(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 993 126**

(51) Int. Cl.:

C07F 9/6558 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2016 E 21210674 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 4039690**

(54) Título: **Un fosforamidocloridato sustancialmente puro diastereoisoméricamente, un método y una composición farmacéutica**

(30) Prioridad:

05.08.2015 US 201562201510 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2024

(73) Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.00%)
6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP

(72) Inventor/es:

ENDO, ATSUSHI;
YU, ROBERT T;
FANG, FRANCIS;
CHOI, HYEONG-WOOK y
SHAN, MINGDE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Un fosforamidocloridato sustancialmente puro diastereoisoméricamente, un método y una composición farmacéutica

Antecedentes

Campo

Realizaciones pueden referirse a la preparación de monómeros activados sustancialmente puros diastereoisoméricamente que son subunidades de morfolino de fosforamidocloridato. Realizaciones también pueden referirse al uso de monómeros de morfolino fosforilados activados sustancialmente puros diastereoisoméricamente para la preparación de moléculas a través de reacciones de acoplamiento estereoespecíficas.

Antecedentes

La síntesis de oligonucleótidos de fosforodiamidato puros diastereoisoméricamente es sustancialmente complicada por la existencia de enlaces fosforosos quirales. Esto contrasta con, por ejemplo, los enlaces fosfodiéster, que no tienen un fósforo quiral. Pueden verse ejemplos en la figura 1, que compara fosfodiéster, fosforotioato (que también incluye un fósforo quiral), y fosforodiamidato

La existencia del fósforo quiral presenta problemas sustanciales para las rutas sintéticas que implican la conexión de una serie de nucleótidos de fosforodiamidato. La ausencia de reactivos puros estereoquímicamente (moldes, subunidades, componentes básicos) que posibilitan la formación estereoespecífica de enlaces fosforodiamidato da lugar a reacción en el estereocentro en que la quiralidad del fósforo del compuesto resultante no puede controlarse.

Como se muestra gráficamente en la figura 2, el uso de mezclas diastereoisoméricas de nucleótidos para acoplamiento no controlado estereoquímicamente para preparar un oligonucleótido de cualquier longitud significativa y secuencia crea una mezcla heterogénea de muchos diastereoisómeros. El número de diastereoisómeros es teóricamente $2^{(n,1)}$, donde n es el número de nucleótidos que se conectan para formar el oligonucleótido. Como se muestra en la figura 2, incluso un oligonucleótido modesto de cuatro nucleótidos (tetranucleótido) puede provocar la formación de una mezcla de ocho diastereoisómeros separados.

La formación de un número significativo de diastereoisómeros puede crear la necesidad de técnicas de separación sensibles después de la síntesis. El rendimiento de producto deseado puede verse influido adversamente por el uso de materias primas para preparar múltiples diastereoisómeros que no son deseados.

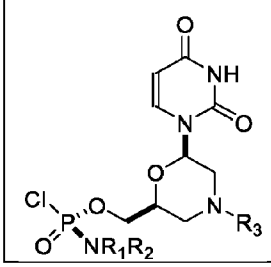
El documento US2012/289457 describe compuestos oligonucleotídicos útiles como compuestos de antisentido, que se conjugan con péptidos que penetran en las células.

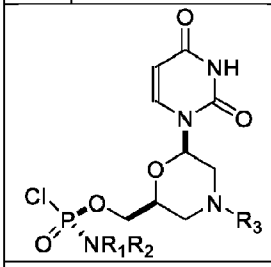
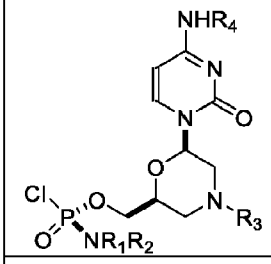
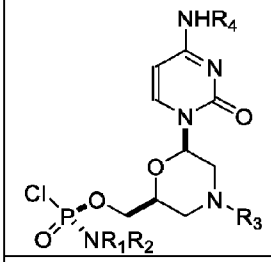
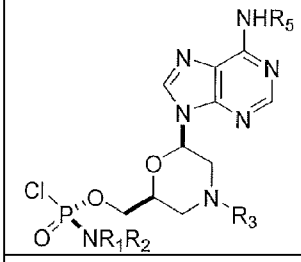
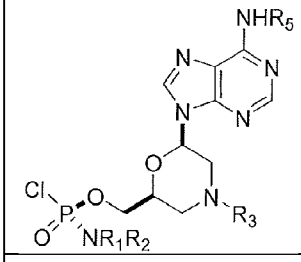
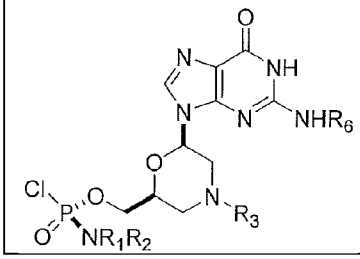
Sería útil poder seleccionar un diastereoisómero específico antes de la síntesis, entonces sintetizar el diastereoisómero seleccionado en una forma pura estereoquímicamente o sustancialmente pura.

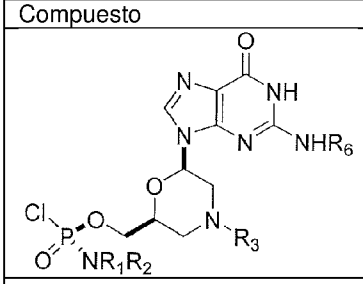
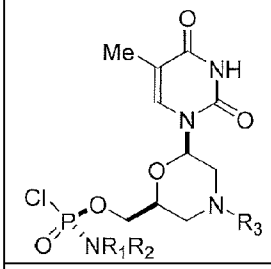
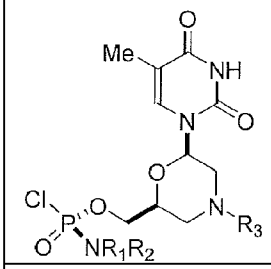
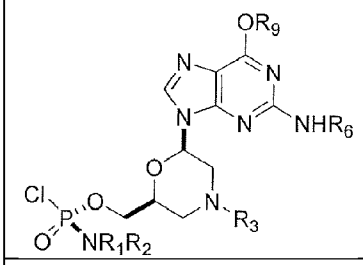
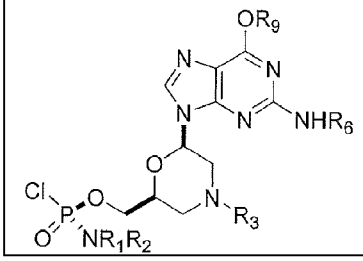
Breve sumario

La presente invención proporciona:

[1] Un compuesto sustancialmente puro diastereoisoméricamente seleccionado del grupo que consiste en el compuesto de fórmula 20, el compuesto de fórmula 21, el compuesto de fórmula 22, el compuesto de fórmula 23, el compuesto de fórmula 24, el compuesto de fórmula 25, el compuesto de fórmula 26, el compuesto de fórmula 27, el compuesto de fórmula 28, el compuesto de fórmula 29, el compuesto de fórmula 30 y el compuesto de fórmula 31,

Compuesto	Fórmula n.º
	20

Compuesto	Fórmula n.º
	21
	22
	23
	24
	25
	26

Compuesto	Fórmula n.º
	27
	28
	29
	30
	31

en las que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan del grupo que consiste en -H, alquilo C1-C3 opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido, naftilo opcionalmente sustituido o, con el nitrógeno al que están fijados, formar un heterociclo opcionalmente sustituido, que puede ser, por ejemplo, pirrolidina, piperazina y morfolina;

en las que R_3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo (Tr), que puede se tritilo sustituido incluyendo, aunque sin limitación, tal como MMTr (p-metoxifenildifenilmetilo); bencilo opcionalmente sustituido, 4-metoxibencilo (PMB, MPM), 3,4-dimetoxibencilo, difenilmetilo (Dpm), 4-metoxibencilo y sulfonilo;

R_4, R_5 y R_6 se seleccionan del grupo que consiste en -H, -C(O)R_7 y -C(O)OR_7, donde R_7 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C1-C6, bencilo, 2,2,2-tricloroetilo y un arilo seleccionado de fenilo, 4-metoxifenilo, 4-bromofenilo y 4-nitrofenilo;

R_9 se selecciona del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, cianoetilo, acilo, carbonato, carbamato, bencilo opcionalmente sustituido, 4-pivaloiloxibencilo y sililo;

y enantiómeros de los mismos, en los que sustancialmente puro diastereoisoméricamente indica diastereoisómros que están en exceso diastereoisomérico igual a o mayor de un 87%.

[2] El compuesto de [1], en el que el sulfonilo es un sulfonilo escindible seleccionado del grupo que consiste en 2-nitrobencenosulfonilo, 4-nitrobencenosulfonilo y 2,4-dinitrobencenosulfonilo.

[3] Un método para preparar un oligonucleótido estereoquímicamente puro, que comprende hacer reaccionar compuestos sustancialmente puros diastereoisoméricamente de uno cualquiera de [1]-[2].

[4] Una composición sustancialmente pura diastereoisoméricamente que comprende un compuesto sustancialmente puro diastereoisoméricamente de uno cualquiera de [1]-[2].

Aspectos de la descripción proporcionan métodos para la separación de mezclas diastereoisoméricas de los compuestos divulgados anteriormente en compuestos puros estereoquímicamente o sustancialmente puros estereoquímicamente. Aspectos adicionales pueden proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos puros estereoquímicamente o sustancialmente puros estereoquímicamente como se presenta en este documento. Aspectos adicionales pueden proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden sales farmacéuticamente aceptables de compuestos puros estereoquímicamente o sustancialmente puros estereoquímicamente como se presenta en este documento. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en cantidades eficaces a pacientes que necesitan tratamiento. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además vehículos farmacéuticamente aceptables.

Aspectos de la descripción proporcionan además la preparación de oligonucleótidos puros estereoquímicamente a través de acoplamiento estereoespecífico de monómeros activados.

Descripción de las varias vistas de los dibujos

La figura 1 muestra enlaces oligonucleotídicos fosfodiéster, fosforotioato y fosforodiamidato.

La figura 2 muestra los enlaces fosforosos R y S en un oligómero de morfolino de fosforodiamidato (PMO). La figura 2 también muestra la proliferación de diastereoisómeros que típicamente se produce cuando mezclas diastereoisoméricas de precursores de oligómeros de fosforodiamidato se usan para sintetizar dinucleótidos (2-meros), trinucleótidos (3-meros), tetranucleótidos (4-meros) y N-meros.

La figura 3 muestra la preparación de dinucleótidos puros diastereoisoméricamente tanto usando fosforamidocloridatos puros diastereoisoméricamente como usando mezcla diastereoisomérica de fosforamidocloridatos.

La figura 4A y la figura 4B muestran mezclas diastereoisoméricas generalizadas de fosforamidocloridatos que pueden ser útiles para la preparación de subunidades diastereoisoméricas puras diastereoisoméricamente o sustancialmente puras diastereoisoméricamente.

La figura 5 muestra la preparación de oligonucleótidos puros diastereoisoméricamente (homogéneos) usando fosforamidocloridatos puros diastereoisoméricamente como se presenta en este documento.

La figura 6 muestra un esquema para la síntesis estereoespecífica de PMO 16-meros y la diferenciación de estereoisómeros por ensayo biofísico.

La figura 7 muestra los puntos de fusión para los estereoisómeros 1 y 2 del ejemplo, que muestra la síntesis estereoespecífica de PMO 16-meros y la diferenciación de estereoisómeros por ensayo biofísico, como se presenta a continuación.

La figura 8 muestra un diagrama ORTEP del **compuesto 100** cristalino, como se presenta a continuación.

La figura 9A y la figura 9B muestran diagramas ORTEP de dos fragmentos del **compuesto 100**, como se presenta a continuación.

Descripción detallada

Hemos descubierto que dos diastereoisómeros de subunidades morfolino activadas pueden clasificarse por sus propiedades físicas, permitiendo la preparación de isómeros puros diastereoisoméricamente. Esto permite la preparación de PMO puros estereoquímicamente o sustancialmente puros estereoquímicamente en condiciones de reacción controladas, que entonces pueden usarse para preparar selectivamente oligonucleótidos con una estereoquímica deseada.

La presente descripción también proporciona métodos para la separación de mezclas diastereoisoméricas de los compuestos divulgados anteriormente en compuestos puros estereoquímicamente o sustancialmente puros estereoquímicamente. Una vez separados, los diastereoisómeros puros de la mezcla anteriormente diastereoisomérica pueden usarse para preparar compuestos puros diastereoisoméricamente a través de reacciones de acoplamiento estereoespecíficas.

Los compuestos puros diastereoisoméricamente y compuestos sustancialmente puros diastereoisoméricamente preparados como se expone en este documento pueden usarse para preparar oligonucleótidos de fosforodiamidato puros diastereoisoméricamente. Estos oligonucleótidos de fosforodiamidato puros diastereoisoméricamente y sustancialmente puros diastereoisoméricamente pueden tener múltiples usos. Por ejemplo, pueden ser útiles como productos farmacéuticos. Pueden seleccionarse por propiedades que son potencialmente superiores a las de mezclas heterogéneas (mezclas estereoaleatorias) de diastereoisómeros de oligonucléotidos de fosforodiamidato. Por ejemplo, pueden seleccionarse por diferencias en potencia, eficacia, estabilidad, seguridad y especificidad. Los oligómeros puros diastereoisoméricamente y sustancialmente puros diastereoisoméricamente pueden tener propiedades físicas, químicas y biológicas que difieren de las de mezclas heterogéneas estereoquímicamente de oligómeros.

"Estereoisómeros" se refiere a isómeros que difieren solamente en la disposición de los átomos en el espacio.

"Diastereoisómeros" se refiere a estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí.

"Enantiómeros" se refiere a estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Enantiómeros incluyen isómeros "puros enantioméricamente" que comprenden sustancialmente un solo enantiómero, por ejemplo, más de o igual a un 90 %, 92 %, 95 %, 98 % o 99 % o igual a un 100 % de un solo enantiómero.

"Monómero activado" se refiere a subunidades morfolino 5'-O-fosforiladas que albergan grupos salientes que tienen fósforo reactivo incluyendo, aunque sin limitación, grupos salientes de cloruro y haluro, que experimentan reacción de desplazamiento con nucleófilos incluyendo, aunque sin limitación, aminas y alcoholes.

"R" y "S" como términos que describen isómeros son descriptores de la configuración estereoquímica en átomos sustituidos asimétricamente incluyendo, aunque sin limitación: carbono, azufre, fósforo y nitrógeno de amonio. La designación de átomos sustituidos asimétricamente como "R" o "S" se hace por la aplicación de las normas de prioridad de Cahn-Ingold-Prelog, que son bien conocidas por los expertos en la materia, y se describen en las Normas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) para la Nomenclatura de Química Orgánica. Sección E, Estereoquímica.

Un enantiómero puede caracterizarse por la dirección en que hace rotar el plano de la luz polarizada en el plano, que es bien conocido por los de las materias químicas. Si hace rotar la luz en la dirección de las agujas del reloj (como observa un observado hacia el que está viajando la luz), ese enantiómero se marca (+), y se indica dextrógiro. Su imagen especular hará rotar la luz polarizada en el plano en una dirección contraria a las agujas del reloj, y se marca (-) o levógiro. La dirección de rotación de la luz polarizada en el plano por un compuesto puro enantioméricamente, denominado el signo de rotación óptica, puede medirse fácilmente en un dispositivo convencional conocido como polarímetro.

"Racémica" se refiere a una mezcla que contiene partes iguales de enantiómeros individuales.

"No racémica" se refiere a una mezcla que contiene partes desiguales de enantiómeros individuales. Una mezcla no racémica puede enriquecerse en la configuración R o S, incluyendo, sin limitación, mezclas aproximadamente 50/50, aproximadamente 60/40 y aproximadamente 70/30 de enantiómero R a S, o enantiómero S a R.

"Sustancialmente puro estereoquímicamente" y "pureza estereoquímica sustancial" se refieren a enantiómeros o diastereoisómeros que están en exceso enantiomérico o exceso diastereoisomérico, respectivamente, igual a o mayor de un 80 %. En algunas realizaciones, "sustancialmente puro estereoquímicamente" y "pureza estereoquímica sustancial" se refieren a enantiómeros o diastereoisómeros que están en exceso enantiomérico o exceso diastereoisomérico, respectivamente, igual a o mayor de un 87 %, igual a o mayor de un 90 %, igual a o mayor de un 95 %, igual a o mayor de un 96 %, igual a o mayor de un 97 %, igual a o mayor de un 98 %, o igual a o mayor de un 99 %. "Sustancialmente puro diastereoisoméricamente" se refiere a diastereoisómeros que están en exceso diastereoisomérico igual a o mayor de un 87 %, igual a o mayor de un 90 %, igual a o mayor de un 95 %, igual a o mayor de un 96 %, igual a o mayor de un 97 %, igual a o mayor de un 98 %, o igual a o mayor de un 99 %.

"Exceso enantiomérico" (ee) de un enantiómero es [(la fracción molar del enantiómero principal) menos la (fracción molar del enantiómero minoritario)] × 100. Exceso diastereoisomérico (de) de un diastereoisómero en una mezcla de dos diastereoisómeros se define de forma análoga.

"Sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a sales por adición de ácidos o sales por adición de bases de los compuestos de la presente divulgación. Una sal farmacéuticamente aceptable es cualquier sal que retiene la actividad del compuesto precursor y no imparte efecto indebidamente perjudicial o indeseable alguno en un sujeto al que se administra y en el contexto en el que se administra. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, complejos metálicos y sales de ácidos tanto inorgánicos como carboxílicos. Sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales metálicas tales como sales de aluminio, calcio, hierro, magnesio, manganeso y complejas. Además, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, sales ácidas tales como acética, aspártica, alquilsulfónica, arilsulfónica, de axetilo, bencenosulfónica, benzoica, bicarbónica, bisulfúrica, bitartárica, butírica, de edetato de calcio, camsílica, carbónica, clorobenzoica, cítrica, edética, edisílica, estólica, de esilo, esílica, fórmica, fumárica, glucéptica, glucónica, glutámica, glicólica, glicolilarsanílica, hexámica, hexilresorcinoica, hidrabámica, hidrobrómica, clorhídrica, yodhídrica, hidroxinaftoica, isetiónica, láctica, lactobiónica, maleica, málica, malónica, mandélica, metanosulfónica, metilnítrica, metilsulfúrica, múcica, mucónica, napsílica, nítrica, oxálica, p-nitrometanosulfónica, pamoica, pantoténica, fosfórica, monohidrogenofosfórica, dihidrogenofosfórica, ftálica, poligalacturónica, propiónica, salicílica, esteárica, succínica, sulfámica, sulfanílica, sulfónica, sulfúrica, tánica, tartárica, teoclica, toluenosulfónica y similares.

Una "cantidad eficaz" de una combinación de agentes terapéuticos (por ejemplo, compuesto 1 y un inhibidor de CDK 4/6) es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico observable en comparación con HCC o IHCC que se ha dejado sin tratar en un sujeto o paciente.

Pueden combinarse agentes activos como se presenta en este documento con un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar formulaciones farmacéuticas de los mismos. La elección particular del vehículo y la formulación dependerá de la vía de administración particular a la que se destina la composición.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a un vehículo, adyuvante o excipiente atóxico que no destruye la actividad farmacológica del compuesto con el que se formula. Vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones de esta invención incluyen, aunque sin limitación, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polietilenglicol y lanolina.

Las composiciones de la presente invención pueden ser adecuadas para administración por vía parenteral, oral, inhalatoria, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o de depósito implantado, etc. En algunas realizaciones, la formulación comprende ingredientes procedentes de fuentes naturales o no naturales. En algunas realizaciones, la formulación o el vehículo puede proporcionarse en una forma estéril. Ejemplos no limitantes de un vehículo estéril incluyen agua libre de endotoxinas o agua apirógena.

El término "parenteral", como se usa en este documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. En realizaciones particulares, los compuestos se administran por vía intravenosa, oral, subcutánea o por vía intramuscular. Formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico. Entre los excipientes y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentra el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión.

Aspectos de la descripción proporcionan la preparación de isómeros puros estereoquímicamente o isómeros sustancialmente puros estereoquímicamente, seguida del uso de isómeros puros para preparar estereoespecíficamente oligómeros de morfolino de fosforodiamidato (PMO) puros diastereoisoméricamente. La preparación puede ser mediante separación de la mezcla diastereoisomérica de nucleótidos de fosforamidocloridato. La separación puede hacerse, por ejemplo, por cromatografía; por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento o "HPLC." La separación también puede conseguirse a través de cristalización.

Los monómeros separados pueden denominarse monómeros "activos". Por "activo" se entiende que los monómeros incluyen resto de fosforamidocloridato que es reactivo hacia una diversidad de nucleófilos, lo que incluye, aunque sin limitación: aminas, alcoholes/alcóxidos, tiol/tiolato, alquil-litio y reactivos de Grignard.

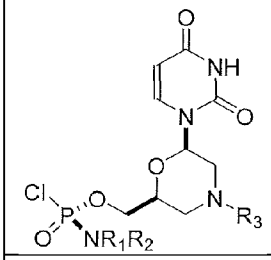
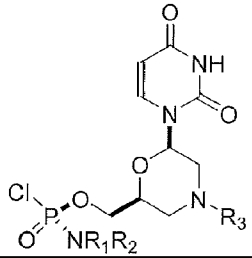
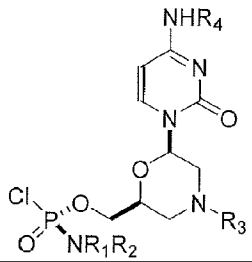
I. Preparación de isómeros diastereoisoméricos

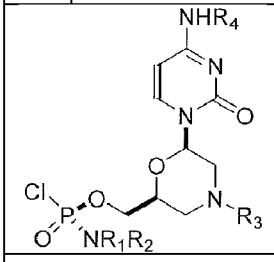
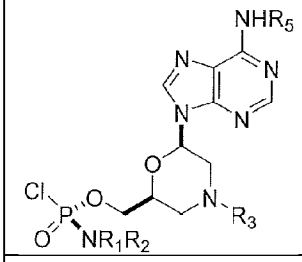
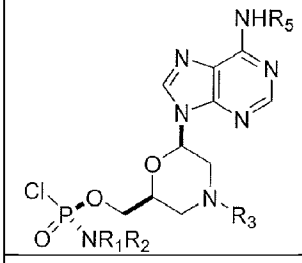
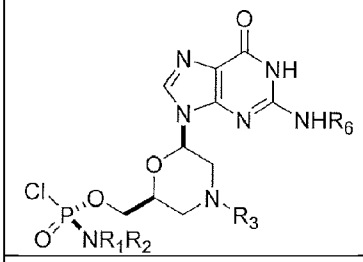
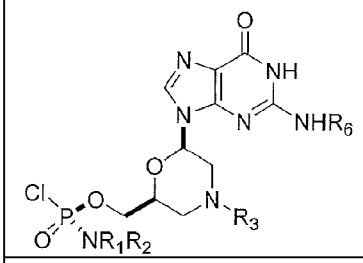
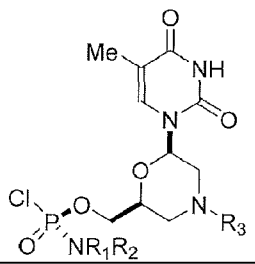
En un aspecto, los monómeros activados puros estereoquímicamente o sustancialmente puros estereoquímicamente pueden prepararse por separación de una mezcla diastereoisomérica de monómeros. La separación puede conseguirse por métodos que permite la distinción de estereoisómeros usando propiedades físicas. Por ejemplo, la separación puede conseguirse a través de cromatografía o cristalización. Los tipos adecuados de cromatografía incluyen, por ejemplo, aunque sin limitación, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de lecho móvil simulado, cromatografía a contracorriente, y otros tipos de cromatografía de separación. Por ejemplo, una mezcla diastereoisomérica puede someterse a HPLC, eluyendo una fracción de movilidad rápida y una fracción de movilidad lenta. Cada una de estas fracciones es una cantidad pura estereoquímicamente o sustancialmente pura estereoquímicamente diferente de un monómero. Como se describe a continuación, estos monómeros pueden usarse para preparar oligómeros con estereoquímica deseada a través de acoplamiento estereoespecífico usando condiciones de reacción controladas.

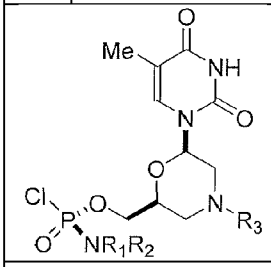
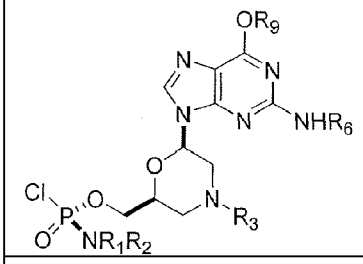
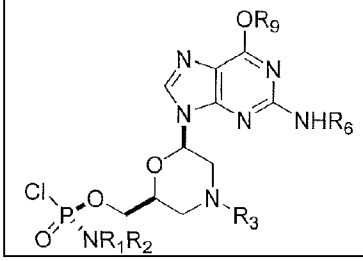
Hemos determinados además que, una vez separados, los monómeros activados puros estereoquímicamente tienen suficiente estabilidad para su uso en reacciones químicas adicionales. Además, hemos determinado que los monómeros activados puros estereoquímicamente pueden experimentar reacciones químicas estereoespecíficas. Por tanto, como se analiza en más detalle a continuación, estos monómeros activados puros estereoquímicamente pueden usarse para reacciones de acoplamiento estereoespecíficas para preparar productos puros estereoquímicamente.

Realizaciones de la invención pueden proporcionar uno o más compuestos sustancialmente puros diastereoquímicamente de la tabla 1, que pueden prepararse aprovechando las diferentes propiedades físicas en los estereoisómeros. Realizaciones adicionales también pueden proporcionar enantiómeros de los compuestos de la tabla 1. Típicamente, la estereoquímica de esos enantiómeros varía de la de los compuestos de la tabla 1 por la alteración de la estereoquímica del anillo morfolino.

Tabla 1

Compuesto	Fórmula n.º
	20
	21
	22

Compuesto	Fórmula n.º
	23
	24
	25
	26
	27
	28

Compuesto	Fórmula n.º
	29
	30
	31

en la que R3 es trifenilmetilo opcionalmente sustituido (también denominado "tritilo"), bencilo opcionalmente sustituido o sulfonilo. R4, R5 y R6 pueden ser -C(O)R7 o -C(O)OR8, donde R7 es metilo, etilo o fenilo, y R8 es bencilo o 2,2,2-tricloroetilo. R_9 puede ser alquilo opcionalmente sustituido, cianoetilo (para su uso como grupo protector véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US2013/0197220), acilo, carbonato, carbamato, bencilo opcionalmente sustituido, 4-pivaloiloxibencilo y sililo.

En algunas realizaciones, el bencilo opcionalmente sustituido es 4-metoxibencilo (PMB, MPM). En algunas realizaciones, sulfonilo es un sulfonilo escindible. En algunas realizaciones, sulfonilo es 2-nitrobencenosulfonilo, 4-nitrobencenosulfonilo o 2,4-dinitrobencenosulfonilo.

R1 y R2 pueden ser iguales o diferentes, y pueden ser -H, alquilo C1-C3 opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido, naftilo opcionalmente sustituido o, con el nitrógeno al que están fijados, formar un heterociclo opcionalmente sustituido, que puede ser, por ejemplo, pirrolidina, piperazina o morfolina.

Los restos opcionalmente sustituidos pueden estar sustituidos con uno o más de metilo, etilo, halógeno, nitro o ciano.

R3 puede ser tritilo (Tr), que puede ser tritilo sustituido incluyendo, aunque sin limitación, tal como MMTr (p-metoxifenildifenilmetilo), bencilo, 4-metoxibencilo (PMB, MPM) y 3,4-dimetoxibencilo, difenilmetilo (Dpm),

R4, R5, R6 pueden ser -H, -C(O)R7 o -C(O)OR7, donde R7 es alquilo (metilo, etilo, isopropilo u otro alquilo C1-C6) o arilo (incluyendo, aunque sin limitación, fenilo, 4-metoxifenilo, 4-bromofenilo y 4-nitrofenilo).

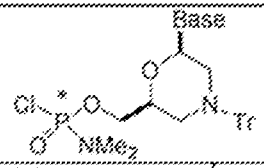
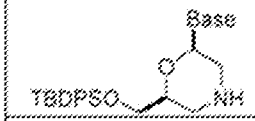
II. Acoplamiento estereoespecífico

Además de determinar que la tecnología de separación podría usarse para preparar cantidades sustancialmente puras estereoquímicamente de monómero activado, hemos determinado que estos monómeros activados pueden usarse, en algunas condiciones de reacción, para conseguir acoplamiento estereoespecífico para la preparación de dinucleótidos puros estereoquímicamente, trinucleótidos puros estereoquímicamente y oligómeros más grandes puros estereoquímicamente. A través del uso de métodos presentados en este documento, puede codificarse específicamente la quiralidad de enlace PMO recién formado por la quiralidad de los monómeros activos puros estereoquímicamente usados para formar el oligómero.

Las condiciones de reacción típicas para acoplamiento estereoespecífico incluyen reacción en disolventes apróticos. Estos disolventes pueden ser, por ejemplo, aunque sin limitación, acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF), 1,3-dimetilimidazolidinona (DMI), dimetilformamida (DMF), N-metil-2-pirrolidinona (NMP), dimetilacetamida (DMAc), diclorometano (DCM), 1,2-dicloroetano (DCE), cloroformo, 1,4-dioxano, acetato de etilo, 2-metiltetrahidrofurano y acetato de isopropilo. Las reacciones de acoplamiento pueden realizarse en presencia de bases de amina terciaria no nucleófilas y bases aromáticas. Bases adecuadas incluyen, aunque sin limitación, diisopropiletilamina, trietilamina, 2,6-lutidina, trimetilpiridinas (colidinas) y N-etilmorfolina. Las temperaturas de reacción pueden variar de temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) a 50 °C. Puede aplicarse sonicación en algunos casos para ayudar en la disolución de uno o más sustratos.

Para demostrar la viabilidad del acoplamiento estereoespecífico, se prepararon múltiples dinucleótidos PMO sustancialmente puros estereoquímicamente por acoplamiento de PMO estereoespecífico de los monómeros activos sustancialmente puros estereoquímicamente (fosforamidocloridatos) de elución rápida y lenta. La tabla 2, a continuación, resume los perfiles de retención de HPLC de estos dinucleótidos PMO sustancialmente puros estereoquímicamente. La tabla compara los tiempos de retención para los dinucleótidos que se prepararon a partir de combinaciones de los monómeros del extremo 5' enumerados en la izquierda de la tabla con isómeros de elución más rápida y elución más lenta de monómeros del extremo 3' enumerados en la parte superior. La tabla demuestra que el acoplamiento estereoespecífico de monómeros activos sustancialmente puros estereoquímicamente produce diferentes dinucleótidos puros diastereoisoméricamente que tienen diferentes propiedades físicas.

Tabla 2:

		Monómeros activos (extremo 3'; electrófilos) 										
		U		**C**[c]		**A**[d]		**G**[b]		**T**		
		rápida U_1	lenta U_2	rápida C_1	lenta C_2	rápida A_1	lenta A_2	rápida G_1	lenta G_2	rápida T_1	lenta T_2	
Monómeros del extremo 5' (nucleófilos)	**U**	UU_1	UU_2	UC_1	UC_2	UA_1	UA_2	UG_1	UG_2	UT_1	UT_2	dinucleótido
		9	< 27	9,1	> 6,5	12,6	> 10,9	12,5	< 18,8	8,4	< 27	T_R (min)
	C[c]	CU_1	CU_2	CC_1	CC_2	CA_1	CA_2	CG_1	CG_2	CT_1	CT_2	dinucleótido
		5,6	< 6,6	6,7	> 5,7	8	> 7,4	10,4	< 13,3	5,6	< 6,1	T_R (min)
	**A**[d]	AU_1	AU_2	AC_1	AC_2	AA_1	AA_2	AG_1	AG_2	AT_1	AT_2	dinucleótido
		3,5	< 3,6	3,6	≈ 3,6	4,2	> 4,1	7,6	< 8,5	3,5	< 3,6	T_R (min)
	G[b]	GU_1	GU_2	GC_1	GC_2	GA_1	GA_2	GG_1	GG_2	GT_1	GT_2	dinucleótido
		7,6	< 8,1	7,2	≈ 7,2	9,7	> 8,9	14,2	> 11,3	7,4	< 7,5	T_R (min)
	T	TU_1	TU_2	TC_1	TC_2	TA_1	TA_2	TG_1	TG_2	TT_1	TT_2	dinucleótido
		9,7	< 23,9	8,9	> 5,6	13,2	> 11,4	13,2	< 20,0	9	< 24	T_R (min)

[a] nucleobases no protegidas

[b] grupo amino de guanina protegido con grupo isobutirilo

[c] grupo amino de citosina protegido con: (1) grupo acetilo para acoplamiento con U, C, A y G. (2) grupo benzoilo para acoplamiento con T

[d] grupo amino de adenina protegido con grupo benzoilo

ES 2 993 126 T3

Las condiciones de HPLC analítica para realizar el perfil de los dinucleótidos PMO sustancialmente puros estereoquímicamente de la tabla 2 se presentan a continuación:

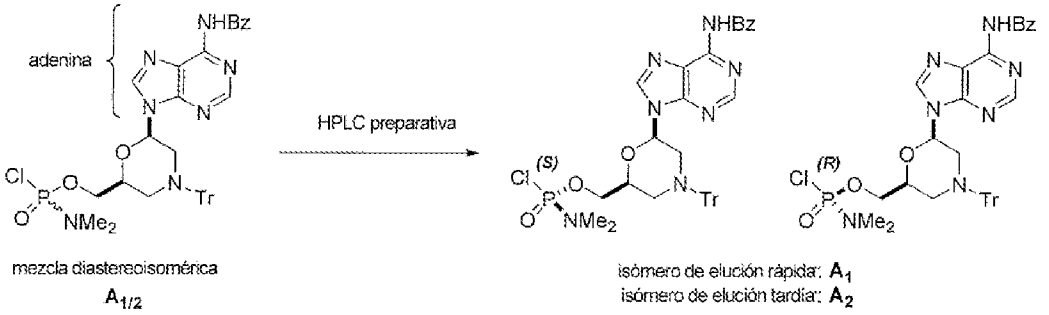
Columna de HPLC	Chiralpak IC 4,6 × 250 mm 5 µm
Temperatura	30 °C
Caudal:	1,0 ml/min
Fase móvil	10 % de n-heptano, 80 % de EtOAc y 10 % de MeOH-EtOH 1:1 con dietilamina al 0,1 %
Gradiente	Isocrático
Tiempo de desarrollo	30 min
Volumen de inyección	1-2 µl (0,2 mg/ml, diclorometano)
Detección	UV 260 nm

Ejemplos

III. Ejemplos de separación diastereoisomérica de monómeros activados

Los siguientes ejemplos muestran la separación diastereoisomérica de monómeros activados de acuerdo con determinadas realizaciones como se presenta en este documento.

A. Monómeros de U



Condiciones de HPLC analítica para monómeros de U activados:

Columna de HPLC	Chiralpak IC, 4,6 × 250 mm, 5 u	
Temperatura	35 °C	
Caudal:	1 ml/min	
Fase móvil	Acetato de etilo	
Gradiente	Isocrático	
Tiempo de desarrollo	15 min	
Volumen de inyección	10 µl (5 mg/ml, acetato de etilo)	
Detección	260 nm	
Tiempo de retención	**U_1**	5 min
	U_2	7,5 min

Condiciones de HPLC preparativa para monómeros de U activados:

Chiralpak IC, 21 × 250 mm, 5µ; la columna se eluye a 11 ml/minuto con acetato de etilo, temperatura ambiente, detección a 260 nm.

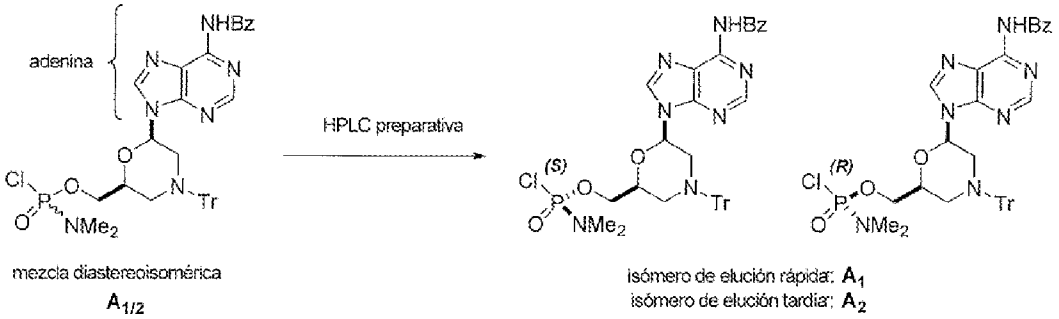
[Datos de RMN de ^{1}H para U_1]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,18 (a, 1H), 7,45 (m, 6H), 7,15-7,32 (m, 10H), 6,12 (dd, 1H, J= 2,0 & 9,6 Hz), 5,62 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 4,39 (m, 1H), 4,11 (m, 2H), 3,39 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 11 Hz), 2,65 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,49 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,39 (t, 1H, J= 11 Hz)

[Datos de RMN de ^{1}H para U_2]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,07 (a, 1H), 7,44 (m, 6H), 7,14-7,34 (m, 10 H), 6,12 (dd, 1H, J= 2 & 9 Hz), 5,61 (d, 1H, 8,0 Hz), 4,39 (m, 1H), 4,08 (m, 2H), 3,39 (d, 1H, J= 12 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,66 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,46 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,38 (t, 1H, J= 11 Hz),

B. Monómeros de A



Condiciones de HPLC analítica para monómeros de A activados:

Columna de HPLC	Chiralpak IC, 4,6 × 250 mm, 5 u	
Temperatura	35 °C	
Caudal:	1 ml/min	
Fase móvil	Acetato de etilo	
Gradiente	Isocrático	
Tiempo de desarrollo	15 min	
Volumen de inyección	10 µl (5 mg/ml, acetato de etilo)	
Detección	260 nm	
Tiempo de retención	**A_1**	8,1 min
	A_2	11,7 min

Condiciones de HPLC preparativa para monómeros de A activados:

Chiralpak IC, 21 × 250 mm, 5 u; se eluye con 100 % de acetato de etilo a 15 ml/minuto, temperatura ambiente, detección de uv 260 nm.

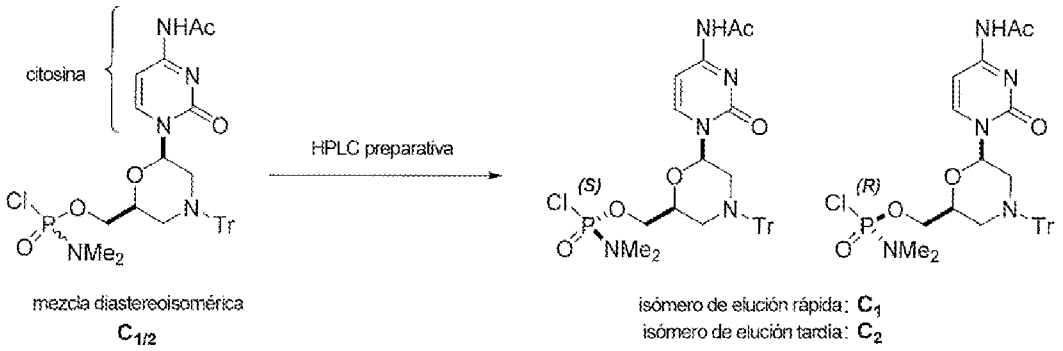
[Datos de RMN de ^{1}H para A_1]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,01 (a, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,00 (m, 3H), 7,58 (m, 1H), 7,4-7,6 (m, 8 H), 7,2-7,4 (m, 10H), 6,42 (d, 1H, J= 8,4 Hz), 4,51 (m, 1H), 4,12 (m, 3H), 3,54 (d, 1H, J= 12 Hz), 3,25 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,62 (s, 3H), 2,59 (s, 3H), 1,81 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,62 (t, 1H, J= 11 Hz)

[Datos de RMN de ^{1}H para A_2]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,04 (a, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,00 (m, 3H), 7,56 (m, 1H), 7,4-7,6 (m, 8H), 7,2-7,4 (m, 10H), 6,41 (d, 1H, J= 8,4 Hz), 4,51 (m, 1H), 4,12 (m, 3H), 3,54 (d, 1H, J= 12 Hz), 3,25 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,64 (s, 3H), 2,61 (s, 3H), 1,82 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,63 (t, 1H, J= 11 Hz)

C. Monómeros de C



Condiciones de HPLC analítica para monómeros de C activados:

Columna de HPLC	Chiralpak IC, 4,6 × 250 mm, 5 u	
Temperatura	35 °C	
Caudal:	1,0 ml/min	
Fase móvil	90 % de acetato de etilo 10 % de n-heptano	
Gradiente	Isocrático	
Tiempo de desarrollo	12 min	
Volumen de inyección	10 µl (5 mg/ml, diclorometano)	
Detección	260 nm	
Tiempo de retención	C_1	6,0 min
	C_2	6,2 min

Condiciones de HPLC preparativa para monómeros de C activados:

Chiralpak IC eluida a 15 ml/minuto con 75 % de acetato de etilo y 25 % de n-heptano. Temperatura ambiente y detección de uv 260 nm.

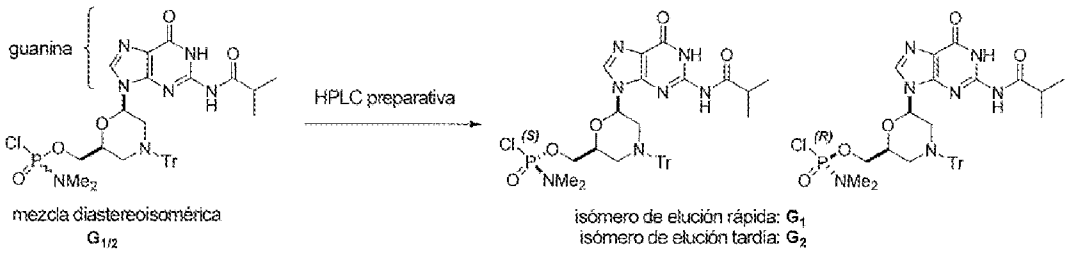
[Datos de RMN de ^{1}H para C_1]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,66 (d, 1H, J= 7,8 Hz), 7,43 (m, 6H), 7,33 (d, 1H, J= 7,4 Hz), 7,15-7,32 (m, 9H), 6,18 (dd, 1H, J= 2,2 & 9,2 Hz), 4,42 (m, 1H), 4,08-4,16 (m, 2H), 3,54 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,14 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,64 (s, 3H), 2,60 (s, 3H), 2,23 (s, 3H), 1,51 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,25 (m, 1H).

[Datos de RMN de ^{1}H para C_2]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,64 (d, 1H, J= 7,8 Hz), 7,43 (m, 6H), 7,32 (d, 1H, J= 7,4 Hz), 7,15-7,32 (m, 9H), 6,19 (dd, 1H, J= 2,1 & 9,2 Hz), 4,41 (m, 1H), 4,06-4,15 (m, 2H), 3,54 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,64 (s, 3H), 2,61 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 1,49 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,25 (m, 1H)

D. Monómeros de G (guanina monoprotegida)



Condiciones de HPLC analítica para monómeros de G activados:

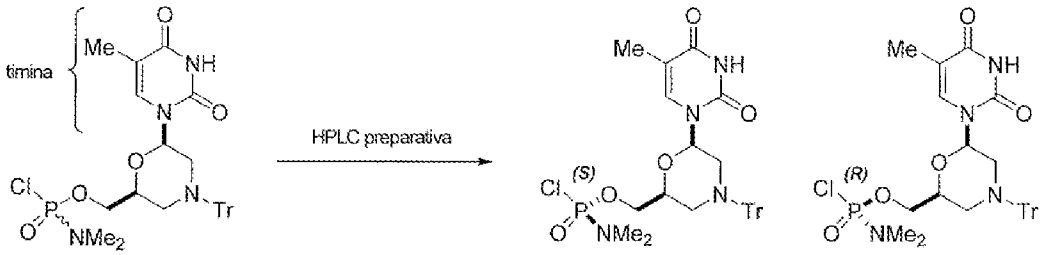
Columna de HPLC	Chiralpak IC, 4,6 × 250 mm, 5 u
Temperatura	35 °C
Caudal:	1,0 ml/min
Fase móvil	acetato de etilo
Gradiente	Isocrático

Tiempo de desarrollo	30 min	
Volumen de inyección	10 µl (5 mg/ml, acetato de etilo)	
Detección	260 nm	
Tiempo de retención	**G_1**	17,8 min
	G_2	22,3 min

Condiciones de HPLC preparativa para monómeros de G activados:

Chiralpak IC eluida a 15 ml/minuto con 100 % de acetato de etilo. Temperatura ambiente y detección de uv 260 nm.

E. Monómeros de T



Condiciones de HPLC analítica para monómeros de T activados:

Columna de HPLC	Chiralpak IC, 4,6 × 250 mm, 5 u	
Temperatura	35 °C	
Caudal:	1 ml/min	
Fase móvil	Acetato de etilo	
Gradiente	Isocrático	
Tiempo de desarrollo	10 min	
Volumen de inyección	10 µl (5 mg/ml, cloruro de metileno)	
Detección	260 nm	
Tiempo de retención	**T_1**	4,5 min
	T_2	7,0 min

Condiciones de HPLC preparativa para monómeros de T activados:

Chiralpak IC, 50 × 500 mm, 20 u. La columna se eluye a 60 ml/minuto con acetato de etilo, temperatura ambiente, detección a 260 nm. Los tiempos de retención son 25 y 40 minutos.

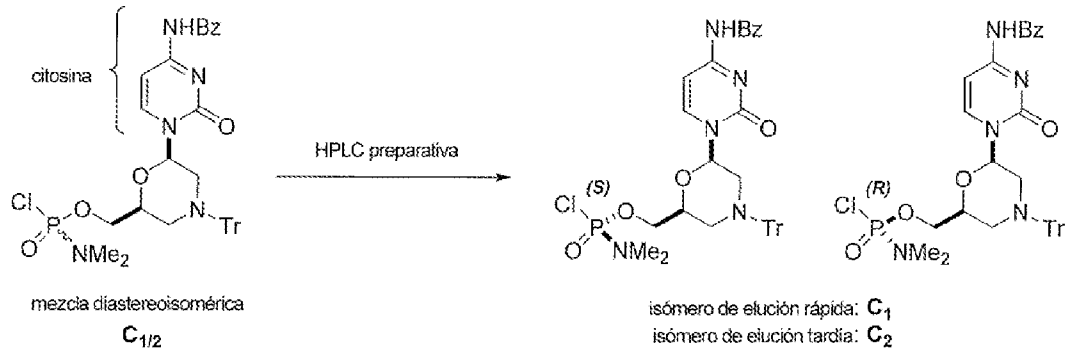
[Datos de RMN de ^{1}H para T1]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,4-7,5 (m, 5H), 7,26-7,33 (m, 6H), 7,16-7,22 (m, 3H), 7,04 (d, 1H, J= 1 Hz), 6,12 (dd, 1H, J= 2 & 10 Hz), 4,39 (m, 1H), 4,12 (m, 2H), 3,37 (d, 1H, J= 12 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,66 (s, 3H), 2,63 (s, 3H), 1,83 (d, 1H, J= 1 Hz), 1,49 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,41 (t, 1H, J= 11 Hz))

[Datos de RMN de ^{1}H para T2]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,4-7,5 (m, 6H), 7,24-7,35 (m, 6H), 7,14-7,22 (m, 3H), 7,03 (s, 1H), 6,12 (dd, 1H, J= 2 & 10 Hz), 4,39 (m, 1H), 4,09 (m, 2H), 3,37 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 11 Hz), 2,66 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,82 (s, 3H), 1,48 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,40 (t, 1H, J= 11 Hz)

F. Monómeros de C (NBz)



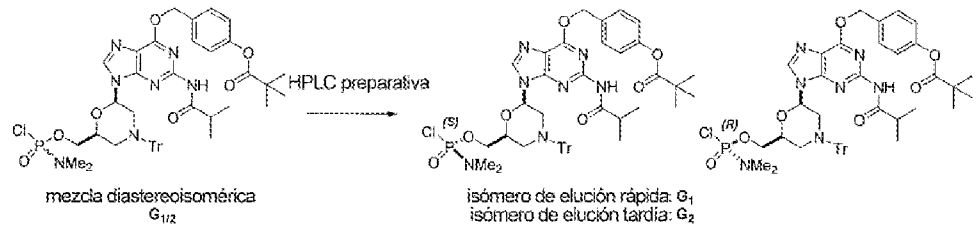
Condiciones de HPLC analítica para monómeros de C activados (NBz):

Columna de HPLC	Chiralpak IB, 4,6 × 150 mm, 5 u	
Temperatura	35 °C	
Caudal:	1,0 ml/min	
Fase móvil	100 % de acetonitrilo	
Gradiente	Isocrático	
Tiempo de desarrollo	5 min	
Volumen de inyección	10 µl (5 mg/ml, acetonitrilo)	
Detección	260 nm	
Tiempo de retención	**C_1**	3,4 min
	C_2	4,5 min

Condiciones de HPLC preparativa para monómeros de C activados (NBz):

Chiralpak IB, 20 × 250 mm 5 u, eluida a 9 ml/minuto con 100 % de acetonitrilo. Temperatura ambiente y detección de uv 260 nm. Los tiempos de retención son 13 y 16 minutos.

G. Monómeros de G (guanina biprotegida)



Condiciones de HPLC analítica para monómeros de G activados (guanina biprotegida):

Columna de HPLC	Chiralpak IA, 4,6 × 250 mm, 5 u	
Temperatura	35 °C	
Caudal:	1,0 ml/min	
Fase móvil	70 % de acetato de etilo/30 % de cloruro de metileno	
Gradiente	Isocrático	
Tiempo de desarrollo	8 min	
Volumen de inyección	10 µl (5 mg/ml, acetato de etilo)	
Detección	260 nm	
Tiempo de retención	**G_1**	3,9 min
	G_2	4,3 min

Condiciones de HPLC preparativa para monómeros de G activados (guanina biprotegida):

Chiralpak IA 50 × 500 mm, eluida a 60 ml/minuto con 100 % de acetato de etilo. Temperatura ambiente y detección de uv 260 nm. Los tiempos de retención son 20 y 24 minutos.

[Datos de RMN de ^1H para G_1 (guanina biprotegida)]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,76 (s, 2H), 7,50 (d, 2H, J= 9 Hz), 7,4-7,5 (m, 6 H), 7,26-7,32 (m, 6H), 7,16-7,22 (m, 3H), 7,02 (d, 2H, J= 9 Hz), 6,24 (dd, 1H, J= 2 & 10 Hz), 5,61 (d, 1H, J= 12 Hz), 5,56 (d, 1H, J= 12 Hz), 4,48 (m, 1H), 4,1 (m, 2H), 3,47 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,23 (d, 1H, J=12 Hz), 3,2 (m, 1H), 2,62 (s, 3H), 2,59 (s, 3H), 1,75 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,57 (t, 1H, J= 12 Hz), 1,33 (s, 9H), 1,33 (t, 6H, J= 7 Hz)

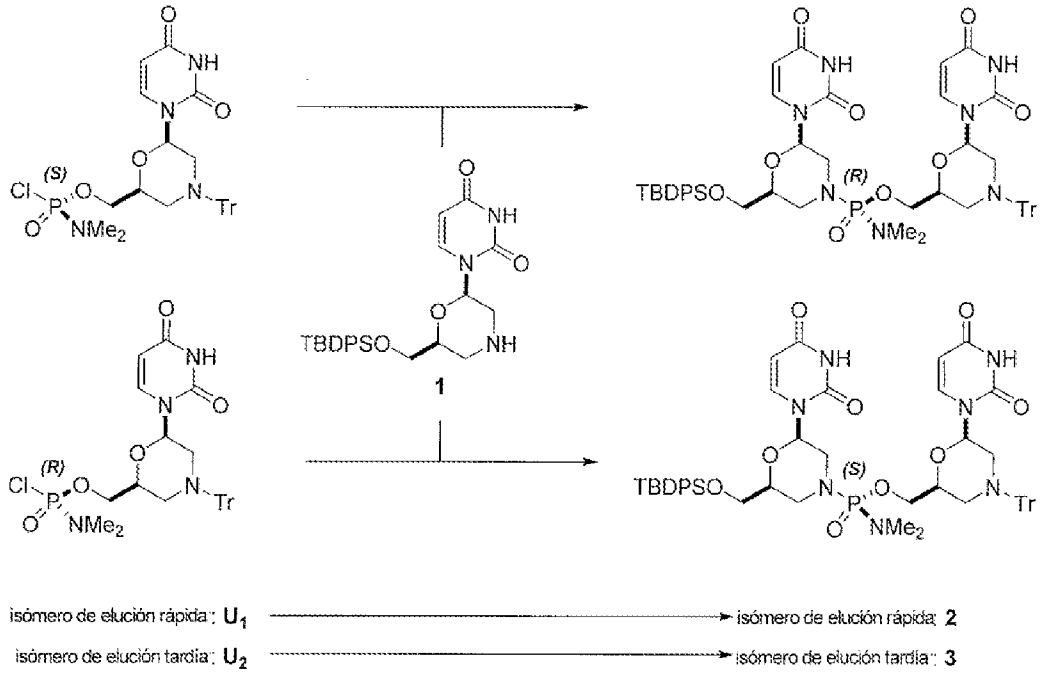
[Datos de RMN de ^{1}H para G_2 (guanina biprotegida)]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,78 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,50 (d, 2H, J= 9 Hz), 7,4-7,5 (m, 6H), 7,26-7,33 (m, 6H), 7,15-7,22 (m, 3H), 7,02 (d, 2H, J= 9 Hz), 6,23 (dd, 1H, J= 2 & 10 Hz), 5,61 (d, 1H, J= 12 Hz), 5,56 (d, 1H, J= 12 Hz), 4,47 (m, 1H), 4,1 (m, 2H), 3,47 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,22 (d, 1H, J= 12 Hz), 3,2 (m, 1H), 2,64 (s, 3H), 2,60 (s, 3H), 1,75 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,58 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,33 (s, 9H), 1,33 (t, 6H, J= 7 Hz)

IV. Ejemplos de acoplamiento de PMO estereoespecífico con monómeros activados puros diastereoisoméricamente

Los siguientes ejemplos presentan el uso de acoplamiento estereoespecífico para preparar productos homogéneos estereoquímicamente.

A. Monómeros de U activados (U_1 y U_2) + U-morfolina-NH (1)



U_1 (11 mg, 0,018 mmol, 1 equiv., 99,0 % de) se disolvió en acetonitrilo (0,11 ml) y se mezcló con diisopropiletilamina (8 µl, 0,05 mmol, 2,5 equiv.). Se añadió U-morfolina-NH (**1**; 14 mg, 0,030 mmol, 1,6 equiv.) y se aplicó sonicación para ayudar en la disolución. Después de agitar 0,5 h, se diluyó una pequeña alícuota de mezcla de reacción con $CDCl_3$ y se analizó por RMN de ^{1}H. Todo el resto de la mezcla de reacción se diluyó con acetonitrilo (8 ml) para análisis de HPLC y se mantuvo en congelador. La formación estereoespecífica de **2** se confirmó por análisis de HPLC (99,4 % de). El protocolo anterior se empleó también para el acoplamiento de **U_2** (95,6 % de) para dar estereoespecíficamente **3** (96,0 % de).

Condiciones de HPLC analítica para acoplamiento de U/U:

Columna de HPLC	Chiralpak IC, 4,6 × 250 mm, 5 u
Temperatura	35 °C
Caudal:	1,0 ml/min
Fase móvil	80 % de metanol 20 % de acetonitrilo
Gradiente	Isocrático
Tiempo de desarrollo	30 min
Volumen de inyección	10 µl (2 mg/ml, acetonitrilo)
Detección	260 nm

Tiempo de retención	**U_1**	11,5 min	
	U_2	21,5 min	
	2	12,0 min	
	3	22,1 min	
nucleófilo	monómero de U activado		Producto (dinucleótido UU)
U morfolina-NH (**1**)	**U_1** (99,0 % de)	→	**2** (99,4 % de)
	U_2 (95,6% de)	→	**3** (96,0% de)

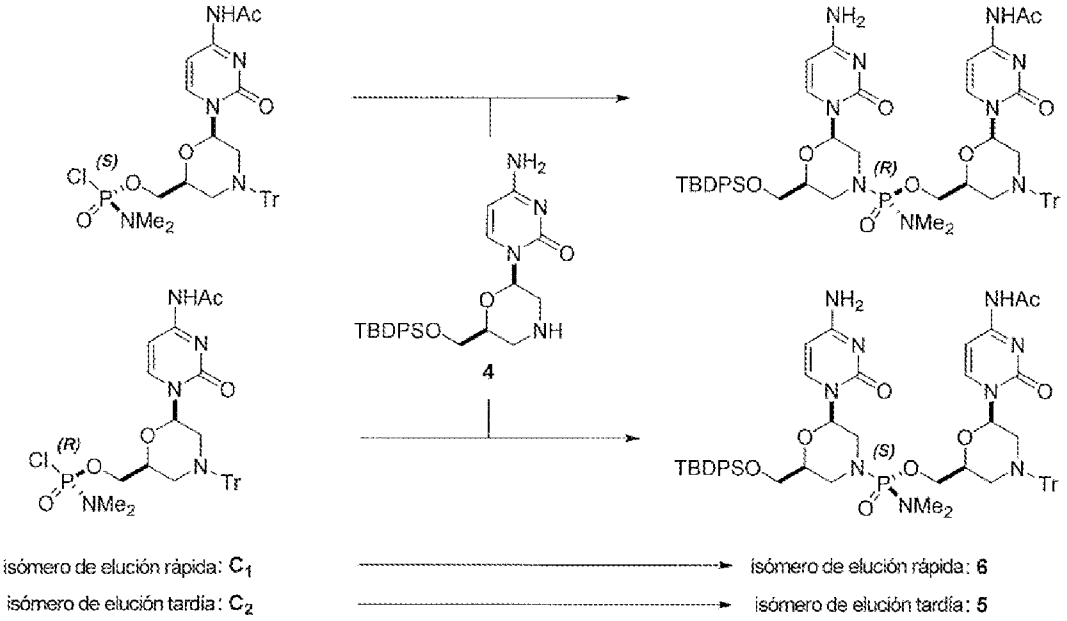
[Datos de RMN de ^{1}H para 2]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,6 (m, 4H), 7,2-7,5 (m, 20H), 7,1-7,2 (m, 3H), 6,15 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 5,73 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 5,66 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 5,54 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 4,40 (m, 1H), 3,93 (m, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,70 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 3,40 (m, 3H), 3,11 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,78 (m, 1H), 2,56 (s, 3H; NMe), 2,54 (s, 3H; NMe), 2,48 (m, 1H), 1,47 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,35 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,04 (s, 9H)

[Datos de RMN de ^{1}H para 3]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,6 (m, 4H), 7,3-7,5 (m, 11H), 7,2-7,3 (m, 9H), 7,1 (m, 3H), 6,12 (dd, 1H, J= 2,0 & 9,6 Hz), 5,71 (d, 1H, J= 8,4 Hz), 5,70 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 5,47 (dd, 1H, J= 2,0 & 10,4 Hz), 4,31 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,31 (m, 2H), 3,24 (m, 1H), 3,07 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,68 (m, 1H), 2,65 (s, 3H; NMe), 2,62 (s, 3H; NMe), 2,26 (m, 1H), 1,45 (t, 1H, J= 12 Hz), 1,29 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,04 (s, 9H)

B. Monómeros de C activados (C_1 y C_2) + C-morfolina-NH (4)



C_1 (20 mg, 0,031 mmol, 1 equiv., 93,5 % de) se disolvió/suspendió en THF (0,40 ml) y se mezcló con diisopropiletilamina (12 µl, 0,069 mmol, 2,3 equiv.). Se añadió la morfolinocitosina (**4**; 16 mg, 0,035 mmol, 1,1 equiv.) disuelta en THF (0,20 ml). Después de agitar 1,0-2,0 h, se diluyó una pequeña alícuota de mezcla de reacción con acetonitrilo y se analizó por CL/EM. Se diluyó una alícuota (30-50 µl) de mezcla de reacción con diclorometano (0,6 ml) para análisis de HPLC. La formación estereoespecífica de **6** se confirmó por análisis de HPLC (94,3% de). La mezcla de reacción se cargó directamente en una columna de gel de sílice y se eluyó con una fase móvil en gradiente de 0-15 % de metanol en acetato de etilo. El protocolo anterior se empleó también para el acoplamiento de C/C de **C_2** (90,2 % de) para dar estereoespecíficamente **5** (90,0 % de).

Condiciones de HPLC analítica para acoplamiento de C/C:

Columna de HPLC	Chiralpak IC, 4,6 × 250 mm, 5 u	
Temperatura	35 °C	
Caudal:	1,0 ml/min	
Fase móvil	Disolvente A	n-heptano

	Disolvente B	1:1 etanol:metanol dietilamina (DEA) al 0,1 %	
Gradiente	Isocrático		
	% de A	% de B	
	50	50	
Tiempo de desarrollo	20 min		
Volumen de inyección	5 µl (3 mg/ml, diclorometano)		
Detección	260 nm		
Tiempo de retención	**4**	5,4 min	
	5	10,5 min	
	6	12,9 min	
nucleófilo	monómero de C activado		Producto (dinucleótido CC)
C morfolina-NH (**4**)	**C**$_1$ (93,5 % de)	→	**6** (94,3% de)
	C$_2$ (90,2% de)	→	**5** (90,0% de)

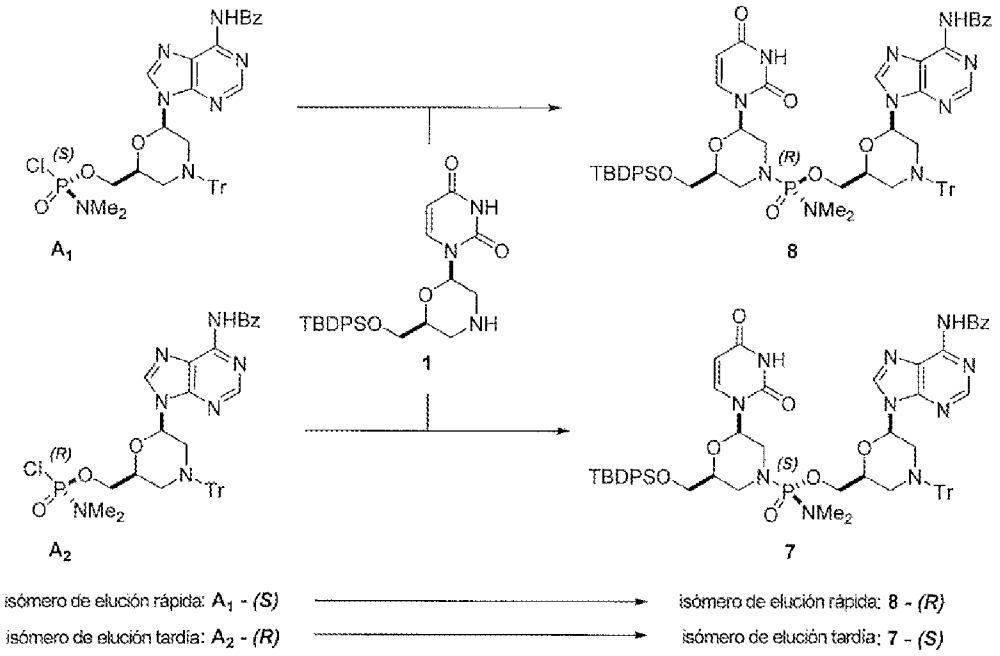
[Datos de RMN de ^{1}H para 5]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,9 (a, 1H), 7,69 (d, 1H, J = 7,4 Hz), 7,62 (m, 5H), 7,35-7,44 (m, 13H), 7,21-7,35 (m, 6H), 7,15 (m, 4H), 6,14 (a d, 1H, J= 7,8 Hz), 5,58 (dd, 1H, J= 2,4 & 9,4 Hz), 5,53 (a, 1H), 4,51 (dd, 1H, J= 8,6 & 10 Hz), 4,09 (m, 1H), 3,70-3,80 (m, 4H), 3,60 (dd, 1H, J= 6,3 & 10 Hz), 3,56 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,28 (m, 1H), 2,96 (d, 1H, J= 11 Hz), 2,69 (s, 3H; NMe), 2,67 (s, 3H; NMe), 2,65 (m, 1H), 2,25 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 1,31 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,13 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,04 (s, 9H).

[Datos de RMN de ^{1}H para 6]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,57 (a, 1H), 7,62-7,70 (m, 7H), 7,35-7,50 (m, 14H), 7,23-7,35 (m, 4H), 7,12 (m, 4H), 6,31 (m, 1H), 5,79 (m, 1H), 5,70 (m, 1H), 4,61 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,80-3,90 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 3,58 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,09 (m, 1H), 2,75 (m, 1H), 2,58 (s, 3H; NMe), 2,55 (s, 3H; NMe), 2,53 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,21 (s, 3H), 1,47 (t, 1H, J= 10 Hz), 1,22 (t, 1H, J= 10 Hz), 1,06 (s, 9H).

C. Monómeros de A activados (A$_1$ y A$_2$)+ U-morfolina-NH (1)



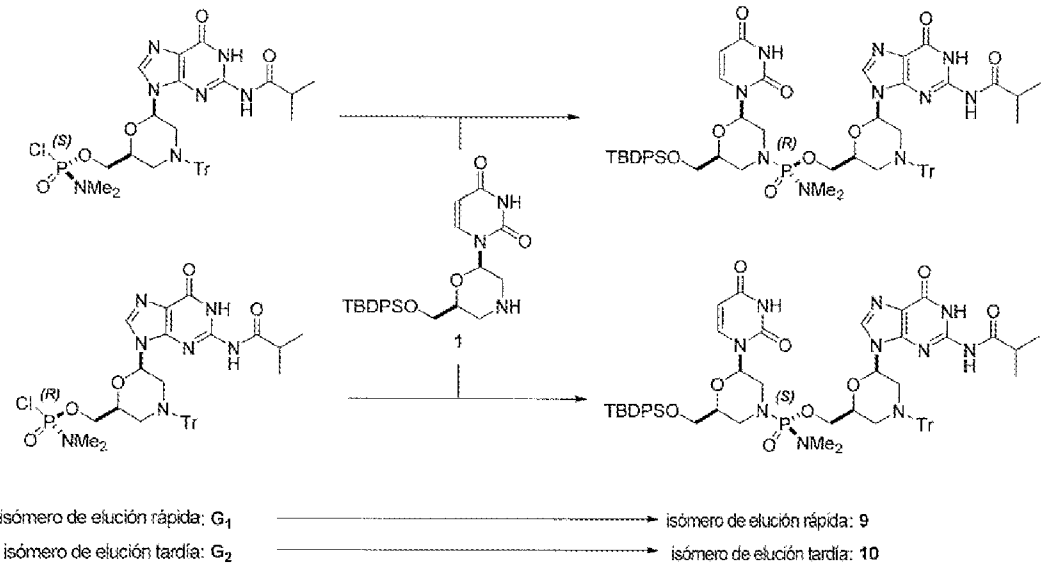
A$_1$ (5,9 mg, 0,008 mmol) se suspendió en acetonitrilo (118 µl). Se añadió diisopropiletilamina (5 µl, 0,03 mmol) seguido de morfolinouracilo (**1**; 4,6 mg, 0,01 mmol). Se aplicó sonicación durante 1 min y la mezcla homogénea resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, la mezcla (pasta blanca espesa) se diluyó con una mezcla de acetonitrilo (5,0 ml) y metanol (0,30 ml) para dar solución transparente homogénea. Se analizó directamente una pequeña alícuota por HPLC sin dilución adicional.

A_2 (F2; 5,0 mg, 0,007 mmol) se suspendió en acetonitrilo (100 µl). Se añadió diisopropiletilamina (4 µl, 0,02 mmol) seguido de morfolinouracilo (4,1 mg, 0,009 mmol). Se aplicó sonicación durante 1 min y la suspensión espesa resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, se añadió acetonitrilo (5,0 ml) y se aplicó sonicación para dar solución transparente homogénea. Se analizó directamente una pequeña alícuota por HPLC sin dilución adicional.

Condiciones de HPLC analítica para acoplamiento de U/A:

Columna de HPLC	Chiralpak IC, 4,6 × 250 mm, 5 u		
Temperatura	35 °C		
Caudal:	1 ml/min		
Fase móvil	Disolvente A	Acetato de etilo	
	Disolvente B	1:1 etanol/metanol con dietilamina al 0,1 %	
Gradiente	Isocrático: 98 % de disolvente A, 2 % de disolvente B		
Tiempo de desarrollo	30 min		
Volumen de inyección	5 µl (1 mg/ml, acetonitrilo-metanol)		
Detección	260 nm		
Tiempo de retención	**7** (isómero *S*)	21,7 min	
	8 (isómero *R*)	24,9 min	
nucleófilo	monómero de A activado		Producto (dinucleótido UA)
U morfolina-NH (**1**)	**A_1** (97,8 % de)	→	**8** (isómero *R*, 96,2 % de)
	A_2 (98,4 % de)	→	**7** (isómero *S*, 98,3 % de)

D. Monómeros de G activados (G_1 y G_2) + U-morfolina-NH (1)



G_1 (6,5 mg, 0,009 mmol, 1 equiv., 99,9 % de) se disolvió/suspendió en THF (0,13 ml) y se mezcló con diisopropiletilamina (3,6 µl, 0,02 mmol, 2,2 equiv.). Se añadió el morfolinouracilo (1; 4,7 mg, 0,010 mmol, 1,1 equiv.) disuelto en THF (0,07 ml). Después de agitar 1,0-2,0 h, se diluyó una pequeña alícuota de mezcla de reacción con acetonitrilo y se analizó por CL/EM. Se diluyó una alícuota (100 µl) de mezcla de reacción con diclorometano (0,4 ml) para análisis de HPLC. La formación estereoespecífica de **9** se confirmó por análisis de HPLC (99,9 % de).

Condiciones de HPLC analítica para acoplamiento de U/G:

Columna de HPLC	Chiralpak IA, 4,6 × 250 mm, 5 u		
Temperatura	35 °C		
Caudal:	1,0 ml/min		
Fase móvil	Disolvente A	n-heptano	
	Disolvente B	Acetato de etilo	
	Disolvente C	1:1 etanol:metanol dietilamina (DEA) al 0,1 %	
Gradiente	Isocrático		
	% de A	% de B	% de C
	55	40	5

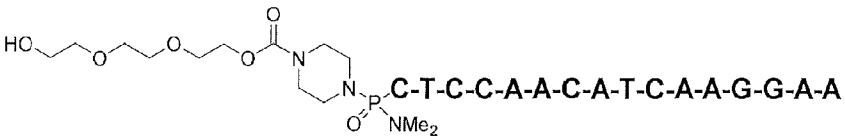
Tiempo de desarrollo	30 min			
Volumen de inyección	5 µl (2 mg/ml, diclorometano)			
Detección	260 nm			
Tiempo de retención	**1**	8,4 min		
	9	14,0 min		
	10	16,3 min		
nucleófilo	monómero de G activado		Producto (dinucleótido UG)	
U morfolina-NH (**1**)	**G**$_1$ (99.9 % de)	→	**9** (99,9 % de)	

Los compuestos sustancialmente puros diastereoisoméricamente presentados anteriormente pueden usarse para preparar oligonucleótidos puros estereoquímicamente y otros compuestos. Se muestran ejemplos de oligonucleótidos potenciales, por ejemplo, en Summerton, J (1999). "Morpholino Antisense Oligomers: The Case for an RNase-H Independent Structural Type.". Biochimica et Biophysica Acta 1489 (1): 141-58; y en Summerton, J; Weller D. (1997). "Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties". Antisense & Nucleic Acid Drug Development 7 (3): 187-95.

V. Ejemplo de síntesis estereoespecífica de PMO 16-meros y diferenciación de estereoisómeros por ensayo biofísico

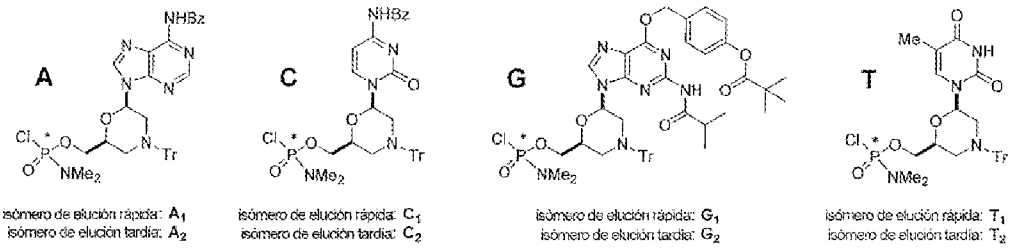
Este ejemplo presenta una síntesis que aborda un par de PMO 16-meros estereopuros a través de acoplamiento estereoespecífico usando monómeros activados. Estos PMO tienen series estereoquímicas opuestas para sus enlaces fosforosos.

Secuencia diana:



(SEQ ID NO: 2)

Monómeros activos estereopuros (componentes básicos):



PMO diana	Monómeros activos estereopuros usados para el acoplamiento
Estereoisómero 1	A_2, C_2, G_1 y T_1
Estereoisómero 2	A_1, C_1, G_2 y T_2

Se muestra un esquema para la síntesis estereoespecífica de PMO 16-meros y la diferenciación de estereoisómeros por ensayo biofísico en la figura 6. Se prepararon los estereoisómeros 1 y 2 de PMO 16-mero manualmente por síntesis en fase sólida en resina de aminometilpoliestireno-disulfuro (~300 µmol/g de carga, véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090131624A1, que se incorpora por referencia en este documento) a escala de 50 mg (peso de resina de partida).

Soluciones madre para síntesis en fase sólida:

Destritilación	Trifluoroacetato de 4-cianopiridina (CYTFA) al 2 % (p/v) y etanol al 0,9 % (v/v) en trifluoroetanol/DCM al 20 % (v/v).
Neutralización	Diisopropiletilamina al 5 % (v/v) en isopropanol/DCM al 25 % (v/v).

Acoplamiento	Solución 55 mM recién preparada en NEM-DMI* para cada uno de los monómeros activos estereopuros (A_2, C_2, G_1 y T_1 para estereoisómero 1; A_1, C_1, G_2 y T_2 para estereoisómero 2)
	* N-etilmorfolina 0,11 M en 1,3-dimetilimidazolidinona (DMI)

Ciclo operativo para cada acoplamiento de PMO:

Etapa	Volumen (ml)	Tiempo (min)
DCM	1-2	2-5
Destritilación	1-2	5
Destritilación	1-2	5
Destritilación	1-2	5
Destritilación	1-2	5
Destritilación	1-2	5
DCM	1-2	2-5
Neutralización	1-2	2-5
Neutralización	1-2	2-5
Neutralización	1-2	2-5
Neutralización	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
Acoplamiento	1	>180*
DCM	1-2	2-5
Neutralización	1-2	2-5
Neutralización	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
* 40 °C durante 3 horas o temperatura ambiente durante 12 horas.		

Liberación de la resina y desprotección:

Al 16-mero unido a la resina (después de destritilación) se le añadió 1:3 (v/v) de amoniaco acuoso/etanol al 28 % (~5 ml). La mezcla se selló y se calentó a 45 °C durante 20 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se filtró y se lavó con metanol. El filtrado se concentró y se diafiltró frente a tampón de trietilamonio (TEAA) 15 mM pH 7,0. El aparato usado fue un Amicon Stirred Cell (50 ml) con una membrana UF Ultracel de 1 kDa. Las muestras se diafiltraron por dilución/concentración hasta que el disolvente original se redujo hasta un 1 % de la concentración original (aproximadamente 5 ciclos) y después se sometieron a purificación por HPLC preparativa en fase inversa.

Método de HPLC preparativa en fase inversa para purificación de PMO:

Columna de HPLC	Columna XBridge Prep C8 OBD, 9 × 150 mm, 5 µm		
Temperatura de la columna	temperatura ambiente		
Caudal:	30,0 ml/min		
Gradiente	Tiempo (min)	% de A	% de B
	Inicial	85	15
	18	80	20
	20	0	100
Fase móvil	Disolvente A: Tampón de acetato de trietilamonio (TEAA) 15 mM pH 7 + 10 % de MeOH		
	Disolvente B: acetonitrilo + 10 % de MeOH		
Solución de dilución	Tampón TEAA 15 mM		
Tiempo de desarrollo	20 min		
Detección	UV 260 nm		
Tiempo de retención	**Estereoisómero 1**	13,98 min	
	Estereoisómero 2	14,03 min	

Método de CL/EM para evaluación de la calidad de PMO:

Columna de HPLC	Waters BEH C18 Oligo 2,1 × 50 mm 130 Angstrom 1,7 um
Temperatura de la columna	45 °C

Caudal:	0,3 ml/min		
Gradiente	Tiempo (min)	% de A	% de B
	Inicial	95	5
	2	95	5
	20	50	50
	24	50	50
	24,1	95	5
	30	95	5
Fase móvil	Disolvente A: Acetato de amonio 50 mM		
	Disolvente B: Acetonitrilo/metanol 1/1 v/v con acetato de amonio 50 mM		
Tiempo de desarrollo	30 min		
Volumen de inyección	25 µl de diluyente: agua o acetato de trietilamina 10 mM		
Detección	UV 260 nm		
EM/modo de ionización	Synapt G2/modo positivo de electronebulización		
Voltaje de cono/extracción	30 V/4 V/2,8 kV		
Temp. de fuente/ energías de colisión/función de EM/análisis	100 °C/4 eV (baja energía) 40-70 eV (alta energía/modo MS^E/desconvolución y desisotopado usando el programa informático Waters MSe Viewer		
Tiempo de retención	**Estereoisómero 1**		10,83 min
	Estereoisómero 2		10,86 min

Materiales y condiciones para medición de temperatura de fusión (Tm)

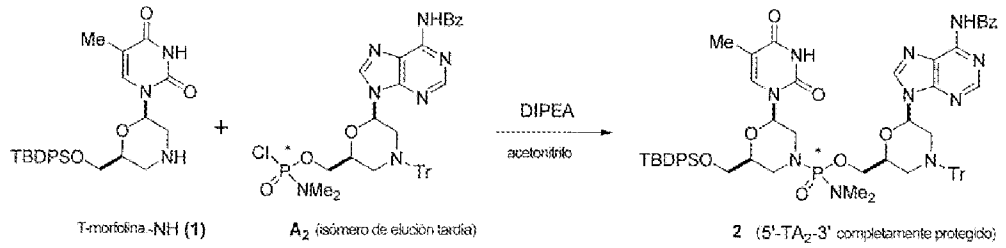
ARN complementario (16-mero)	5'-UUCCUUGAUGUUGGAG-3' (SEQ ID NO. 1) (IDT Integrated DNA Technologies)
Tampón de dilución	Fosfato de sodio 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,0 (ajustado con ácido fosfórico)
Aparato de fusión térmica	Espectrofotómetro Shimadzu 2700 UV-Vis equipado con el módulo de temperatura Shimadzu S-1700
Concentración de centrifugación al vacío	Labconco Centrivap Concentrator Modelo 7810015
Soluciones madre	8 µM en 250 µl de tampón de cada muestra y el ARN complementario se prepararon usando el tampón de dilución a partir de muestras concentradas y secadas por centrifugación al vacío
Procedimiento	• Cada muestra se mezcló entonces con un volumen equivalente de ARN complementario 8 µM
	• Las mezclas se calentaron hasta 95 °C y después se enfriaron hasta 25 °C para hibridación antes de la medición de Tm.
	• El análisis de Tm (UV 260 nm) se realizó de 25 °C a 105 °C a 0,5 °C/min (con retorno de la temperatura a las condiciones de partida después de cada ciclo) y después se repitió en las mismas condiciones.
	• Se usó el programa informático Tm Analysis (Shimadzu) para calcular la Tm usando la función de "promediar".

Sumario para la caracterización de la fusión térmica de complejos de PMO distintos estereoquímicamente con ARN complementarios:

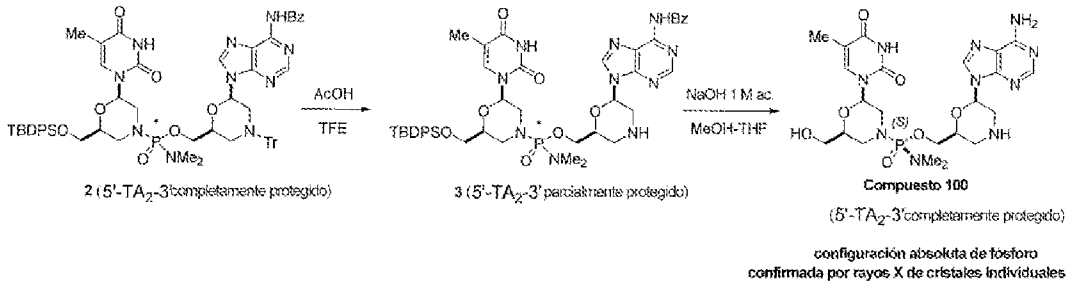
	Pureza por CL/EM (% de área)	Tm (°C)
Estereoisómero 1	97,6	62,8
Estereoisómero 2	94,2	57,2

Los puntos de fusión para los estereoisómeros 1 y 2 se muestran en la figura 7. Basándose en los diferentes puntos de fusión, se puede concluir que se han preparado cantidad separadas de estereoisómeros sustancialmente puros.

VI. Ejemplo de síntesis estereoespecífica y asignación estereoquímica absoluta para el compuesto dinucleotídico de PMO estereopuro 100 (5'-TA_2-3')



El monómero de A activo de elución tardía (**A_2**; 200 mg, 0,277 mmol, 1 equiv.) se disolvió en una mezcla de acetonitrilo (2,0 ml) y DIPEA (0,12 ml, 0,69 mmol, 2,5 equiv.). Después se añadió T-morfolina-NH (**1**; 146 mg, 0,305 mmol, 1,1 equiv.) y la suspensión resultante se sonicó durante unos pocos minutos hasta que se obtuvo una solución transparente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Tras la reacción completa controlada por CL/EM, la mezcla se concentró y se sometió a cromatografía en columna (3 % de metanol en DCM, Biotage SnapUltra 10 g de SiO_2). Las fracciones de producto limpias se combinaron y concentraron al vacío para dar el dinucleótido 5'-TA-3' estereopuro completamente protegido **2** como un sólido blanco (240 mg, 0,206 mmol, 74 % de rendimiento).



Al dinucleótido completamente protegido **2** (500 mg, 0,429 mmol) en matraz de 25 ml se le añadió 2,2,2-trifluoroetanol (TFE; 4,0 ml) y ácido acético (1,0 ml) a temperatura ambiente. Las mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente y se controló por CL/EM. Después de 30 minutos, la reacción se interrumpió con $NaHCO_3$ acuoso saturado y DCM. Las dos capas se separaron y la capa acuosa se extrajo de nuevo. Todas las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera semisaturada, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron para dar el producto en bruto como una espuma blanca. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (20 % de MeOH en acetona, cartucho Biotage Snap Ultra 25 g de SiO_2) para dar el dinucleótido parcialmente protegido **3** como un sólido vítreo (300 mg, 0,325 mmol, 76 % de rendimiento).

El dinucleótido parcialmente protegido **3** (250 mg, 0,271 mmol) se disolvió en una mezcla de metanol (12,5 ml) y THF (12,5 ml) y se trató con NaOH 1 M (10,8 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 22 h (progreso controlado por CL/EM), la mezcla se neutralizó con HCl 1 M (10,8 ml) para ajustar el pH a 8 y después se concentró al vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en agua (5 ml) y se lavó con EtOAc (5 ml). La capa acuosa se concentró al vacío hasta sequedad para dar el producto en bruto como un sólido blanco (480 mg). El producto en bruto se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño (Sephadex® LH-20, MeOH/agua 4:1) para dar el dinucleótido completamente desprotegido **compuesto 100** como un sólido blanco (137 mg, 0,236 mmol, 87 % de rendimiento).

Una gota de solución acuosa de **compuesto 100** (200 mg/ml) se selló en un pocillo con agua pura durante un día para que crecieran cristales individuales. La estructura por rayos X del cristal individual confirmó la configuración absoluta del enlace fosforoso como *S*. Esta estructura por rayos X se muestra en un diagrama ORTEP en la figura 8. Se muestran diagramas ORTEP de fragmentos separados en la figura 9A y la figura 9B. Se recogieron datos de rayos X como se presenta a continuación.

Recogida de datos

Se montó un cristal individual de **compuesto 100** ($C_{22}H_{33}N_{10}O_7P$) en una fibra de vidrio. Todas las mediciones se hicieron en un difractómetro usando grafito monocromado de radiación Cu-Kα.

Las constantes de celda y una matriz de orientación para la recogida de datos, obtenidos de refinado por mínimos cuadrados usando los ángulos de ajuste de 36473 reflejos centrados cuidadosamente en el intervalo de 7,75 < 2θ < 147,10° correspondían a una celda monoclínica centrada en C con las dimensiones:

a = 33,3523(2) Å

b = 13,80020(11) Å β = 96,8075(6)°

c = 14,19956(10) Å

V = 6489,53(8) Å^3

Para Z = 4 y F.W. = 580,54, la densidad calculada es 0,594 g/cm^3. Basándose en las condiciones de reflejo de:

hkl: h+k = 2n

para consideraciones de compactación, una análisis estadístico de la distribución de la intensidad, y la resolución satisfactoria y refinado de la estructura, el grupo espacial se determinó en:

C2 (#5)

Los datos se recogieron a una temperatura de 23 + 1 °C usando la técnica de exploración ω-2θ hasta un valor 2θ máximo de 147,7°. Las exploraciones omega de varios reflejos intensos, hechas antes de la recogida de datos, tuvieron un promedio de anchura a la mitad de la altura de 0,00° con un ángulo extracción de 6,0°. Se hicieron exploraciones de (0,00 + 0,00 tan θ)° a una velocidad de 0,0°/min (en ω).

Reducción de datos

Se recogieron 50795 reflejos, donde 12008 fueron únicos (Rint = 0,0453). Los datos se recogieron y procesaron usando CrysAlisPro (Rigaku Oxford Diffraction). (CrysAlisPro: programa informático de recogida y procesamiento de datos, Rigaku Corporation (2015). Tokio 196-8666, Japón). No se aplicó corrección de desintegración.

El coeficiente de absorción lineal, μ, para radiación Cu-Kα es 6,011 cm^{-1}. Se aplicó una corrección de absorción empírica que produjo factores de transmisión que varían de 0,341 a 1,000. Los datos se corrigieron para efectos de Lorentz y polarización.

Resolución y refinado de la estructura

La estructura se resolvió por métodos directos (*SHELXT Versión 2014/5*: Sheldrick, G. M. (2014). Acta Cryst. A70, C1437) y se expandió usando técnicas de Fourier. Los átomos que no eran hidrógeno se refinaron anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno se refinaron usando el modelo de desplazamiento (*riding*). El ciclo final de refinado de mínimos cuadrados de matriz completa (usando la función de mínimos cuadrados minimizada: (SHELXL Versión 2014/7); $\sum w(F_o^2-F_c^2)^2$ donde w = mínimos cuadrados de los pesos) sobre F^2 se basó en 12008 reflejos observados y 849 parámetros variables y convergieron (el desplazamiento de parámetro más grande fue 0,00 veces su esd) con factores de concordancia no ponderados y ponderados de:

$$R1 = \Sigma \; ||Fo| - |Fc|| \; / \; \Sigma \; |Fo| = 0.0522$$

$$wR2 = [\; \Sigma \; (\; w \; (Fo^2 - Fc^2)^2 \;) / \; \Sigma \; w(Fo^2)^2]^{1/2} = 0.1632$$

La adecuación de ajuste fue 1,45. La adecuación de ajuste se define como: $[\sum w(Fo2-Fc2)2/(No-Nv)]^{1/2}$, donde: N_o = número de observaciones y Nv = número de variables.

Se usaron pesos unitarios. Los picos máximo y mínimo en el mapa de Fourier de diferencias final correspondieron a 1,79 y -0,69 e$^-$/Å^3, respectivamente. El parámetro de Flack final fue 0,029(7), lo que indica que la estructura es de doble inversión. (Parsons, S. y Flack, H. (2004), Acta Cryst. A60, s61; Flack, H.D. y Bernardinelli (2000), J. Appl. Cryst. 33, 114-1148).

Los factores de dispersión de átomos neutros se adoptaron de las International Tables for Crystallography (IT), Vol. C, Tabla 6.1.1.4. (International Tables for Crystallography, Vol.C (1992). Ed. A.J.C. Wilson, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos, Tabla 6.1.1.4, pág. 572). Se incluyeron los efectos de dispersión anómalos en Fcalc (Ibers, J. A. y Hamilton, W. C.; Acta Crystallogr., 17, 781 (1964)); los valores para Δf' y Δf" fueron los de Creagh y McAuley. (Creagh, D. C. y McAuley, W.J .; "International Tables for Crystallography", Vol C, (A.J.C. Wilson, ed.),

Kluwer Academic Publishers, Boston, Tabla 4.2.6.8, páginas 219-222 (1992)). Los valores para los coeficientes de atenuación de masas son los de Creagh y Hubbell. (Creagh, D. C. y Hubbell, J.H..; "International Tables for Crystallography", Vol C, (A.J.C. Wilson, ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston, Tabla 4.2.4.3, páginas 200-206 (1992)). Todos los cálculos se realizaron usando el paquete de programas informáticos cristalográficos Crystal Structure excepto para el refinado, que se realizó usando SHELXL Versión 2014/7. (*CrystalStructure 4.2*: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corporation (2000-2015). Tokio 196-8666, Japón; *SHELXL Versión 2014/7*: Sheldrick, G. M. (2008). Acta Cryst. A64, 112-122).

Los datos cristalinos, las mediciones de intensidad y la resolución y refinado de la estructura fueron como se muestra a continuación:

A. Datos cristalinos

Fórmula empírica	$C_{22}H_{33}N_{10}O_7P$
Peso de la fórmula	580,54
Color del cristal, hábito	nONE, nONE
Dimensiones del cristal	no descritas
Sistema cristalino	monoclínico
Tipo de red	centrada en C
N.º de reflejos usados para la	
determinación de la celda unitaria (intervalo 2θ)	36473 (7,7 - 147,1°)
Anchura de pico de exploración omega a la mitad de la altura	0,00°
Parámetros de red	a = 33,3523(2) Å
	b = 13,80020(11) Å
	c = 14,19956(10) Å
	β = 96,8075(6) °
	V = 6489,53(8) $Å^3$
Grupo espacial	C2 (#5)
Valor Z	4
D_{calc}	0,594 g/cm^3
F_{000}	1224,00
μ(CuKα)	6,011 cm^{-1}

B. Mediciones de intensidad

Difractómetro	
Radiación	CuKα (λ = 1,54187 Å)
	grafito monocromado
Ángulo de extracción	2,8°
Apertura de detector	2,0 - 2,5 mm horizontal
	2,0 mm vertical
Distancia del cristal al detector	21 mm
Temperatura	23,0 °C
Tipo de exploración	ω-2θ
Tasa de exploración	0,0°/min (en ω) (hasta 0 exploraciones)
Anchura de exploración	$(0,00 + 0,00 \tan \theta)^O$
$2\theta_{máx}$	147,7°
N.º de reflejos medidos	Total: 50795
	Únicos: 12008 (R_{int} = 0,0453)
	Cocientes de Parsons (parámetro x de Flack): 4813
Correcciones	Polarización de Lorentz
	Absorción
	(factores trans.: 0,341 - 1,000)

C. Resolución y refinado de la estructura

Resolución de la estructura	Métodos directos (SHELXT Versión 2014/5)
Refinado	Mínimos cuadrados de matriz completa sobre F^2
Función minimizada	$\Sigma w (Fo^2 - Fc^2)^2$
Mínimos cuadrados de los pesos	$w = 1/ [\sigma^2(Fo^2) + (0.1000 \cdot P)^2 + 0,0000 \cdot P]$
	donde $P = (Máx(Fo^2,0) + 2Fc^2)/3$
Valor límite de $2\theta_{máx}$	147,7°
Dispersión anómala	Todos los átomos que no son hidrógeno

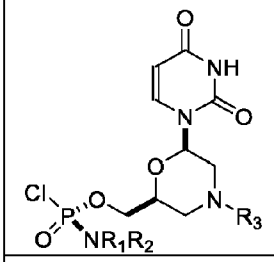
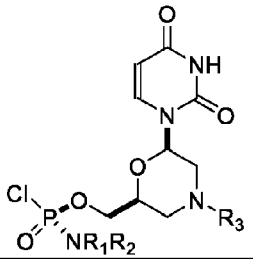
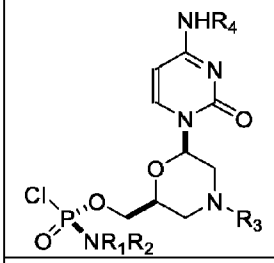
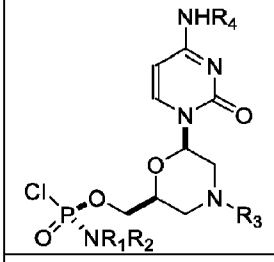
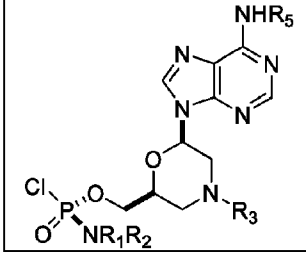
N.º de observaciones (todos los reflejos)	12008
N.º de variables	849
Relación de reflejo/parámetro	14,14
Residuos: R1 (I>2,00σ(I))	0,0522
Residuos: R (todos los reflejos)	0,0534
Residuos: wR2 (todos los reflejos)	0,1632
Indicador de adecuación de ajuste	1,450
Parámetro de Flack (cocientes de Parsons = 4813)	0,029(7)
Desplazamiento máx/error en ciclo final	0,001
Pico máximo en mapa dif. final	1,79 $e^-/Å^3$
Pico mínimo en mapa dif. final	-0,69 $e^-/Å^3$

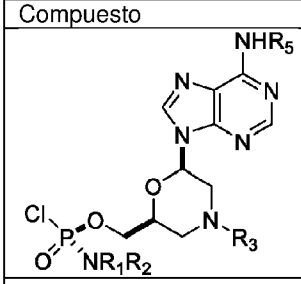
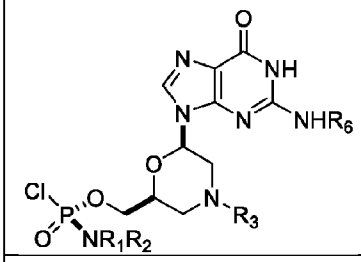
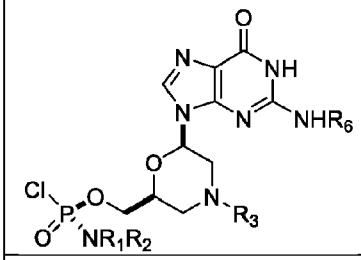
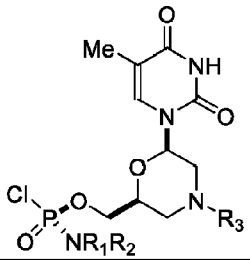
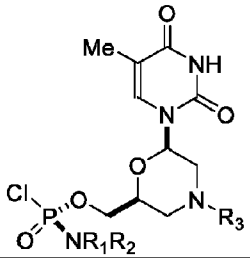
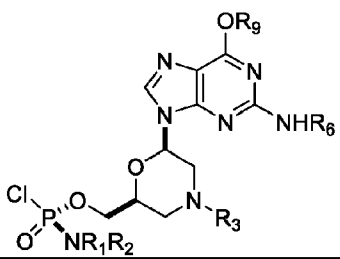
[Datos de RMN de ^1H para **compuesto 100**]

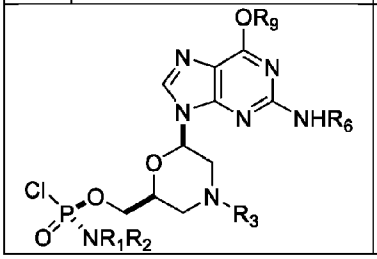
^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 8,25 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 5,85 (d, 1H), 5,45 (d, 1H), 4,25 (m, 2H), 4,05 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,6 (m, 2H), 3,4 (m, 4H), 2,90 (m, 4H), 2,60 (d, 6H), 1,8 (s, 3H).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto sustancialmente puro diastereoisoméricamente seleccionado del grupo que consiste en el compuesto de fórmula 20, el compuesto de fórmula 21, el compuesto de fórmula 22, el compuesto de fórmula 23, el compuesto de fórmula 24, el compuesto de fórmula 25, el compuesto de fórmula 26, el compuesto de fórmula 27, el compuesto de fórmula 28, el compuesto de fórmula 29, el compuesto de fórmula 30 y el compuesto de fórmula 31,

Compuesto	Fórmula n.º
	20
	21
	22
	23
	24

Compuesto	Fórmula n.º
	25
	26
	27
	28
	29
	30

Compuesto	Fórmula n.º
	31

en las que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan del grupo que consiste en -H, alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido, naftilo opcionalmente sustituido o, con el nitrógeno al que están fijados, formar un heterociclo opcionalmente sustituido, que puede ser, por ejemplo, pirrolidina, piperazina y morfolina;

en las que R_3 se selecciona del grupo que consiste en tritilo (Tr), que puede se tritilo sustituido incluyendo, aunque sin limitación, tal como MMTr (p-metoxifenildifenilmetilo), bencilo opcionalmente sustituido, 4-metoxibencilo (PMB, MPM), 3,4-dimetoxibencilo, difenilmetilo (Dpm), 4-metoxibencilo y sulfonilo;

R_4, R_5 y R_6 se seleccionan del grupo que consiste en -H, -C(O)R_7 y -C(O)OR_7, donde R_7 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C1-C6, bencilo, 2,2,2-tricloroetilo y un arilo seleccionado de fenilo, 4-metoxifenilo, 4-bromofenilo y 4-nitrofenilo;

R_9 se selecciona del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, cianoetilo, acilo, carbonato, carbamato, bencilo opcionalmente sustituido, 4-pivaloiloxibencilo y sililo,

y enantiómeros de los mismos; en los que sustancialmente puro diastereoisoméricamente indica diastereoisómeros que están en exceso diastereoisomérico igual a o mayor de un 87%.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el sulfonilo es un sulfonilo escindible seleccionado del grupo que consiste en 2-nitrobencenosulfonilo, 4-nitrobencenosulfonilo y 2,4-dinitrobencenosulfonilo.

3. Un método para preparar un oligonucleótido puro estereoquímicamente, que comprende hacer reaccionar compuestos sustancialmente puros diastereoisoméricamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

4. Una composición sustancialmente pura diastereoisoméricamente, que comprende un compuesto sustancialmente puro diastereoisoméricamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

FIG. 1

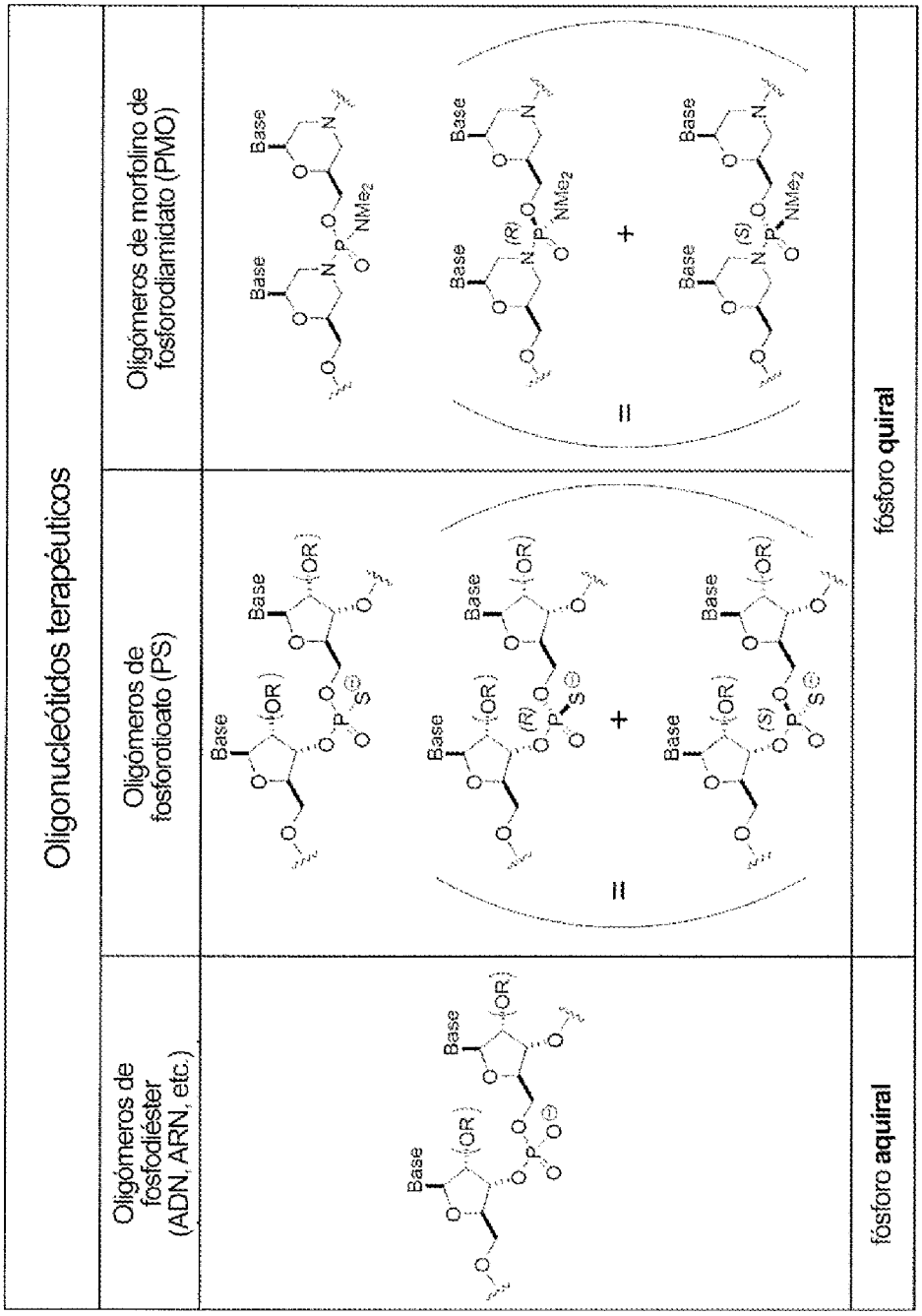

Oligonucleótidos terapéuticos
Oligómeros de fosfodiéster (ADN, ARN, etc.)
Oligómeros de fosforotioato (PS)
Oligómeros de morfolino de fosforodiamidato (PMO)
fósforo aquiral
fósforo quiral

FIG. 2

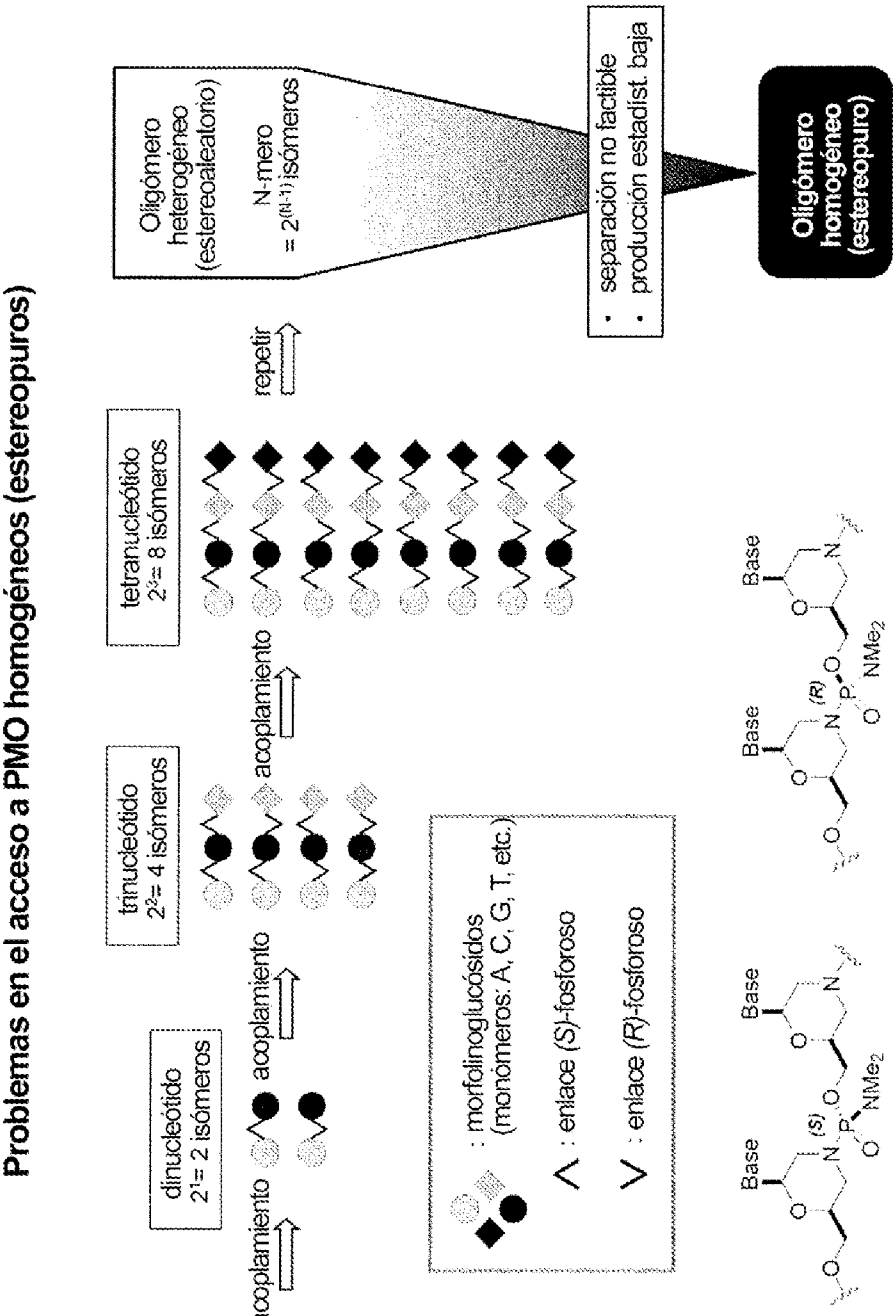

Problemas en el acceso a PMO homogéneos (estereopuros)
dinucleótido
2¹= 2 isómeros
acoplamiento
acoplamiento
trinucleótido
2²= 4 isómeros
acoplamiento
tetranucleótido
2³= 8 isómeros
repetir
Oligómero heterogéneo (estereoaleatorio)
N-mero
= 2(N-1) isómeros
• separación no factible
• producción estadíst. baja
Oligómero homogéneo (estereopuro)
: morfolinoglucósidos (monómeros: A, C, G, T, etc.)
: enlace (S)-fosforoso
: enlace (R)-fosforoso
Base
(S)
NMe2
Base
Base
(R)
NMe2
Base

FIG. 3

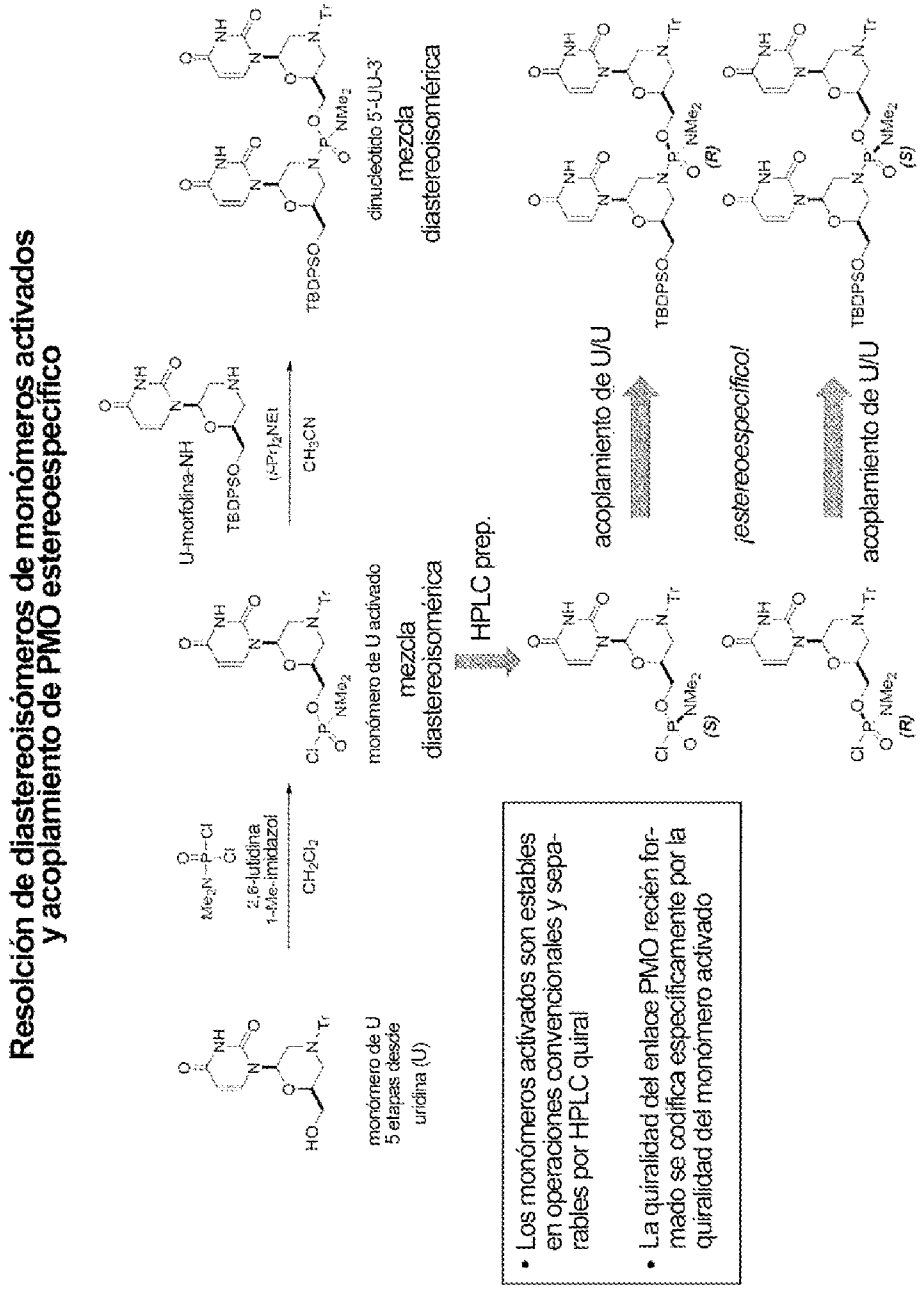

Resolción de diastereoisómeros de monómeros activados y acoplamiento de PMO estereoespecífico
monómero de U 5 etapas desde uridina (U)
2,6-lutidina
1-Me-imidazol
CH2Cl2
monómero de U activado
mezcla diastereoisomérica
U-morfolina-NH
TBDPSO
(i-Pr)2NEt
CH3CN
dinucleótido 5'-UU-3'
mezcla diastereoisomérica
HPLC prep.
acoplamiento de U/U
¡estereoespecífico!
acoplamiento de U/U
• Los monómeros activados son estables en operaciones convencionales y separables por HPLC quiral
• La quiralidad del enlace PMO recién formado se codifica específicamente por la quiralidad del monómero activado

FIG. 4A

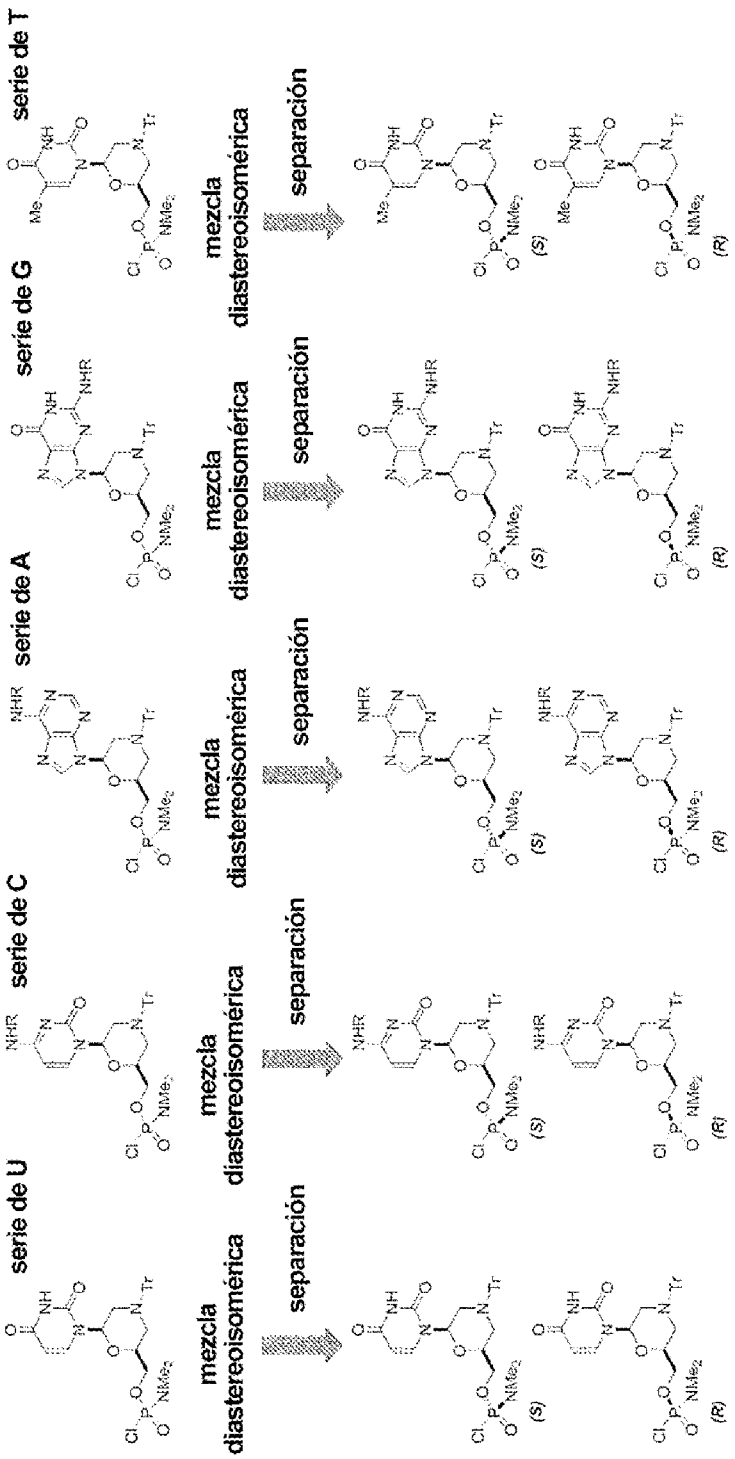

Diez "reactivos" clave para construir oligómeros homogéneos
serie de U
serie de C
serie de A
serie de G
serie de T
mezcla diastereoisomérica
separación
(S)
(R)

FIG. 4B

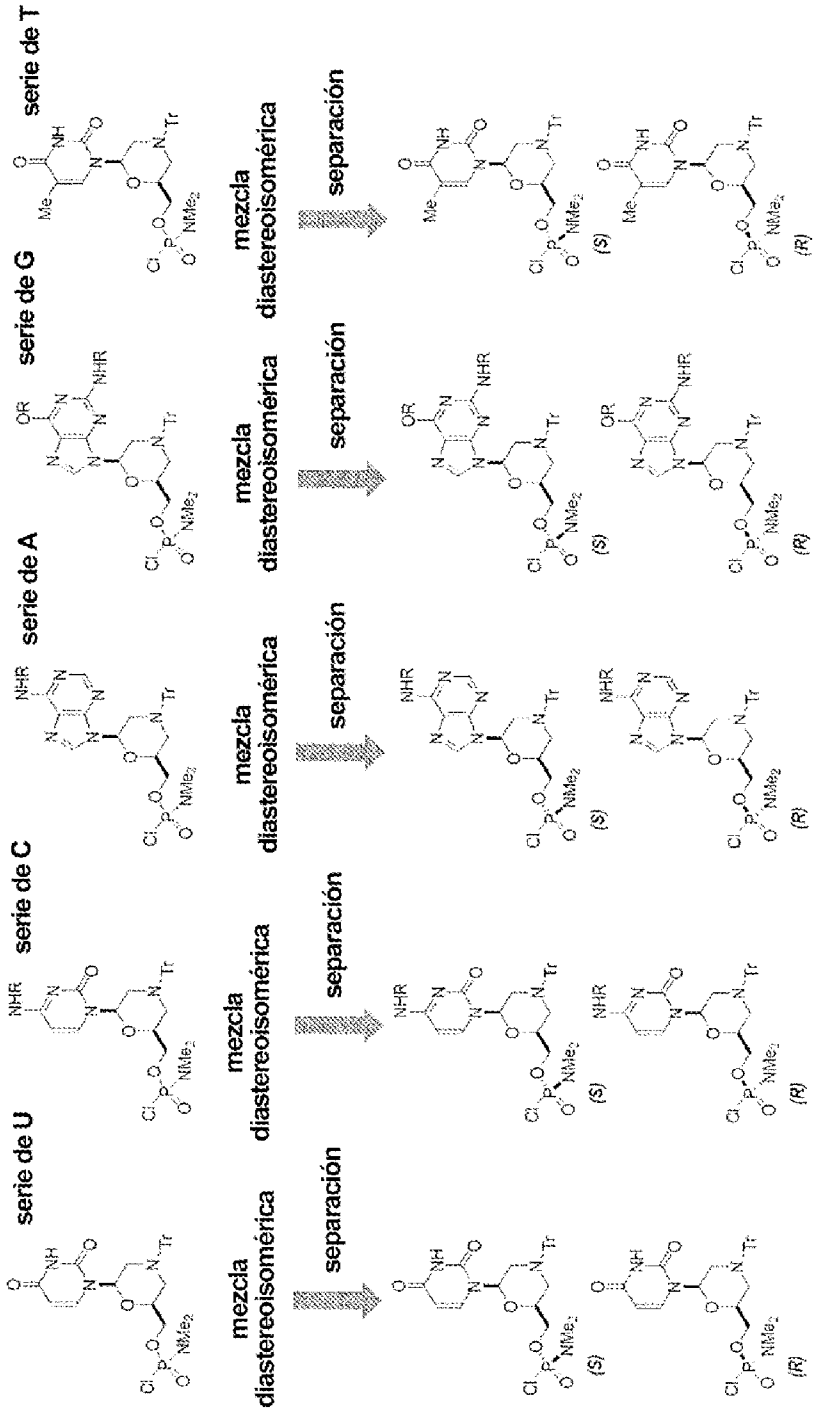

Diez "reactivos" clave para construir oligómeros homogéneos
serie de U
serie de C
serie de A
serie de G
serie de T
mezcla diastereoisomérica
separación
(S)
(R)

FIG. 5

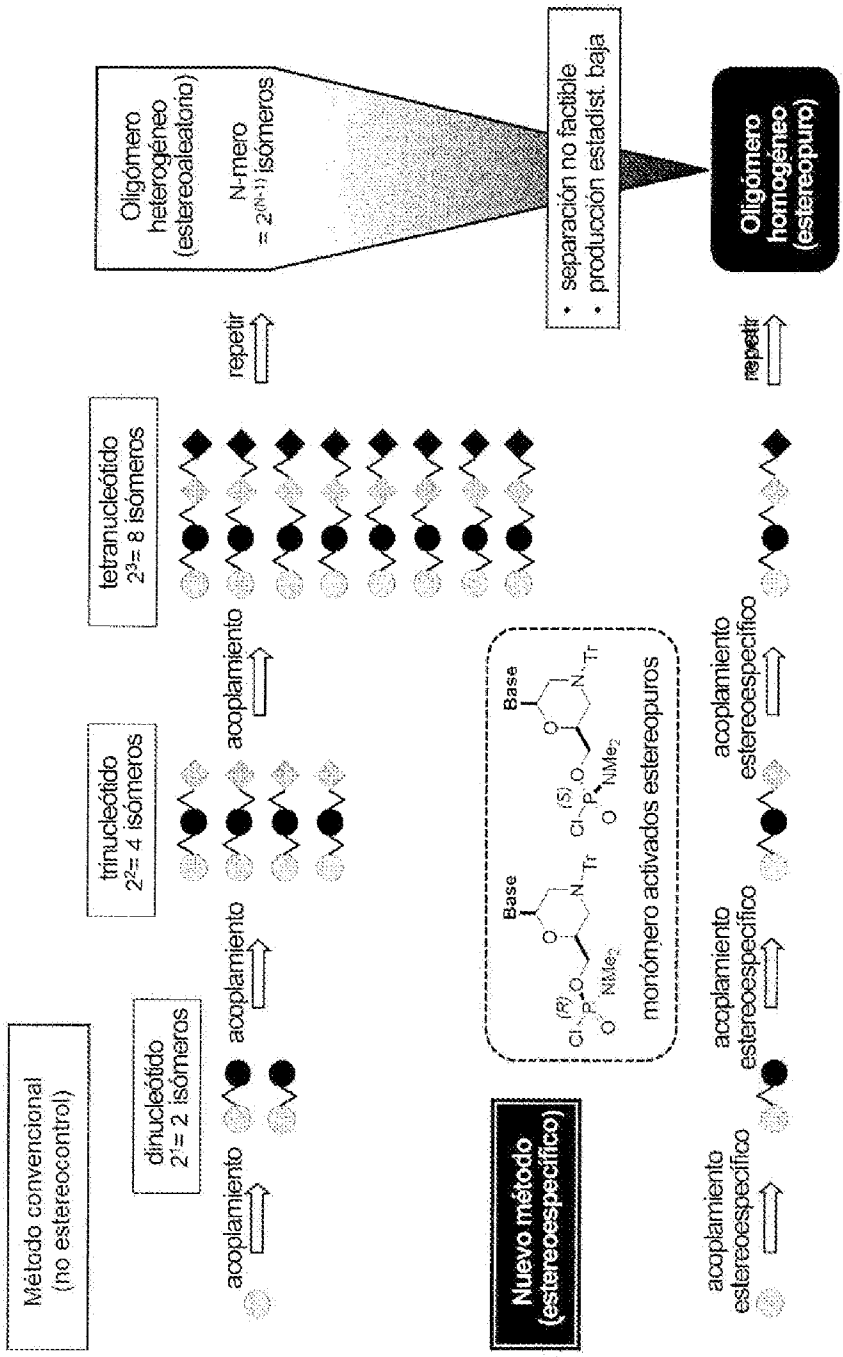

Nuevo método proporciona acceso directo a PMO estereopuros (homogéneos)
Método convencional (no estereocontrol)
dinucleótido 2¹= 2 isómeros
trinucleótido 2²= 4 isómeros
tetranucleótido 2³= 8 isómeros
Oligómero heterogéneo (estereoaleatorio)
N-mero = 2(N-1) isómeros
repetir
separación no factible
producción estadíst. baja
Oligómero homogéneo (estereopuro)
acoplamiento
acoplamiento estereoespecífico
Nuevo método (estereoespecífico)
monómero activados estereopuros
Base
Tf
NMe2

FIG. 6

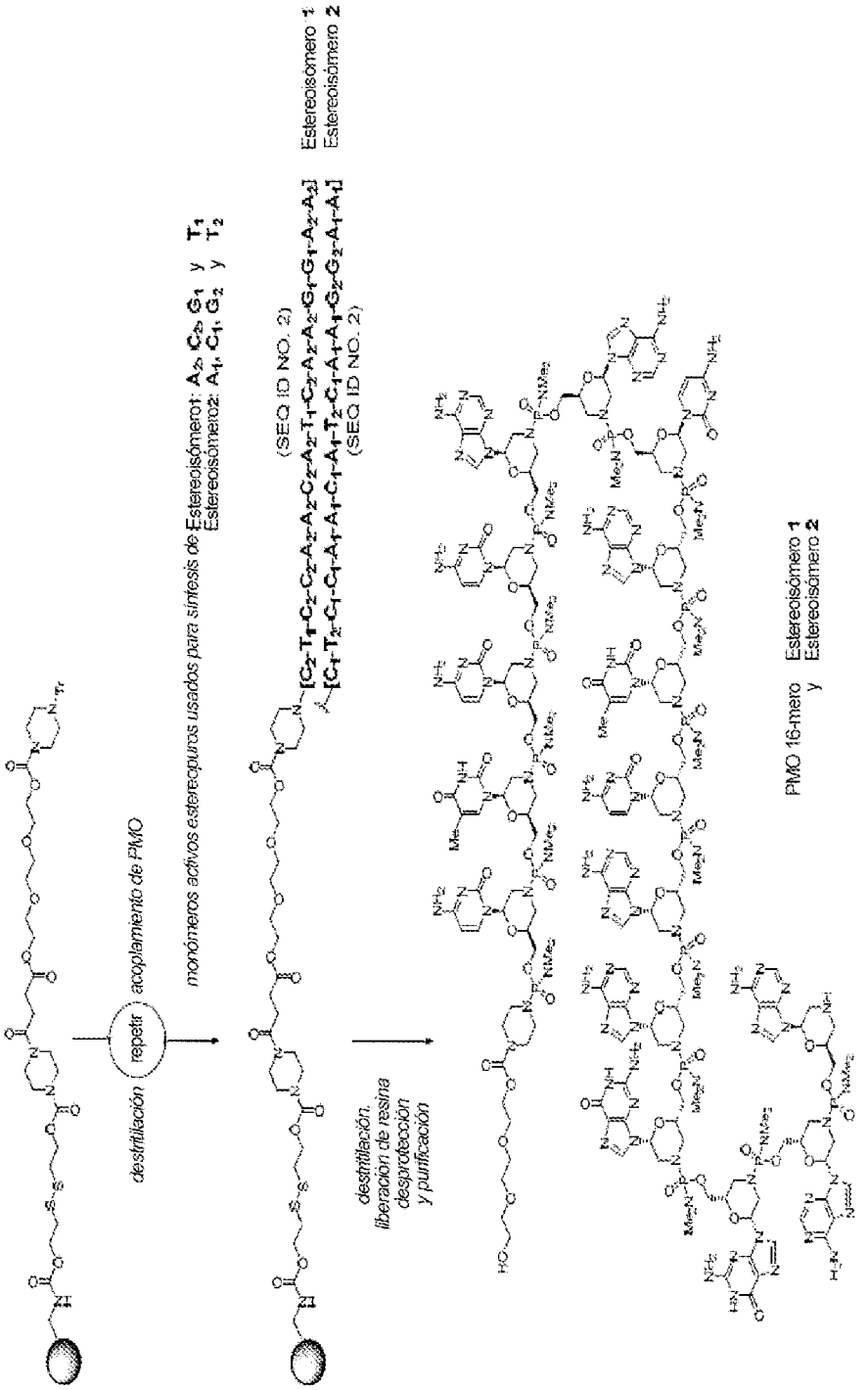

destritilación
repetir
acoplamiento de PMO
monómeros activos estereopuros usados para síntesis de Estereoisómero1: A2, C2, G1 y T1
Estereoisómero2: A1, C1, G2 y T2
(SEQ ID NO. 2)
[C2-T1-C2-C2-A2-C2-A2-T1-C2-A2-A2-G1-G1-A2-A2]
[C1-T2-C1-C1-A1-A1-C1-A1-T2-C1-A1-A1-G2-G2-A1-A1]
(SEQ ID NO. 2)
Estereoisómero 1
Estereoisómero 2
destritilación,
liberación de resina
desprotección
y purificación
PMO 16-mero
Estereoisómero 1
y
Estereoisómero 2

FIG. 7

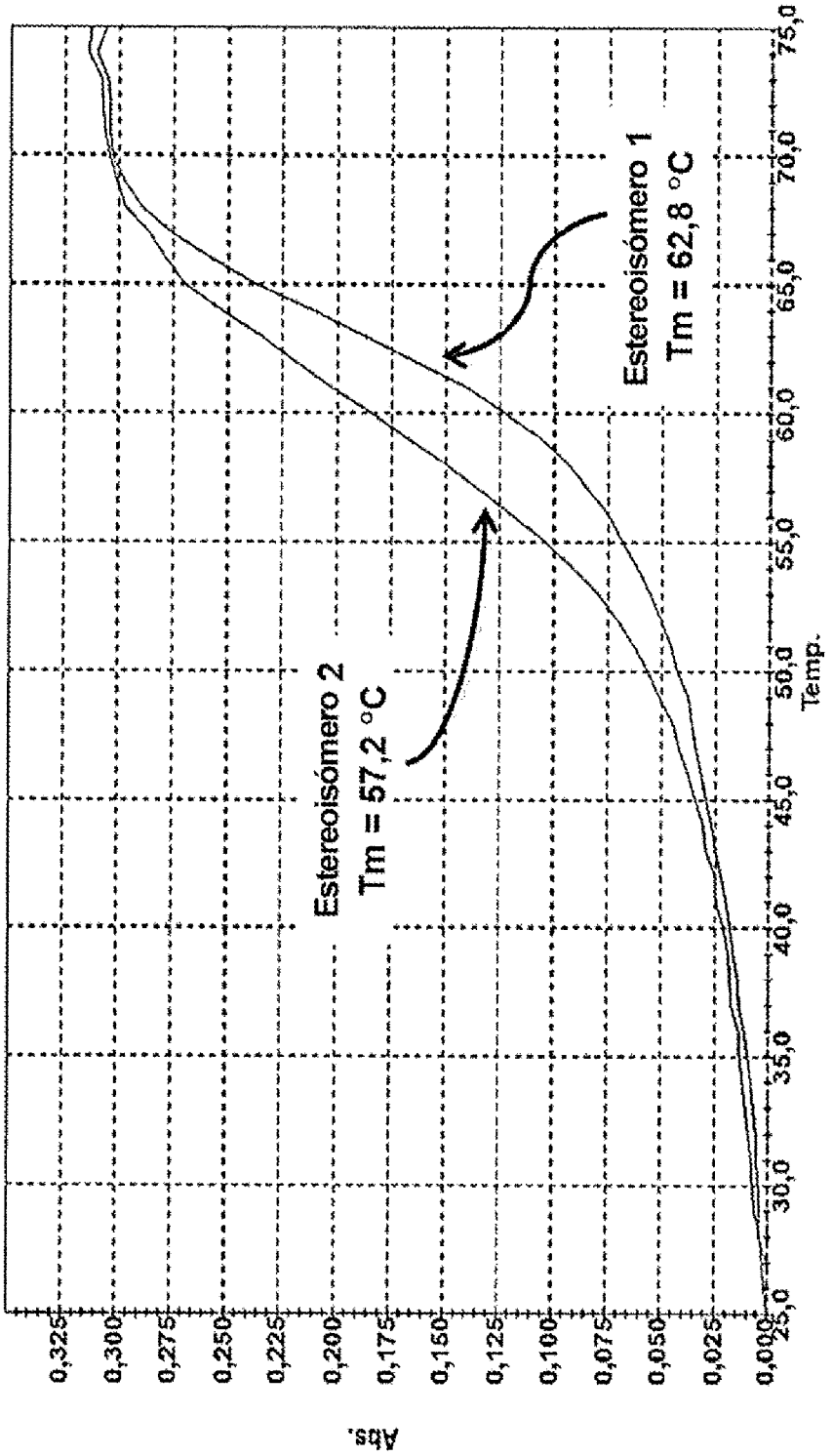

Estereoisómero 2
Tm = 57,2 °C
Estereoisómero 1
Tm = 62,8 °C
Abs.
Temp.
0,325
0,300
0,275
0,250
0,225
0,200
0,175
0,150
0,125
0,100
0,075
0,050
0,025
0,000
25,0
30,0
35,0
40,0
45,0
50,0
55,0
60,0
65,0
70,0
75,0

FIG. 8

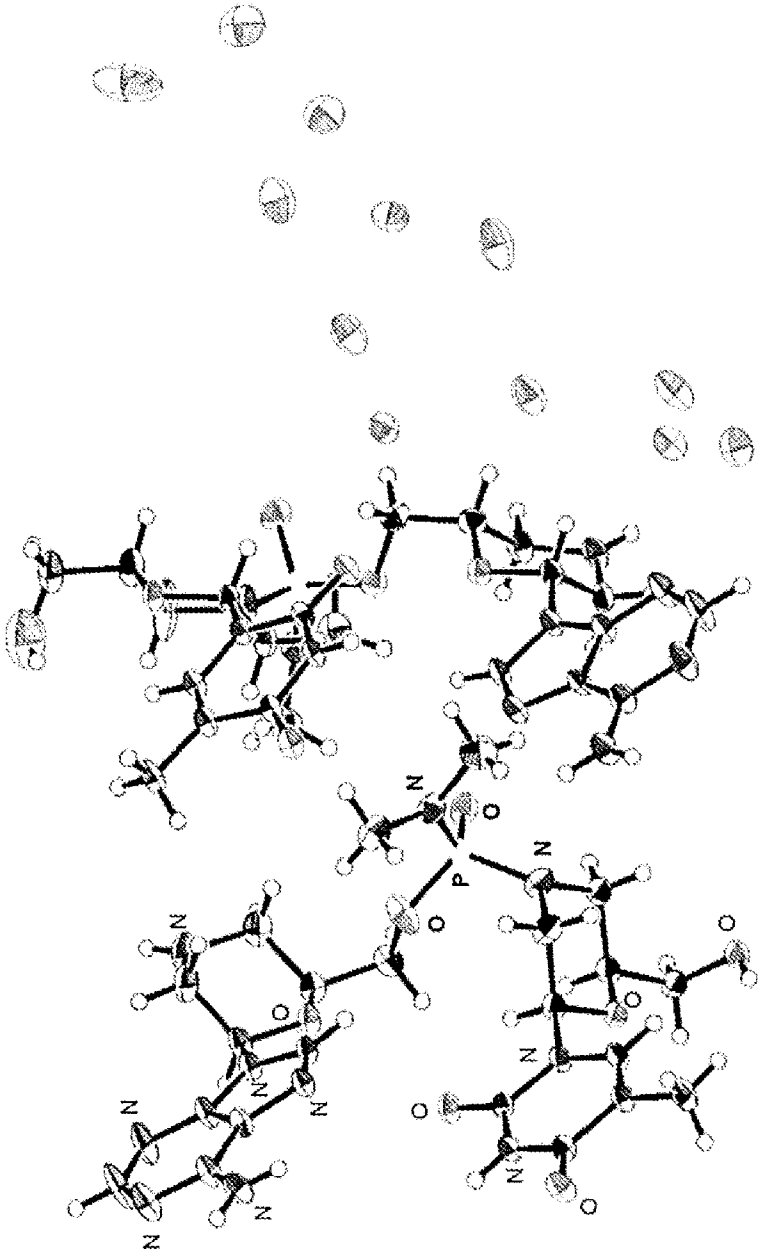


FIG. 9A

Fragmento 1

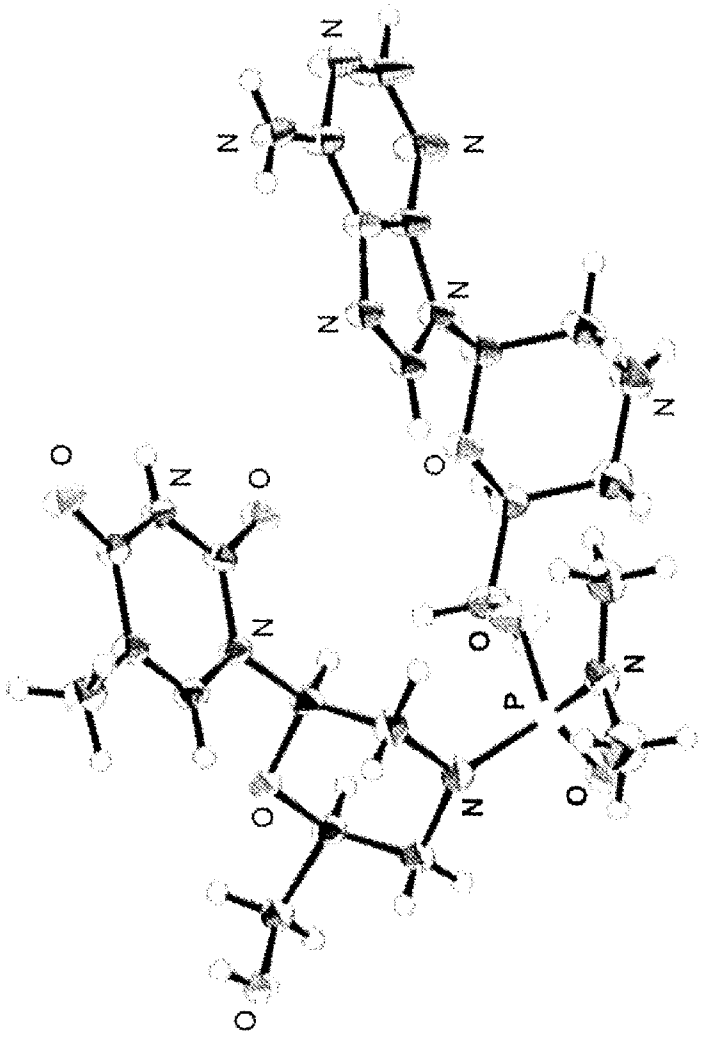


FIG. 9B

Fragmento 2

