. Chem. 1978, 43:2923) usando un eluyente de metanol al 0-3 % en trietilamina al 1 %/acetato de etilo al 99 %. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se evaporaron. Las trazas de disolventes residuales se retiraron por evaporación conjunta con acetoneitrilo anhidro, seguido de secado a alto vacío, para proporcionar (**3a**) en forma de un sólido de color blanco (6,57 g, rendimiento del 64 %). RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN) δ 2,20-2,40 (2H, m), 3,28 (2H, d, *J* = 4,3 Hz), 3,76 (6H, s), 4,01 (1 H, dd, *J* = 3,8, 4,2 Hz), 4,26-4,30 (1 H, m), 4,48 (2H, d a, *J* = 6,1 Hz), 6,11 (1H, t, *J* = 6,5 Hz), 6,85-7,46 (13H, m), 7,03-7,36 (4 H, m), 8,58 (1 H, s), 9,01 (1H, t, *J* = 6,1 Hz). EM (*m/z*) calc. para C₃₈H₃₆FN₃O₈, 681,25; encontrado 680,4 [M-H]⁻.

5'-O-Dimetoxitritil-5-((R)-2-furfurilmetilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina (3b). El compuesto (**3b**) se preparó como se describe para el (**3a**) usando (R)-2-furfurilmetilamina (**2b**) y se aisló en forma de un sólido de color blanco (9,3 g, rendimiento del 94 %). El eluyente de la cromatografía fue trietilamina al 1 %/metanol al 4 %/acetato de etilo al 95 %. RMN ¹H (CD₃CN) δ 1,51-1,57 (1H, m), 1,84-1,94 (3H, m), 2,18-2,38 (2H, m), 3,25-3,52 (4H, m solapado), 3,66-3,93 (3H, m solapado), 3,78 (6H, s), 3,97-4,02 (1H, m), 4,24-4,29 (1H, m), 6,12 (1 H, t, *J* = 6,5), 6,86-7,47 (13H, m), 8,54 (1H, s), 8,83 (1H, s a). EM (*m/z*) calc. para C₃₆H₃₉N₃O₉, 657,27; encontrado 656,5 [M-H]⁻.

5'-O-Dimetoxitritil-5-((S)-2-furfurilmetilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina (3c). El compuesto (**3c**) se preparó como se describe para el (**3b**) usando (S)-2-furfurilmetilamina (**2c**) y se aisló en forma de un sólido de color blanco (9,9 g, rendimiento del 99 %). RMN ¹H (CD₃CN) δ 1,50-1,59 (1H, m), 1,84-1,95 (3H, m), 2,18-2,40 (2H, m), 3,24-3,50 (4H, m solapado), 3,69-3,97 (3H, m solapado), 3,78 (6H, s), 3,98-4,02 (1H, m), 4,25-4,30 (1H, m), 6,14 (1 H, t, *J* = 6,5), 6,87-7,47 (13H, m), 8,54 (1H, s), 8,84 (1H, s a). EM (*m/z*) calc. para C₃₆H₃₉N₃O₉, 657,27; encontrado 656,5 [M-H]⁻.

5'-O-Dimetoxitritil-5-(2-(4-morfolino)etilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina (3d). El compuesto (**3d**) se preparó como se describe para el (**3a**), usando 2-(4-morfolino)-etilamina (**2d**) y se aisló en forma de un sólido de color blanco (8,2 g, rendimiento del 80 %). El eluyente de la cromatografía fue metanol al 5 %/trietilamina al 2 %/diclorometano al 93 %. RMN ¹H (CD₃CN) δ 2,21-2,39 (2H, m), 2,39-2,41 (4H, m), 2,48 (2H, t, *J* = 6,2 Hz), 3,27-3,29 (2H, m), 3,41 (2H, dt, *J* = 5,8, 6,2 Hz), 3,61-3,64 (4H, m), 3,78 (6H, s), 3,98-4,02 (1H, m), 4,25-4,30 (1H, m), 6,10 (1H, t, *J* = 6,4), 6,86-7,47 (13H, m), 8,55 (1H, s), 8,79 (1H, t a, *J* ~ 6 Hz). EM (*m/z*) calc. para C₃₇H₄₂N₄O₉, 686,30; encontrado 685,7 [M-H]⁻.

5'-O-Dimetoxitritil-5-(2-(N-benzoimidazoloni)etilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina (3e). El compuesto (**3e**) se preparó como se describe para el (**3a**) usando N-benzoimidazoloni-2-etilamina (**2e**) (CAS RN64928-88-7). El eluyente de la cromatografía fue metanol al 2%/trietilamina al 1%/diclorometano al 97%. El producto puro se aisló en forma de un sólido de color castaño (8,2 g, rendimiento del 74,5 %). RMN ¹H (CD₃CN) δ 2,20-2,36 (2H, m), 3,27-3,29 (2H, m), 3,60 (2H, c, *J* = 6,5 Hz), 3,758 (3H, s), 3,762 (3H, s), 3,97 (2H, t, *J* = 6,5 Hz), 3,98-4,02 (1H, m), 4,27-4,30 (1H, m), 6,09 (1H, t, *J* = 6,5 Hz), 6,86-7,48 (13H, m), 6,91-7,10 (4H, m), 8,52 (1H, s), 8,76 (1H, t, *J* = 6,1 Hz). EM (*m/z*) calc. para C₄₀H₃₉N₅O₉, 733,27; encontrado 732,0 [M-H]⁻.

Ejemplo de referencia 2. Síntesis de 5'-O-DMT-Nucleósido CE-Fosforamiditas (4a-4e)

5'-O-Dimetoxitritil-5-(4-fluorobencilaminocarbonil)-3'-O-[(2-cianoetil)(N,N-diisopropilamino)fosfinil]-2'-desoxiuridina (4a). Una solución de nucleósido protegido con DMT (**3a**) (4,00 g, 5,9 mmol) en diclorometano anhidro (40 ml) se enfrió a aproximadamente -10 °C en una atmósfera de argón seco. Se añadió diisopropiletilamina (3,1 ml, 17,6 mmol, 3 equiv.), seguido de la adición gota a gota de 2-cianoetildiisopropilclorofosforamidita (1,7 ml, 7,7 mmol, 1,3 equiv.). La solución se agitó durante una hora y se confirmó la reacción completa mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice 60, acetato de etilo/hexano). La mezcla de reacción se repartió entre una solución de bicarbonato sódico al 2 % enfriado con hielo (200 ml) y acetato de etilo (200 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando una fase móvil de trietilamina al 1 %/acetato de etilo al 99 %. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se evaporaron al vacío (<30 °C). Se retiraron las trazas del disolvente de cromatografía residual por evaporación conjunta con acetoneitrilo anhidro y se secó a alto vacío para proporcionar (**4a**) en forma de una espuma sólida de color blanco (4,10 g, rendimiento del 80 %). RMN ¹H (CD₃CN, dos isómeros) δ 1,02-1,16 (12H, m), 2,27-2,57 (2H, m), 2,51/2,62 (2H, 2t, *J* = 6,0/6,0 Hz), 3,25-3,37 (2H, m), 3,50-3,79 (4H, m solapado), 3,738 (3H, s), 3,742 (3H, s), 4,13/4,16 (1H, 2c, *J* = 3,5/3,7 Hz), 4,37-4,43 (1H, m), 4,44-4,47 (2H, m), 6,09/6,10 (1H, 2t, *J* = 6,4/7,1 Hz), 6,83-7,44 (13H, m), 7,01-7,30 (4H, m), 8,58/8,60 (1H, 2s), 8,98 (1H, a, *J* ~ 5,5 Hz), 9,24 (1H, s a). RMN ³¹P (CD₃CN) δ 148,01 (s), 148,06 (s). RMN ¹⁹F (CD₃CN) δ -117,65 (m). EM (*m/z*) calc. para C₄₇H₅₃FN₅O₉P, 881,36; encontrado 880,3 [M-H]⁻.

5'-O-Dimetoxitritil-5-((R)-2-furfurilmetilaminocarbonil)-3'-O-[(2-cianoetil)(N,N-diisopropilamino)fosfinil]-2'-desoxiuridina (4b). El compuesto (**4b**) se preparó como se describe para el (**4a**). Una mezcla 1:1 de fosforamiditas diastereoméricas se aisló en forma de una espuma sólida de color blanco (3,15 g, rendimiento del 62 %). El eluyente de la cromatografía fue trietilamina al 1 %/hexanos al 20 %/acetato de etilo al 79 %. RMN ¹H (CD₃CN, dos isómeros) δ 1,14-1,27 (12H, m), 1,51-1,59 (1H, m), 1,86-1,94 (3H, m), 2,27-2,59 (2H, m), 2,54/2,65 (2H, 2t, *J* = 6,0/5,7 Hz), 3,27-3,38 (2H, m), 3,44-3,97 (9H, m solapado), 3,782 (3H, s), 3,786 (3H, s), 4,11-4,18 (1H, m), 4,39-4,48 (1H, m), 6,11/6,13 (1H, 2t, *J* = 5,6/6,1 Hz), 6,96-7,47 (13H, m), 8,58/8,60 (1H, 2s), 8,75 (1 H, t a, *J* ~ 5,4 Hz), 9,36 (1H, s a). RMN ³¹P (CD₃CN) δ 148,09 (s), 148,13 (s). EM (*m/z*) calc. para C₄₅H₅₆N₅O₁₀P, 857,38; encontrado 856,6 [M-H]⁻.

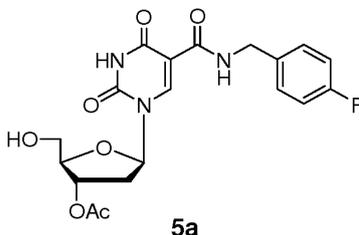
5'-O-Dimetoxitritil-5-((S)-2-furfurilmetilaminocarbonil)-3'-O-[(2-cianoetil)(N,N-diisopropilamino)fosfinil]-2'-desoxiuridina (4c). El compuesto (4c) se preparó como se describe para el (4b). Una mezcla 1:1 de fosforamiditas diastereoméricas se aisló en forma de una espuma sólida de color blanco (3,74 g, rendimiento del 74%). RMN ¹H (CD₃CN, dos isómeros) δ 1,14-1,27 (12H, m), 1,51-1,59 (1H, m), 1,86-1,94 (3H, m), 2,28-2,51 (2H, m), 2,53/2,65 (2H, 2t, *J* = 6,0/6,0 Hz), 3,25-3,41 (2H, m), 3,44-4,14 (9H, m solapado), 3,783 (3H, s), 3,786 (3H, s), 4,12-4,19 (1H, m), 4,40-4,49 (1H, m), 6,11/6,13 (1H, 2t, *J* = 6,3/6,3 Hz), 6,86-7,48 (13H, m), 8,58/8,60 (1H, 2s), 8,75 (1H, t a, *J*~5,4 Hz), 9,36 (1H, s a). RMN ³¹P (CD₃CN) δ 148,09 (s), 148,13 (s). EM (*m/z*) calc. para C₄₅H₅₆N₅O₁₀P, 857,38; encontrado 856,5 [M-H]⁻.

5'-O-Dimetoxitritil-5-(2-(4-morfolino)etilaminocarbonil)-3'-O-[(2-cianoetil)(N,N-diisopropilamino)fosfinil]-2'-desoxiuridina (4d). El compuesto (4d) se preparó como se describe para el (4a) excepto que purificación usó un eluyente de cromatografía de trietilamina al 1%/etanol anhidro al 5%/acetato de etilo al 94%. La mezcla 1:1 de fosforamiditas diastereoméricas se aisló en forma de una espuma sólida de color blanco (3,9 g, rendimiento del 75%). RMN ¹H (CD₃CN, dos isómeros) δ 1,04-1,19 (12H, m), 2,28-2,59 (2H, m), 2,43-2,47 (6H, m solapado), 2,53/2,64 (2H, 2t, *J* = 6,2/6,2 Hz), 3,27-3,76 (8H, m solapado), 3,61-3,65 (4H, m), 3,781 (3H, s), 3,789 (3H, s), 4,12-4,19 (1H, m), 4,39-4,49 (1H, m), 6,11/6,13 (1H, 2t, *J* = 5,2/5,2), 6,86-7,48 (13H, m), 8,58/8,60 (1H, 2s), 8,78 (1H, t a, *J*~5,3 Hz), 9,78 (1H, s a). RMN ³¹P (CD₃CN) δ 148,08 (s), 148,11 (s). EM (*m/z*) calc. para C₄₆H₅₉N₆O₁₀P, 886,4; encontrado 885,7 [M-H]⁻.

5'-O-Dimetoxitritil-5-(2-(N-benzoimidazoloni)etilaminocarbonil)-3'-O-[(2-cianoetil)(N,N-diisopropilamino)fosfinil]-2'-desoxiuridina (4e). El compuesto (4e) se preparó como se describe para el (4a) excepto que purificación usó un eluyente de cromatografía de trietilamina al 1%/metanol anhidro al 10%/acetato de etilo al 89%. La mezcla 1:1 de fosforamiditas diastereoméricas se aisló en forma de una espuma sólida de color blanco (1,6 g, rendimiento del 31%). RMN ¹H (CD₃CN, dos isómeros) δ 1,03-1,18 (12H, m), 2,27-2,57 (2H, m), 2,52/2,63 (2H, 2t, *J* = 6,0/6,0), 3,27-3,37 (2H, m), 3,49-3,80 (6H, m solapado), 3,732 (3H, s), 3,735/3,738 (3H, 2s), 4,00 (2H, t a, *J*~6,0 Hz), 4,12-4,18 (1H, m), 4,30-4,47 (1H, m), 6,08/6,10 (1H, 2t, *J* = 6,3/6,3 Hz), 6,85-7,48 (13H, m), 6,93-7,09 (4H, m), 8,57/8,60 (1H, 2s), 8,82/8,83 (1H, 2 t a, *J*~4,3/4,3 Hz), 9,48 (1H, s a). RMN ³¹P (CD₃CN) δ 148,07 (s), 148,10 (s).

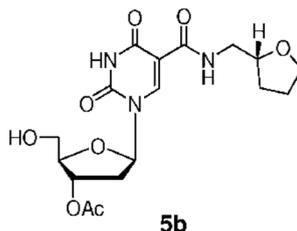
Ejemplo de referencia 3. Síntesis de 3'-O-Acetil-Nucleósidos (5a-5e)

5-(4-Fluorobencilaminocarbonil)-3'-O-acetil-2'-desoxiuridina (5a).



El nucleósido (3a) (3,00 g, 4,4 mmol) se disolvió en una solución de piridina anhidra (30 ml) y anhídrido acético (3 ml). La solución se agitó durante una noche y se concentró al vacío para producir el 3'-O-acetil-nucleósido. El disolvente residual se retiró mediante evaporación conjunta con tolueno anhidro (10 ml). El residuo se disolvió en diclorometano anhidro (10 ml) y se trató con ácido tricloroacético al 3% en diclorometano (58 ml). La solución de color rojo se agitó durante una noche, tiempo durante el cual, el producto cristalizó. La suspensión se enfrió a -20 °C, se filtró y se lavó con éter dietílico. El residuo se secó al vacío para proporcionar (5a) en forma de un sólido de color blanquecino (1,10 g, rendimiento del 59%). RMN ¹H (CD₃CN) δ 2,07 (3H, s), 2,33-2,38 (1H, m), 2,50-2,52 (1H, m), 3,63-3,64 (2H, m), 4,10 (1H, dd a, *J* = 3,1, 5,1 Hz), 4,46 (2H, d, *J* = 6,0 Hz), 5,19-5,26 (2H, m solapado), 6,15 (1H, t, *J* = 7,0 Hz), 7,15 (2H, tt, *J* = 2,2, 9,0 Hz), 7,31-7,38 (2H, m), 8,79 (1H, s), 9,14 (1H, t a, *J* = 6,1 Hz), 11,95 (1H, s a). RMN ¹⁹F (CD₃CN) δ -116,02 (tt, *J* = 5,5, 9,0 Hz). EM (*m/z*) calc. para C₁₉H₂₀FN₃O₇, 421,13; encontrado 419,8 [M-H]⁻.

5-((R)-2-Furfurilmetilaminocarbonil)-3'-O-acetil-2'-desoxiuridina (5b).

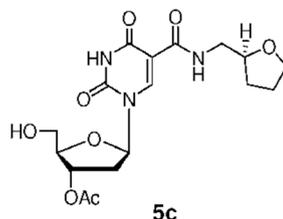


El compuesto (5b) se preparó a partir de (4b), mediante el procedimiento descrito para (5a) y se aisló por precipitación

de una mezcla de diclorometano y acetato de etilo en forma de un sólido de color blanco (1,27 g, rendimiento del 73 %). RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,57-2,02 (4H, m), 2,12 (3H, s), 2,46-2,50 (2H, m), 3,03 (1H, s a), 3,43-3,64 (2H, m), 3,75-3,97 (2H, m), 3,78-4,10 (3H, m), 4,20-4,21 (1H, m), 5,40-5,42 (1H, m), 6,35 (1H, dd, $J = 6,5, 7,7$ Hz), 8,91 (1H, t, $J = 5,5$ Hz), 9,17 (1H, s), 9,44 (1H, s a). EM (m/z) calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8$, 397,15; encontrado 396,1 [M-H].

5

5-((S)-2-Furfurilmetilaminocarbonil)-3'-O-acetil-2'-desoxiuridina (5c).

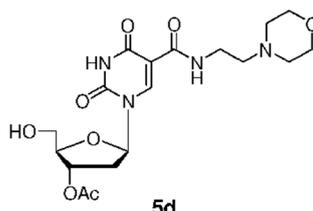


5c

10 El compuesto (5c) se preparó a partir de (4c), mediante el procedimiento descrito para (5a), y se aisló mediante precipitación de una mezcla de diclorometano y éter dietílico en forma de un sólido de color ligeramente naranja (1,35 g, rendimiento del 77 %). RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,57-2,03 (4H, m), 2,12 (3H, s), 2,47-2,51 (2H, m), 2,98 (1H, s a), 3,40-3,68 (2H, m), 3,78-3,95 (2H, m), 3,90-4,12 (3H, m), 4,20-4,21 (1H, m), 5,39-5,42 (1H, m), 6,33 (1H, dd, $J = 6,7, 7,4$ Hz), 8,90 (1H, t, $J = 5,5$ Hz), 9,15 (1H, s), 9,37 (1H, s a). EM (m/z) calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8$, 397,15; encontrado 395,9 [M-H].

15

5-(2-(4-Morfolino)etilaminocarbonil)-3'-O-acetil-2'-desoxiuridina (5d).



5d

20

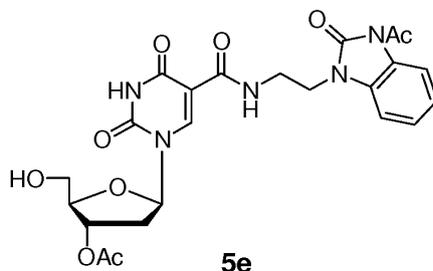
El nucleósido (3d) (1,00 g, 1,37 mmol) se disolvió en una solución de piridina anhidra (10 ml) y anhídrido acético (1 ml). La solución se agitó durante una noche y se concentró al vacío para producir el 3'-O-acetil-nucleósido. El disolvente residual se retiró mediante evaporación conjunta con tolueno anhidro (10 ml). El residuo se disolvió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (20 ml) (Leonard, N. J. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36:7833) y se calentó a aproximadamente 50 °C durante 3 horas. La escisión completa del grupo DMT se confirmó por tlc. La mezcla de solución de color rojo se inactivó vertiéndola en metanol bien agitado (200 ml). La solución de color amarillo resultante se concentró al vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo caliente (20 ml). El producto cristalizó durante el enfriamiento y la suspensión resultante se envejeció a -20 °C, seguido de filtración y lavado con acetato de etilo. El 3'-O-acetil-nucleósido (5d) se aisló en forma de un sólido de color blanco (0,46 g, rendimiento del 79 %). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 2,07 (3H, s), 2,32-2,45 (7H, m solapado), 2,49-2,52 (1H, m), 3,33-3,40 (2H, m), 3,57 (4H, t, $J = 4,5$ Hz), 3,60-3,63 (2H, m), 4,09 (1H, dd a, $J = 3,2, 5,2$ Hz), 5,17-5,25 (2H, m), 6,14 (1H, t, $J = 7,0$ Hz), 8,74 (1H, s), 8,89 (1H, t a, $J = 5,4$ Hz), 11,90 (1H, s a). EM (m/z) calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8$, 426,18; encontrado 425,0 [M-H].

25

30

35

5-(2-(1-(3-Acetil-benzoimidazoloniil)etilaminocarbonil)-3'-O-acetil-2'-desoxiuridina (5e).



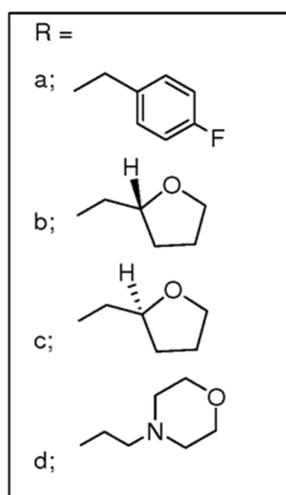
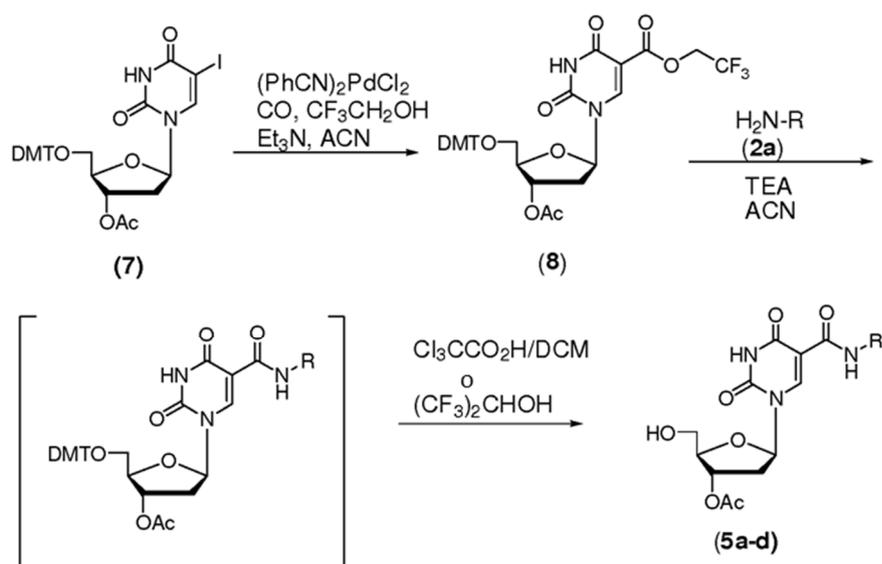
5e

40

El compuesto (5e) se preparó como se describe para el (5d) excepto que el producto cristalizó directamente cuando la reacción de escisión de DMT se vertió en metanol. El diacetil nucleósido (5e) se aisló por filtración en forma de un sólido de color blanco (0,55 g, rendimiento del 78 %). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 2,07 (3H, s), 2,30-2,37 (1H, m), 2,49-2,52 (1H, m), 2,63 (3H, s), 3,33 (1H, s a), 3,55-3,64 (4H, m solapado), 3,99 (2H, t, $J = 6,4$ Hz), 4,09 (1H, dd a, $J = 2,3, 5,2$ Hz), 5,15-5,25 (2H, m), 6,13 (1H, dd, $J = 6,3, 7,6$ Hz), 7,11 (1H, ddd, $J = 1,2, 7,6, 7,9$ Hz), 7,22 (1H, ddd, $J = 1,2, 7,6, 7,9$ Hz), 7,33 (1H, dd, $J = 0,8, 7,9$ Hz), 8,02 (1H, dd, $J = 0,8, 8,0$ Hz), 8,05 (1H, s a), 8,83 (1H, t a), 8,71 (1H, s), 11,87 (1H, s a). EM (m/z) calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_9$, 515,17; encontrado 513,9 [M-H].

Ejemplo de referencia 4. Síntesis alternativa de 3'-O-Acetil-Nucleósidos (5a-5d)

- Los 3'-O-acetil-nucleósidos (**5a-d**) también se sintetizaron mediante una ruta alternativa (Esquema 2) a partir del material de partida, 3'-O-acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-desoxiuridina (**7**) (Vaught, J. D., Bock, C., Carter, J., Fitzwater, T., Otis, M., Schneider, D., Rolando, J., Waugh, S., Wilcox, S. K., Eaton, B. E. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 4141-4151). Brevemente, con referencia al Esquema 2, la rfluoroetoxicarbonilación catalizada por paladio (II) del yoduro proporcionó el intermedio de éster activado (**8**). La condensación de (**8**) con las aminas (**2a-d**) (1,3 equiv., trietilamina (3 equiv.), acetonitrilo, 60-70 °C, 2-24 horas), seguido de la escisión del grupo protector 5'-O-DMT (ácido tricloroacético al 3 %/diclorometano o 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, temperatura ambiente), proporcionó (**5a-d**), idéntico a los productos producidos a través de los productos intermedios (3a-d) (Esquema 1).

Esquema 2

- 15 **3'-O-Acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-(2,2,2-trifluoroetoxicarbonil)-2'-desoxiuridina (8)**. Un reactor de presión de vidrio de paredes muy resistentes pesadas de 500 ml se llenó con argón y se cargó con 3'-O-acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-desoxiuridina (**7**) (15,9 g, 22,8 mmol), acetonitrilo anhidro (200 ml), trietilamina (7,6 ml, 54,7 mmol) y 2,2,2-trifluoroetanol (16,4 ml, 228 mmol). La solución resultante se agitó vigorosamente y se desgasificó mediante vacío a <100 mm Hg durante 2 minutos. El matraz se llenó con argón y se añadió bis(benzonitrilo)dicloropaladio (II) (175 mg, 0,46 mmol). La solución resultante de color amarillo se desgasificó de nuevo y después se llenó con monóxido de carbono (99,9 %) (¡precaución, gas venenoso!) de un colector de gas. Se mantuvo una presión de 6,89-68,95 kPa (1-10 psi) de CO mientras la mezcla de reacción se agitaba vigorosamente y se calentaba a 60-65 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción enfriada se filtró (precaución, gas venenoso) para retirar el precipitado de color negro y se concentró al vacío. El residuo de color naranja se repartió entre diclorometano (120 ml) y bicarbonato sódico al 10 %
- 20

(80 ml). La capa orgánica se lavó con agua (40 ml) y se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró para dejar una espuma de color naranja (17 g). Este producto en bruto podría usarse tal cual o purificarse adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con un eluyente de hexano al 30 %/trietilamina al 1 %/acetato de etilo al 69 % para proporcionar (8) en forma de una espuma sólida incolora (12,7 g, rendimiento del 80 %). RMN ¹H (CD₃CN)) δ 2,03 (3H, s), 2,37-2,56 (2H, m), 3,36-3,38 (2H, m), 3,78 (6H, s), 4,15-4,19 (1H, m), 4,37-4,55 (2H, m), 5,21-5,26 (1H, m), 6,09 (1H, t, *J* = 6,1 Hz), 6,84-7,46 (13H, m), 8,53 (1H, s). RMN ¹⁹F (CD₃CN) δ -74,07 (t, *J* = 8,8 Hz). EM (*m/z*) calc. para C₃₅H₃₃F₃N₂O₁₀, 698,21; encontrado 697,4 [M-H]⁻.

Ejemplo de referencia 5. Síntesis de 5'-O-Trifosfatos de nucleósidos

5-(4-Fluorobencilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina-5'-O-trifosfato (sal de tris-trietilamonio) (6a). El trifosfato (6a) se sintetizó a partir del 3'-O-acetil-nucleósido (5a) mediante el procedimiento de Ludwig y Eckstein (Ludwig, J. y Eckstein, F. J. Org. Chem. 1989, 54:631) a una escala de 500 μmol (5x). El producto de trifosfato en bruto, después de la amoniolisis y la evaporación, se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico, como se describe en el Procedimiento general (a continuación).

Procedimiento general para la purificación por HPLC de intercambio aniónico de trifosfatos de nucleósidos.

Los trifosfatos de nucleósidos se purificaron a través de una cromatografía de intercambio aniónico usando una columna HPLC empaquetada con resina Source Q (GE Healthcare), instalada en un sistema de HPLC preparativa, con detección a 278 nm. El gradiente de elución lineal empleó dos tampones, (tampón A: bicarbonato de trietilamonio 10 mM/acetoneitrilo al 10 %, y tampón B: bicarbonato de trietilamonio 1 M/acetoneitrilo al 10 %), con el gradiente funcionando a temperatura ambiente desde un bajo contenido de tampón B hasta alto contenido de tampón B durante la elución. El producto deseado era normalmente el material final a eluir desde la columna y se observó como un pico amplio que abarcaba aproximadamente entre diez y doce minutos de tiempo de retención (los productos de elución temprana incluían varios subproductos de reacción, siendo el más significativo el difosfato de nucleósido). Se recogieron diversas fracciones durante la elución del producto. Se analizó la fracción mediante HPLC de fase invertida en un equipo HPLC Waters 2795 con una columna Waters Symmetry (PN: WAT054215). Las fracciones que contenían el producto puro (normalmente >90 %) se evaporaron en un evaporador Genevac VC 3000D para proporcionar resinas de color castaño claro a incoloras. Las fracciones se reconstituyeron en agua desionizada y se combinaron para el análisis final. La cuantificación del producto se realizó por análisis usando un espectrofotómetro de matriz de diodos Hewlett Packard 8452A a 278 nm. Los rendimientos del producto se calcularon con la ecuación $A = \epsilon CL$, donde A es la absorbancia UV, ϵ es el coeficiente de extinción estimado y L es la longitud del camino óptico (1 cm).

El producto en bruto (6a) se disolvió en aproximadamente 5 ml de tampón A (Tabla 1: Condiciones de la HPLC prep. 1). Cada inyección de purificación consistió en una alícuota filtrada de aproximadamente 1 ml de esta solución inyectada en un equipo HPLC Waters 625 con un detector 486 equipado con una columna Resource Q de 6 ml (código del producto GE Healthcare: 17-1179-01) con un gradiente de fase móvil del 0 %-100 % de tampón B en una elución de 50 minutos a 12 ml/minuto. Para (6a) [$\epsilon_{\text{est.}} = 13.700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$] el producto purificado aislado fue de 130 μmol (rendimiento del 26 %). RMN ¹H (D₂O) δ 1,15 (27H, t, *J* = 7,3 Hz), 2,32-2,37 (2H, m), 3,07 (18H, c, *J* = 7,3 Hz), 4,06-4,17 (3H, m solapado), 4,42 (2H, d a, *J* ~ 0,7 Hz), 4,49-4,53 (1H, m), 4,70 (>7H, s a, HOD), 6,12 (1H, t, *J* = 6,8 Hz), 6,96-7,26 (4H, m), 8,45 (1H, s). RMN ¹⁹F (D₂O) δ -116,18 (m). RMN ³¹P (D₂O) δ -10,58 (d, *J* = 20 Hz), -11,45 (d, *J* = 20 Hz), -23,29 (t, *J* = 20 Hz). EM (*m/z*) calc. para C₁₇H₂₁FN₃O₁₅P₃, 619,02; encontrado 618,0 [M-H]⁻.

Tabla 1. Condiciones de la HPLC Prep. 1

Fase móvil	A: bicarbonato de trietilamonio 10 mM/acetoneitrilo al 10 % B: bicarbonato de trietilamonio 1 M/acetoneitrilo al 10 %
Columna	Resource Q 6 ml
sistema HPLC	Waters 625 HPLC/detector 486
Gradiente (% de Tampón B en la fase móvil)	0 %-100 %
Tiempo de ejecución/caudal	50 minutos a 12 ml/minuto

5-((R)-2-Furfurilmetilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina-5'-O-trifosfato (sal tris-trietilamonio) (6b) (Ejemplo de referencia). El trifosfato (6b) se sintetizó a partir del 3'-O-acetil-nucleósido (5b) como se describe para el (6a). El producto en bruto (6b) se purificó en una inyección única en un sistema preparatorio Waters 2767 con un detector Waters 2489 usando una columna Waters AP-5 (Waters PN: WAT023331, 50 mm x 100 mm) empaquetada con 196 ml de resina Source 15Q (código del producto GE Healthcare: 17-0947-05). Se usaron los mismos tampones que antes, pero el gradiente de elución se modificó del 25 % al 80 % de tampón B en una elución de 90 minutos a 50 ml/minuto (Tabla 2: Condiciones de la HPLC prep. 2). Se realizó una segunda purificación en una columna C18 HPLC para retirar las impurezas residuales (Tabla 4: Condiciones de la HPLC prep. 4). Para (6b) [$\epsilon_{\text{est.}} = 10.200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$] el producto purificado aislado fue de 325 μmol (rendimiento del 65 %). RMN ¹H (D₂O) δ 1,17 (27H, t, *J* = 7,3 Hz), 1,49-1,63 (1H, m), 1,77-2,02 (3H, m), 2,34-2,39 (2H, m), 2,85-3,83 (5H, m solapado), 3,08 (18H, c, *J* = 7,3 Hz), 4,01-4,19 (3H, m solapado), 4,52-4,56 (1H, m), 4,70 (>7H, s a, HOD), 6,15 (1H, t, *J* = 6,8 Hz), 8,48 (1H, s). RMN ³¹P (D₂O) δ -10,50 (d, *J* = 20 Hz), -11,51 (d, *J* = 20 Hz), -23,25 (t, *J* = 20 Hz). EM (*m/z*) calc. para C₁₅H₂₄FN₃O₁₆P₃, 595,04; encontrado 594,1 [M-H]⁻.

Tabla 2. Condiciones de la HPLC Prep. 2

Fase móvil	A: bicarbonato de trietilamonio 10 mM/acetronitrilo al 10 % B: bicarbonato de trietilamonio 1 M/acetronitrilo al 10 %
Columna	Resource Q 6 ml
sistema HPLC	Waters 625 HPLC/detector 486
Gradiente (% de Tampón B en la fase móvil)	15%-60%
Tiempo de ejecución/caudal	50 minutos a 12 ml/minuto

5 **5-((S)-2-Furfurilmetilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina-5'-O-trifosfato (sal tris-trietilamonio) (6c)**. El trifosfato (**6c**) se sintetizó a partir del 3'-O-acetil-nucleósido (**5c**) como se describe para el (**6a**). El producto en bruto (**6c**) se purificó en una inyección única en un sistema preparatorio Waters 2767 con un detector Waters 2489 usando una columna Waters AP-5 (Waters PN: WAT023331, 50 mm x 100 mm) empaquetada con 196 ml de resina Source 15Q (código del producto GE Healthcare: 17-0947-05). Se usaron los mismos tampones que antes, pero el gradiente de elución se modificó del 25 % al 80 % de tampón B en una elución de 90 minutos a 50 ml/minuto (Tabla 2: Condiciones de la HPLC prep. 2). Se realizó una segunda purificación en una columna C18 HPLC para retirar las impurezas residuales (Tabla 4: Condiciones de la HPLC prep. 4). Para (**6c**) [$\epsilon_{\text{est.}} 10.200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$] el producto purificado aislado fue de 255 μmol (rendimiento del 51%). RMN ^1H (D_2O) δ 1,17 (27H, t, $J = 7,3 \text{ Hz}$), 1,49-1,63 (1H, m), 1,78-2,01 (3H, m), 2,34-2,39 (2H, m), 2,85-3,82 (5H, m solapado), 3,09 (18H, c, $J = 7,3 \text{ Hz}$), 4,01-4,19 (3H, m solapado), 4,52-4,56 (1H, m), 4,70 (>7H, s a, HOD), 6,15 (1H, t, $J = 6,7 \text{ Hz}$), 8,48 (1H, s). RMN ^{31}P (D_2O) δ -10,60 (d, $J = 20 \text{ Hz}$), -11,42 (d, $J = 20 \text{ Hz}$), -23,25 (t, $J = 20 \text{ Hz}$). EM (m/z) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_{16}\text{P}_3$, 595,04; encontrado 594,1 [M-H] $^-$.

20 **5-(2-(4-Morfolino)etilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina-5'-O-trifosfato (sal bis-trietilamonio) (6d)**. El trifosfato (**6d**) se sintetizó a partir del 3'-O-acetil-nucleósido (**5d**) como se describe para el (**6a**). El producto en bruto (**6d**) se purificó con el mismo equipo y tampones que los usados para (**6a**), pero el gradiente se modificó para utilizar el tampón B del 15 % al 60 % durante la elución de 50 minutos para mejorar la resolución de los productos (Tabla 3: Condiciones de la HPLC prep. 3). Para (**6d**) [$\epsilon_{\text{est.}} 10.200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$] el producto purificado aislado fue de 54 μmol (rendimiento del 11%). RMN ^1H (D_2O) δ 1,17 (18H, t, $J = 7,3 \text{ Hz}$), 2,37-2,41 (2H, m), 2,91-2,98 (2H, m), 3,09 (12H, c, $J = 7,3 \text{ Hz}$), 3,20-3,27 (4H, m), 3,87-3,90 (4H, m), 3,63-3,68 (2H, m), 4,10-4,18 (3H, m solapado), 4,56-4,60 (1H, m), 4,70 (>7H, s a, HOD), 6,15 (1H, t a, $J = 6,3 \text{ Hz}$), 8,48 (1H, s). RMN ^{31}P (D_2O) δ -9,99 (d, $J = 21 \text{ Hz}$), -11,90 (d, $J = 20 \text{ Hz}$), -23,19 (t, $J = 20 \text{ Hz}$). EM (m/z) calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{P}_3$, 624,06; encontrado 623,1 [M-H] $^-$.

Tabla 3. Condiciones de la HPLC Prep. 3

Fase móvil	A: bicarbonato de trietilamonio 10 mM/acetronitrilo al 10 % B: bicarbonato de trietilamonio 1 M/acetronitrilo al 10 %
Columna	Waters AP-5 con Source Q 196 ml
sistema HPLC	detector Waters 22767HPLC/2489
Gradiente (% de Tampón B en la fase móvil)	25-80 %
Tiempo de ejecución/caudal	90 minutos a 50 ml/minuto

Tabla 4. Condiciones de la HPLC Prep. 4

Fase móvil	A: trietilamonio 100 mM B: acetronitrilo
Columna	Waters Novapak C18, 19 mm x 300 mm
sistema HPLC	Waters 625 HPLC/detector 486
Gradiente (% de Tampón B en la fase móvil)	10-25%
Tiempo de ejecución/caudal	30 minutos a 8,5 ml/minuto

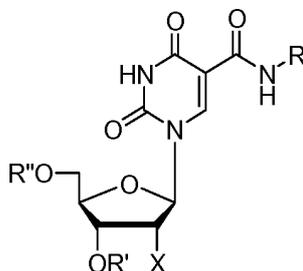
30 **5-(2-(N-Bencimidazoloni)etilaminocarbonil)-2'-desoxiuridina-5'-O-trifosfato (sal bis-trietilamonio) (6e)**. El trifosfato (**6e**) se sintetizó a partir del 3'-O-acetil-nucleósido (**5e**) como se describe para el (**6a**). El producto en bruto (**6e**) se purificó con el mismo equipo y tampones que los usados para (**6a**), pero el gradiente se modificó para utilizar el tampón B del 15 % al 60 % durante la elución de 50 minutos para mejorar la resolución de los productos (Tabla 3: Condiciones de la HPLC prep. 3). Para (**6e**) [$\epsilon_{\text{est.}} 13.700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$] el producto purificado aislado fue de 101 μmol (rendimiento del 20%). RMN ^1H (D_2O) δ 1,17 (18H, t, $J = 7,3 \text{ Hz}$), 2,17-2,36 (2H, m), 3,09 (12H, c, $J = 7,3 \text{ Hz}$), 3,60-3,73 (2H, m), 4,01 (2H, t, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 4,03-4,15 (3H, m), 4,45-4,50 (1H, m), 4,70 (>7H, s a, HOD), 6,04 (1H, t, $J = 6,6 \text{ Hz}$), 6,95-7,12 (4H, m), 8,02 (1H, s). RMN ^{31}P (D_2O) δ -10,35 (d, $J = 20 \text{ Hz}$), -11,40 (d, $J = 20 \text{ Hz}$), -23,23 (t, $J = 20 \text{ Hz}$). EM (m/z) calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_{16}\text{P}_3$, 671,04; encontrado 670,1 [M-H] $^-$.

40 Las realizaciones anteriores y los ejemplos de referencia solo pretenden ser ejemplos. Ninguna realización particular,

ejemplo de referencia o elemento de una realización o ejemplo particular debe interpretarse como un elemento o característica crítica, requerida o esencial de cualquiera de las reivindicaciones. Además, no se requiere ningún elemento descrito en este documento para la práctica de las reivindicaciones adjuntas a menos que se describa expresamente como "esencial" o "crítico". Se pueden realizar diversas alteraciones, modificaciones, sustituciones y otras variaciones en las realizaciones descritas sin apartarse del alcance de la presente invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

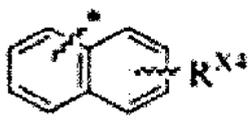
1. Un compuesto seleccionado entre los compuestos que tienen la siguiente estructura o una sal de los mismos:



5

en la que

10 R es $-(CH_2)_n-R^{X1}$;
 R^{X1} es:



15 *Indica el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo de conexión $(CH_2)_n$
 R^{X4} es un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br, I;

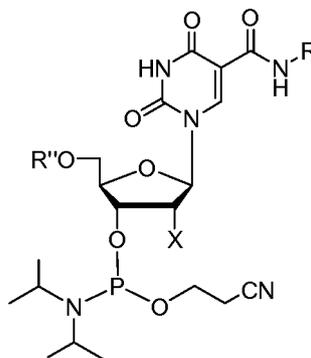
n = 0-10;

X se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃ y -azido;

R' se selecciona entre el grupo que consiste en -Ac, -P(N(iPr)₂(O(CH₂)₂)CN), -Bz y -SiMe₂tBu;

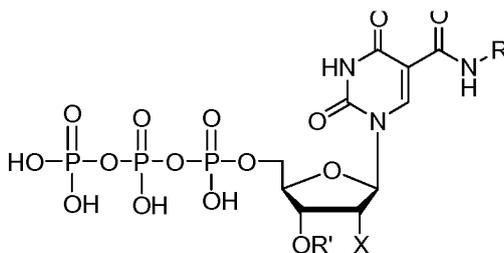
20 R'' se selecciona entre el grupo que consiste en H, DMT y trifosfato (-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)₂) o una sal de los mismos.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente estructura o una sal del mismo:



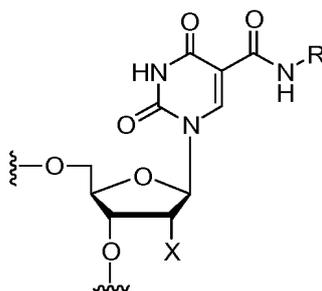
25

o



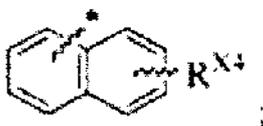
30 3. El compuesto de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que R^{X4} es Cl.

4. Un oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido modificado que tiene la siguiente estructura:



en la que

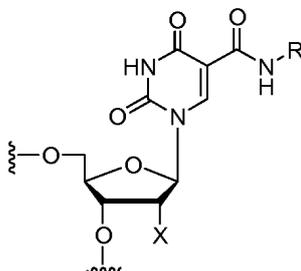
- 5 R es $-(CH_2)_n-R^{X1}$;
 R^{X1} es:



- 10 *Indica el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo de conexión $(CH_2)_n$
 R^{X4} es un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br, I; n = 0-10;
X se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃ y -azido.

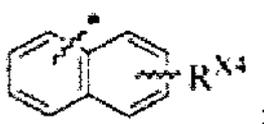
- 15 5. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que R^{X4} es Cl.
6. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde el oligonucleótido se selecciona entre un ácido ribonucleico o un ácido desoxirribonucleico.
- 20 7. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde dicho oligonucleótido comprende, además, al menos una modificación química que comprende una sustitución química en una o más posiciones independientemente seleccionadas entre una posición ribosa, una posición desoxirribosa, una posición fosfato y una posición base, opcionalmente en donde dicha modificación química se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en una modificación del azúcar en la posición 2', un 2'-amino (2'-NH₂), un 2'-fluro (2'-F), un 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-etilo (2'-OEt), 2'-O-propilo (2'-OPr), 2'-O-CH₂CH₂OCH₃, una modificación de pirimidina en la posición 5, una modificación de la estructura principal, metilación, una protección en 3' y una protección en 5'.

- 30 8. Un aptámero que comprende al menos un nucleótido modificado que tiene la siguiente estructura:



en la que

- 35 R es $-(CH_2)_n-R^{X1}$;
 R^{X1} es:



ES 2 905 656 T3

*Indica el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo de conexión $(CH_2)_n$

R^{X4} es un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br, I;

$n = 0-10$;

X se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃ y -azido.

- 5
9. Un aptámero de acuerdo con la reivindicación 8, en donde R^{X4} es Cl.
- 10
10. Un aptámero de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde el aptámero se selecciona entre un ácido ribonucleico o un ácido desoxirribonucleico.
- 10
11. Un aptámero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde dicho aptámero comprende además al menos una modificación química que comprende una sustitución química en una o más posiciones independientemente seleccionadas entre una posición ribosa, una posición desoxirribosa, una posición fosfato y una posición base, opcionalmente en donde dicha modificación química se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en una modificación del azúcar en la posición 2', un 2'-amino (2'-NH₂), un 2'-fluoro (2'-F), un 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-etilo (2'-OEt), 2'-O-propilo (2'-OPr), 2'-O-CH₂CH₂OCH₃, una modificación de pirimidina en la posición 5, una modificación de la estructura principal, metilación, una protección en 3' y una protección en 5'.
- 15