



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 298**

51 Int. Cl.:  
**C07H 19/06** (2006.01)  
**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00925080 .4**  
86 Fecha de presentación : **04.05.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1178999**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2002**

54 Título: **Análogos de L-ribo-LNA.**

30 Prioridad: **04.05.1999 DK 1999 00603**  
**01.09.1999 DK 1999 01225**  
**11.01.2000 DK 2000 00032**

73 Titular/es: **Santaris Pharma A/S**  
**Boge Alle 3**  
**2970 Hørsholm, DK**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2007**

72 Inventor/es: **Wengel, Jesper**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2007**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 283 298 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

Análogos de L-ribo-LNA.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los análogos de nucleósidos bicíclicos configurados como L-ribo, y a la síntesis de tales análogos de nucleósidos, los cuales son útiles en la formación de oligonucleótidos sintéticos capaces de formar dúplexes de nucleobases específicas con ácidos nucleicos complementarios de hebra simple y doble hebra. La invención también se refiere al campo de los análogos de nucleósidos bicíclicos configurados como L-ribo, los cuales pueden usarse como drogas terapéuticas, y los cuales pueden incorporarse en oligonucleótidos.

**Antecedentes de la invención**

15 Los oligonucleótidos sintéticos son compuestos usados ampliamente en campos dispares tales como la biología molecular y los diagnósticos y terapias basados en el ADN.

*Consideraciones generales*

20 Para ser útiles en el amplio rango de diferentes aplicaciones esbozados más arriba, los oligonucleótidos deben satisfacer un número elevado de diferentes requisitos. Por ejemplo, como agentes terapéuticos, un oligonucleótido útil debe ser capaz de penetrar la membrana celular, tener una buena resistencia a las nucleasas extra- e intracelulares, y tener preferiblemente la capacidad de reclutar enzimas endógenos tales como la RNasa H. En el diagnóstico basado en ADN y en la biología molecular, son importantes otras propiedades, tales como, por ejemplo, la capacidad de los oligonucleótidos para actuar como sustratos eficientes para un amplio rango de diferentes enzimas desarrollados para actuar sobre ácidos nucleicos naturales, tales como, por ejemplo, las polimerasas, las quinasas, las ligasas y las fosfatasas. No obstante, la propiedad fundamental de los oligonucleótidos, la cual subyace todos los usos, es su capacidad para reconocer e hibridarse, de forma específica para la secuencia, con ácidos nucleicos de hebra simple complementarios, empleando el enlace de hidrógeno de Watson-Crick (A-T y G-C), u otros esquemas de enlaces de hidrógeno tales como el modo de Hoogsteen. Hay dos términos importante, afinidad y especificidad, usados comúnmente para caracterizar las propiedades de hibridación de un oligonucleótido determinado. La afinidad es una medida de la fuerza de unión del oligonucleótido a su secuencia diana complementaria (expresada como la termoestabilidad ( $T_m$ ) del dúplex). Cada par de nucleobases en el dúplex contribuye a la termoestabilidad y, por tanto, la afinidad incrementa con el mayor tamaño (número de nucleobases) del oligonucleotido. La especificidad es una medida de la capacidad del oligonucleótido para discriminar entre una secuencia diana completamente complementaria y una mal emparejada. En otras palabras, la especificidad es una medida de la pérdida de afinidad asociada con los pares de nucleobases mal emparejados en la diana.

40 Para un tamaño de oligonucleótido constante, la especificidad aumenta con un número creciente de emparejamientos erróneos entre el oligonucleótido y su diana (es decir, el porcentaje de emparejamientos erróneos aumenta). A la inversa, la especificidad disminuye cuando se incrementa el tamaño del oligonucleótido con un número constante de emparejamientos erróneos (es decir, el porcentaje de emparejamientos erróneos disminuye). Dicho de otro modo, un incremento en la afinidad de un oligonucleótido ocurre a expensas de la especificidad, y viceversa.

45 Dada la escasez de oligonucleótidos naturales, son altamente deseables las nuevas estrategias para potenciar la especificidad y afinidad para las terapias y diagnósticos basados en ADN, y, en general, para las técnicas de biología molecular.

*Nucleósidos restringidos conformacionalmente*

50 Se sabe que los oligonucleótidos experimentar una transición conformacional en el curso de su hibridación con una secuencia diana, desde la estructura de hélice relativamente aleatoria del estado de hebra simple, hasta la estructura ordenada del estado dúplex.

55 Por tanto, la restricción conformacional se ha aplicado durante los últimos años a los oligonucleótidos en la búsqueda de análogos que exhibieran propiedades de hibridación mejoradas en comparación con los (2'-desoxi)oligonucleótidos no modificados. Por ejemplo, los nucleósidos biciclo [3.3.0] con un puente C-3',C-5'-etano adicional (M. Tarköy, M. Bolli, B. Schweizer y C. Leumann, *Helv. Chem. Acta*, 76:481 (1993); Tarköy y C. Leumann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 32:1432 (1993); M. Egli, P. Lubini, M. Dobler y C. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:5855 (1993); M. Tarköy, M. Bolli y C. Leumann, *Helv. Chem. Acta*, 77:716 (1994); M. Bolli y C. Leumann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 34:694 (1995); M. Bolli, P. Lubini y C. Leumann, *Helv. Chem. Acta*, 78:2077 (1995); J. C. Litten, C. Epple y C. Leumann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5:1231 (1995); J. C. Litten y C. Leumann, *Helv. Chem. Acta*, 79:1129 (1996); M. Bolli, J. C. Litten, R. Schültz y C. Leumann, *Chem. Biol.*, 3:197 (1996); M. Bolli, H. U. Trafelet y C. Leumann, *Nucleic Acids Res.*, 24:4660 (1996)), los nucleósidos bicarbociclo [3.1.0] con un puente C-1',C-6' - ó C-6',C-4'-metano adicional (K.-H. Altmann, R. Kesselring, E. Francotte y G. Rihs, *Tetrahedron Lett.*, 35:2331 (1994); K.-H. Altmann, R. Imwinkelried, R. Kesselring y G. Rihs, *Tetrahedron Lett.*, 35:7625 (1994); V. E., Marquez, M. A. Siddiqui, A. Ezzitouni, P. Russ, J. Wang, R. W. Wagner y M. D. Matteucci, *J. Med. Chem.*, 39:3739 (1996); A. Ezzitouni y V. E., Marquez, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 1073 (1997)), los nucleósidos biciclo [3.3.0] y [4.3.0] que contienen un anillo

C-2',C-3'-dioxalano adicional como un dímero con un nucleósido no modificado, en donde el anillo adicional es parte del enlace internucleosídico que reemplaza un enlace fosfodiéster natural (R. J. Jones, S. Swaminathan, J. F. Millagan, S. Wadwani, B. S. Froehler y M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:9816 (1993); J. Wang y M. D. Matteucci, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7:229 (1997)), los dímeros que contienen un nucleósido biciclo[3.1.0] con un puente C-2',C-3'-metano como parte de enlaces internucleosídeos del tipo amida- y sulfonamida (C. G. Yannopoulos, W. Q. Zhou, P. Nower, D. Peoch, Y. S. Sanghvi y G. Just, *Synlett*, 378 (1997)), los análogos de nucleósido biciclo[3.3.0] derivados con glucosa e incorporados en medio de un trímero a través de enlaces internucleosídeos de formoacetal (C. G. Yannopoulos, W. Q. Zhou, P. Nower, D. Peoch, Y. S. Sanghvi y G. Just, *Synlett*, 378 (1997)) y nucleosídeos bicíclicos [4.3.0]-y [3.3.0] con anillos de cinco y seis miembros conectados en C-2',C-3' (P. Nielsen, H. M. Pfundheller, J. Wengel, *Chem. Commun.*, 826 (1997); P. Nielsen, H. M. Pfundheller, J. Wengel, *XII International Roundtable: Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications*; La Jolla, California, 15-19 de septiembre, 1996; Póster PPI 43) se han sintetizado e incorporado en oligodesoxinucleótidos. Desafortunadamente, los oligonucleótidos que comprenden estos análogos forman, en la mayoría de los casos, dúplex menos estables con los ácidos nucleicos complementarios en comparación con los oligonucleótidos no modificados. En los casos en los que se observó una mejora moderada en la estabilidad del dúplex, está se refiere sólo a un ADN o un ARN diana, o se refiere a oligonucleótidos completa pero no parcialmente modificados, o viceversa.

Una valoración de la mayoría de los análogos descritos está adicionalmente complicada por la ausencia de datos sobre los análogos con nucleobases G, A y C, y a la ausencia de datos que indiquen la especificidad y modo de hibridación. En muchos casos, la síntesis de los análogos monoméricos descritos es muy compleja, mientras que en otros casos la síntesis de los oligonucleótidos completamente modificados es incompatible con la química estándar del fosforamidito ampliamente usada.

Recientemente, se han descrito oligómeros que comprenden Ácidos Nucleicos Bloqueados (Locked Nucleic Acids, LNA) (Nielsen, P., Pfundheller, H. M., Olsen, C. E. y Wengel, J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1:3423 (1997); Nielsen, P., Pfundheller, H. M., Wengel, J., *Chem. Commun.*, 9:825 (1997); Christensen, N. K., Petersen, M., Nielsen, P., Jacobsen, J. P. y Wengel, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 120:5458 (1998); Koshkin, A. A. y Wengel, J., *J. Org. Chem.*, 63:2778 (1998); Obika, S., Morio, K.-I., Hari, Y. e Imanishi, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 515 (1999)). De forma interesante, la incorporación de monómeros de LNA conteniendo un puente 2'-O,4'-C-metileno en una secuencia oligonucleotídica condujo a una mejora sin precedentes en la capacidad de hibridación del oligonucleótido modificado (Singh, S. K., Nielsen, P., Koshkin, A. A., Olsen, C. E. y Wengel, J., *Chem. Commun.*, 455 (1998); Koshkin, A. K., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., y Wengel, J., *Tetrahedron*, 54:3607 (1998); Koshkin, A. A. Rajwanshi, V. K., y Wengel, J., *Tetrahedron Lett.*, 39:4381 (1998); Singh, Sanjay K. y Wengel, J., *Chem. Commun.*, 1247 (1998); Kumar, R., Singh, S. K., Koshkin, A. A., Rajwanshi, V. K., Meldgaard, M., y Wengel, J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8:2219 (1998); Obika, S. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 38:8735 (1997); Obika, S. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 39:5401 (1998); Singh, S. K., Kumar, R., y Wengel, J., *J. Org. Chem.*, 63:6078 (1998); Koshkin, A. A., Nielsen, P., Meldgaard, M., Rajwanski, V. K., Singh, S. K., y Wengel, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 120:13252 (1998); Singh, S. K., Kumar, R., y Wengel, J., *J. Org. Chem.*, 63:10035 (1998)). Los oligonucleótidos que comprenden estos monómeros de LNA y el análogo 2'-tio-LNA correspondiente forman dúplex con ADN y ARN complementarios, con estabilidad térmicas no observadas previamente para oligonucleótidos modificados con nucleosídeos bi- o tricíclicos ( $\Delta T_m/\text{modificación} = +3$  a  $+11^\circ\text{C}$ ), y muestran una selectividad mejorada.

En una serie de artículos, Seela *et al.* han estudiado el xilo-ADN (Figura 1, Base = adenin-9-ilo, citosin-1-ilo, guanin-9-ilo o timin-1-ilo) comprendiendo uno o más monómeros de 2'-desoxi- $\beta$ -D-xilofuranosil nucleótido (Rosemeyer, H.; Seela, F., *Helv. Chem. Acta*, 74:748 (1991); Rosemeyer, H., Krecmerova, M., Seela, F., *Helv. Chem. Acta*, 74:2054 (1991); Seela, F., Wörner, Rosemeyer, H., *Helv. Chem. Acta*, 77:883 (1994); Seela, F., Heckel, M., Rosemeyer, H., *Helv. Chem. Acta*, 79:1451 (1996); Rosemeyer, H., Seela, F., *Nucleosides Nucleotides*, 14:1041 (1995); Schoeppe, A., Hinz, H.-J., Rosemeyer, H., Seela, F., *Eur. J. Biochem.*, 239:33 (1996)). Comparados con los correspondientes oligonucleótidos naturales de 2'-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosilo, el xilo-ADN generalmente presenta una estructura secundaria parecida a una imagen especular, una formación de dúplex entrópicamente favorable, una estabilidad incrementada hacia las exonucleasas, y, para los oligonucleótidos que comprenden un pequeño número de monómeros de 2'-desoxi- $\beta$ -D-xilofuranosilo, una afinidad térmica disminuida hacia el ADN complementario (Rosemeyer, H., Seela, F., *Helv. Chem. Acta*, 74:748 (1991); Rosemeyer, H., Krecmerova, M., Seela, F., *Helv. Chem. Acta*, 74:2054 (1991); Seela, F., Wörner, Rosemeyer, H., *Helv. Chem. Acta*, 77:883 (1994); Seela, F., Heckel, M., Rosemeyer, H., *Helv. Chem. Acta*, 79:1451 (1996)).

WO99/14226 describe los D-enantiómeros de análogos de oligonucleótidos y nucleosídeos bloqueados bi- y tricíclicos (LNA). También se describen los oligonucleótidos que comprenden estos elementos.

## 60 Descripción resumida de la invención

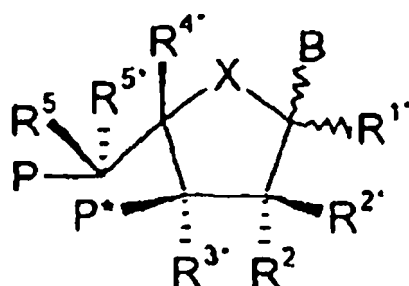
En base a lo anterior y a la destacada propiedad de los monómeros de LNA con puente 2'-O,4'-C-metileno, se decidió sintetizar oligonucleótidos que comprendieran uno o más monómeros de nucleótido de 2'-O,4'-C-metileno- $\alpha$ -L-ribofuranosilo. El modelado por ordenador de monómeros  $\alpha$ -L-ribo-LNA indica también una conformación del tipo S del anillo de furanosa. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue sintetizar monómero de nucleótido 2'-O,4'-C-metileno- $\alpha$ -L-ribofuranosilo, y estudiar la estabilidad térmica de oligonucleótidos que comprendieran este monómero. Los resultados muestran que el L-ribo-LNA modificado es útil para apuntar con elevada afinidad a ácidos nucleicos

## ES 2 283 298 T3

complementarios. Cuando se toma en consideración la estereoquímica invertida en C-3' y C-4', éste es un hecho sorprendente.

Por tanto, los presentes inventores han proporcionado ahora análogos de nucleósidos LNA novedosos (L-ribo-LNA) y oligonucleótidos que tienen incluidos en ellos análogos de nucleósidos L-ribo-LNA. Los análogos de nucleósido L-ribo-LNA se han sintetizado con timina como la nucleobase, pero pueden sintetizarse fácilmente con las otras cuatro nucleobases, proporcionando de ese modo un conjunto completo de análogos de nucleósido para su incorporación en oligonucleótidos.

La presente invención se refiere a oligómeros que comprenden al menos un análogo de nucleósido (a partir de ahora denominado "L-ribo-LNA") con la fórmula I general,



en donde X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R<sup>N\*</sup>)-, -C(R<sup>6</sup>R<sup>6\*</sup>)-;

B se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C<sub>1-4</sub>-alcoxilo opcionalmente sustituido, C<sub>1-4</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>1-4</sub>-aciloxilo opcionalmente sustituido, nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos;

P designa la posición radical para un enlace internucleósidos a un monómero sucesivo, o un grupo 5'-terminal, tal enlace internucleósidos o grupo 5'-terminal incluyendo opcionalmente el sustituyente R<sup>5</sup> o, de forma igualmente aplicable, el sustituyente R<sup>5\*</sup>;

P\* designa un enlace internucleósidos a un monómero precedente, o un grupo 3'-terminal;

R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> designan birradicales consistente en 1-4 grupos/átomos seleccionados de entre -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>a</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=N-, -O-, -Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-, -S-, -SO<sub>2</sub>-, -N(R<sup>a</sup>)-, y >C=Z,

en donde Z se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R<sup>a</sup>)-, y R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre el hidrógeno, C<sub>1-2</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alqueno opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquino opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxilo, C<sub>2-12</sub>-alquenoiloxilo, carboxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxycarbonilo, C<sub>1-12</sub>-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, C<sub>1-6</sub>-alquilsulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquitio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> juntos pueden designar una olefina de metileno (=CH<sub>2</sub>) opcionalmente sustituida.

cada uno de los sustituyentes R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5\*</sup>, R<sup>6</sup>, y R<sup>6\*</sup> que está presente se selecciona independientemente de entre el hidrógeno, C<sub>1-2</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alqueno opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquino opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxilo, C<sub>2-12</sub>-alquenoiloxilo, carboxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxycarbonilo, C<sub>1-12</sub>-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, C<sub>1-6</sub>-alquilsulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquitio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, tioxo, imino, u metileno opcionalmente sustituido, o juntos pueden formar un birradical spiro, consistente de una cadena de alqueno de 1-5 átomos de carbono, la cual está interrumpida opcionalmente y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR<sup>N</sup>)-, en donde R<sup>N</sup> se seleccionan de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo, y en donde dos sustituyente adyacente (no geminales) pueden designar un enlace adicional resultante en un doble enlace; y R<sup>N\*</sup>, cuando está presente, se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo;

y sus sales básicas y sales por adición de ácido.



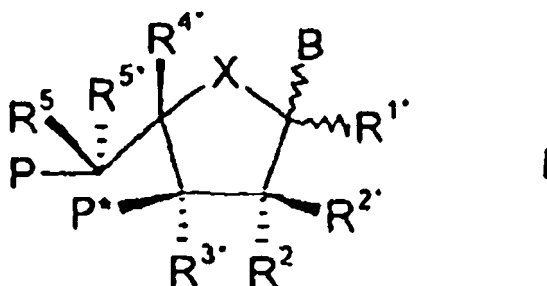
### Descripción detallada de la invención

Cuando se usa en la presente invención, el término “L-ribo-LNA” (“L-ribo-configured Locked Nucleoside Analogues”) se refiere a análogos bloqueados de nucleósido configurado como L-ribo, bien incorporados en el oligómero de la invención (fórmula general I), bien como especies químicas discretas (fórmula general II). El término “L-ribo-LNA monomérico” se refiere específicamente al último caso.

#### Oligómeros y análogos de nucleósidos

Tal y como se ha mencionado más arriba, la presente invención, entre otros, se refiere a oligómeros (oligonucleótidos) novedosos que comprenden uno o más análogos de nucleósidos bicíclicos configurados como L-ribo (a partir de ahora denominado “L-ribo-LNA”).

Cada uno de los L-ribo-LNA posibles incorporados en un oligómero (oligonucleótido) tiene la fórmula general I,



en donde X se selecciona de entre -O- (el motivo L-ribofuranosa), -S-, -N(R<sup>N\*</sup>)-, -C(R<sup>6</sup>R<sup>6\*</sup>)-, en donde R<sup>6</sup>, R<sup>6\*</sup>, y R<sup>N\*</sup> son como se define más adelante. Por tanto, los L-ribo-LNA incorporados en el oligómero comprenden un anillo de 5 miembros como una parte esencial de la estructura bicíclica.

Entre los posibles anillos de 5 miembros, las situaciones en las que X designa -O-, -S- y -N(R<sup>N\*</sup>)- parecen ser especialmente interesantes, y la situación en donde X es -O- parece ser particularmente interesante.

El sustituyente B puede designar un grupo que, cuando el oligómeros está complejado con ADN o ARN, es capaz de interactuar (por ejemplo, mediante puentes de hidrógeno, o enlaces covalentes, o interacción electrónica) con ADN o ARN, especialmente nucleobases del ADN o ARN. Alternativamente, el sustituyente B puede designar un grupo que actúa como una marca o un informador, o el sustituyente B puede designar un grupo (por ejemplo, hidrógeno), que se espera que tenga pocas o ningunas interacciones con el ADN o ARN. Por tanto, el sustituyente B se selecciona preferiblemente de entre hidrógeno, hidroxilo, C<sub>1-4</sub>-alcoxilo opcionalmente sustituido, C<sub>1-4</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>1-4</sub>-aciloxilo opcionalmente sustituido, nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos.

En el contexto actual, el término “nucleobase” abarca las nucleobases que existen de forma natural, así como las nucleobases que existen de forma no natural. Debería estar claro para el especialista en el campo que varias nucleobases que se habían considerado que “existían de forma no natural”, posteriormente se han hallado en la naturaleza. Por tanto, “nucleobase” incluye no sólo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también los análogos heterocíclicos y los tautómeros de los mismos. Son ejemplos ilustrativos de nucleobases, la adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N<sup>6</sup>-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-etanocitosina, N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C<sup>3</sup>-C<sup>6</sup>)-alquinilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoiso-citosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina, y las nucleobases que “existen de forma no natural” descritas en Benner *et al.*, Patente Estadounidense n° 5.432.272. Se pretende que el término “nucleobase” abarque la totalidad de estos ejemplos, así como los análogos y tautómeros de los mismos. La adenina, guanina, timina, citosina y uracilo son nucleobases especialmente interesantes, las cuales se consideraran como las nucleobases que existen de forma natural en relación a la aplicación terapéutica y de diagnóstico en humanos.

Cuando se usa en la presente invención, el término “intercalador del ADN” significa un grupo que puede intercalarse en la hélice, dúplex o tríplex, del ADN o ARN. Son ejemplos de partes funcionales de intercaladores del ADN: las acridinas, el antraceno, las quinonas tales como la antraquinona, el indol, la quinolina, la isoquinolina, las dihidroquinonas, las antraciclina, la tetraciclina, el azul de metileno, la antraciclina, los psoralenos, las coumarinas, los haluros de etidio, la dinemicina, los complejos de metales tales como el 1,10-fenantrolina-cobre, las tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio-cobalto-enedinas tales como la calcheamicina, las porfirinas, la distamicina, la nectropina, el viologen, la daunomicina. Son ejemplos especialmente interesantes las acridinas, las quinonas tales como la antraquinona, el azul de metileno, los psoralenos, las coumarinas, y los haluros de etidio.

En el contexto actual, el término “grupos fotoquímicamente activos” abarca compuestos que son capaces de experimentar reacciones químicas a partir de su irradiación con luz. Son ejemplos ilustrativos de grupos funcionales del presente grupo, las quinonas, especialmente la 6-metil-1,4-naftoquinona, la antraquinona, la naftoquinona, y la 1,4-dimetil-antraquinona, las diazirinas, las azidas aromáticas, las benzofenonas, los psoralenos, los compuestos diazo, y los compuestos diazirino.

En el contexto actual, el término “grupos termoquímicamente activos” se define como un grupo funcional que es capaz de experimentar la formación inducida termoquímicamente de enlace covalente con otros grupos. Son ejemplos ilustrativos de parte funcionales de grupos termoquímicamente reactivos: los ácidos carboxílicos, los ésteres de ácidos carboxílicos tales como los ésteres activados, los haluros de ácidos carboxílicos tales como los fluoruros de ácido, los cloruros de ácido, los bromuros de ácido, y los yoduros de ácido, las azidas del ácido carboxílico, las hidrazidas del ácido carboxílico, los ácidos sulfónicos, los ésteres de ácidos sulfónicos, los haluros de ácidos sulfónicos, las semicarbazidas, las tiosemicarbazidas, los aldehídos, las cetonas, los alcoholes primarios, los alcoholes secundarios, los alcoholes terciarios, los fenoles, los haluros de alquilo, los tioles, los disulfuros, las aminas primarias, las aminas secundarias, las aminas terciarias, las hidrazinas, los epóxidos, las maleimidias, y los derivados del ácido borónico.

En el contexto actual, el término “grupo quelante” significa una molécula que comprende más de un sitio de unión, y que frecuentemente se une a otra molécula, átomo o ion a través de más de un sitio de unión a la vez. Son ejemplos de partes funcionales de grupos quelantes: el ácido iminodiacético, el ácido nitrilotriacético, el ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), el ácido aminofosfónico, etc.

En el contexto actual, el término “grupo indicador” significa un grupo que es detectable, bien por sí mismo o como parte de una serie de detección. Son ejemplos de partes funcionales de grupos indicadores: la biotina, la digoxigenina, los grupos fluorescentes (grupos que son capaces de absorber radiación electromagnética, por ejemplo, luz o rayos X, de una cierta longitud de onda, y que posteriormente remiten la energía absorbida como radiación de mayor longitud de onda; son ejemplos ilustrativos el dansilo (5-dimetilamino)-1-naftalensulfonilo), DOXYL (N-oxil-4,4-dimetiloxazolidina), PROXYL (N-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina), TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), dinitrofenilo, acridinas, coumarinas, Cy3 y Cy5 (marcas registradas por Biological Detection Systems, Inc.), eritrosina, ácido coumárico, umbeliferona, Rojo de Texas, rodamina, tetrametil rodamina, Rox, 7-nitrobenzo-2-oxa-1-diazol (NBD), pireno, fluoresceína, europio, rutenio, samario, y otros metales térreos raros), marcas radioisotópicas, marcas quimioluminiscentes (marcas que son detectables a través de la emisión de luz durante una reacción química), marcas de espín (un radical libre (por ejemplo, nitróxidos orgánicos sustituidos) u otras sondas paramagnéticas (por ejemplo,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) unidas a una molécula biológica, que son detectables mediante el uso de la espectroscopia de resonancia de espín electrónico), enzimas (tales como las peroxidases, las fosfatasas alcalinas, las  $\beta$ -galactosidasas, y las oxidasas de glucosa), los antígenos, los anticuerpos, los haptenos (grupos que son capaces de combinarse con un anticuerpo, pero que no pueden iniciar una respuesta inmune por sí mismos, tales como péptidos y hormonas esteroideas), sistemas portadores para la penetración de la membrana celular, tales como: los residuos de ácido graso, las porciones esteroideas (colesterol), la vitamina A, la vitamina D, la vitamina E, el ácido fólico, los péptidos para receptores específicos, los grupos para mediar la endocitosis, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la bradiquinina, y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Son ejemplos especialmente interesantes la biotina, la fluoresceína, el Rojo de Texas, la rodamina, el dinitrofenilo, la digoxigenina, el rutenio, el europio, el Cy5 y el Cy3.

En el contexto presente, “ligando” significa algo que se une. Los ligandos pueden comprender grupos funcionales tales como: grupos aromáticos (tales como benceno, piridina, naftaleno, antraceno y fenantreno), grupos heteroaromáticos (tales como tiofeno, furano, tetrahidrofurano, piridina, dioxano y pirimidina), ácidos carboxílicos, ésteres de ácidos carboxílicos, haluros de ácidos carboxílicos, azidas de ácidos carboxílicos, hidrazidas de ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ésteres de ácidos sulfónicos, haluros de ácidos sulfónicos, semicarbazidas, tiosemicarbazidas, aldehídos, cetonas, alcoholes primarios, alcoholes secundarios, alcoholes terciarios, fenoles, haluros de alquilo, tioles, disulfuros, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas, epóxidos, maleimidias, grupos alquilos  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{20}$  opcionalmente interrumpidos o terminados con uno o más heteroátomos tales como átomos de oxígeno, átomos de nitrógeno, y/o átomos de azufre, comprendiendo opcionalmente hidrocarburos aromáticos o mono/poliinsaturados, polioxiétilenos tales como el polietilenglicol, oligo/poliamidas tales como la poli- $\beta$ -alanina, poliglicina, polilisina, péptidos, oligo/polisacáridos, oligo/polifosfatos, toxinas, antibióticos, venenos celulares, y esteroides, y también “ligandos por afinidad”, es decir, grupos funcionales o biomoléculas que tienen una afinidad específica por sitios sobre determinadas proteínas, anticuerpos, poli- y oligosacáridos, y otras biomoléculas.

Será evidente para el especialista capacitado en el campo que los ejemplos específicos mencionados mas arriba bajo intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, corresponden a la parte “activa/funcional” de los grupos en cuestión. Para el especialista en la técnica, es evidente además que los intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, se encuentran típicamente representados en la forma M-K-, en donde M es la parte “activa/funcional” del grupo en cuestión, y en donde K es un espaciador a través del cual la parte “activa/funcional” está unida al anillo de 5 miembros. Por tanto, debería sobrentenderse que el grupo B, en el caso en el que B se selecciona de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, tiene la forma M-K-, en donde M es respectivamente la parte “activa/funcional” del intercalador del ADN, grupo fotoquímicamente activo, grupo termoquímicamente activo, grupo quelante, grupo indicador, y ligando, y en donde K es un espaciador opcional que

## ES 2 283 298 T3

comprende 1-50 átomos, preferiblemente 1-30 átomos, en particular 1-15 átomos, entre el anillo de 5 miembros y la parte “activa/funcional”.

En el contexto presente, el término “espaciador” significa un grupo distanciador termoquímica y fotoquímicamente no activo, y se usa para unir dos o más porciones diferentes de los tipos definidos más arriba. Los espaciadores se seleccionan en base a una variedad de características, incluyendo su hidrofobicidad, hidrofiliidad, flexibilidad y longitud molecular (por ejemplo, ver Hermanson *et. al.*, “Immobilized Affinity Ligand Techniques”, Academic Press, San Diego, California (1992), p. 137 y siguientes). Generalmente, la longitud de los espaciadores es inferior o aproximadamente de 400 Å, en algunas aplicaciones es preferiblemente inferior a 100 Å. Por tanto, el espaciador comprende una cadena de átomos de carbono, opcionalmente interrumpida o terminado con uno o más heteroátomos, tales como átomos de oxígeno, átomos de nitrógeno, y/o átomos de azufre. Por tanto, el espaciador K puede comprender una o más funcionalidades amida, éster, amino, éter, y/o tioéter, y opcionalmente hidrocarburos aromáticos o mono/poliinsaturados, polioxieleno tal como polietilenglicol, oligo/poliamidas tales como poli-β-alanina, poliglicina, polilisina, y péptidos en general, oligosacáridos, oligo/polifosfatos. Además, el espaciador puede consistir en unidades combinadas del mismo. La longitud del espaciador puede variar, tomando en consideración la ubicación y orientación espacial, necesaria o deseada, de la parte “activa/funcional” del grupo en cuestión, en relación con el anillo de 5 miembros. En realizaciones particularmente interesantes, el espaciador incluye un grupo químicamente separable. Los ejemplos de tales grupos químicamente separables incluyen los grupos disulfuro, separables en condiciones reductoras, los fragmentos peptídicos separables mediante peptidasas, y demás.

En una realización de la presente invención, K designa un único enlace, de forma que la parte “activa/funcional” del grupo en cuestión está unida directamente al anillo de 5 miembros.

En una realización preferida, el sustituyente B en las Fórmulas generales I y II se selecciona preferiblemente de entre nucleobases, en particular, de entre adenina, guanina, timina, citosina y uracilo.

En los oligómeros de la presente invención (Fórmula I), P designa la posición radical de un enlace internucleósido a un monómero sucesivo, o un grupo 5'-terminal. La primera posibilidad se aplica cuando el L-ribo-LNA en cuestión no es el “monómero” 5'-terminal, mientras que la última posibilidad se aplica cuando el L-ribo-LNA en cuestión es el “monómero” 5'-terminal. Debería sobrentenderse (lo cual debería estar claro también a partir de la definición de enlace internucleósido y grupo 5'-terminal de más adelante) que tal enlace internucleósido o grupo 5'-terminal puede incluir el sustituyente R<sup>5</sup> (o, igualmente aplicable: el sustituyente R<sup>5\*</sup>), formando de ese modo un doble enlace con el grupo P. (5'-terminal se refiere a la posición correspondiente al átomo de carbono 5' de una porción ribosa en un nucleósido).

Por otra parte, P\* designa la posición radical de un enlace internucleósido a un monómero precedente, o a un grupo 3'-terminal. De forma análoga, la primera posibilidad se aplica cuando el L-ribo-LNA en cuestión no es el “monómero” 3'-terminal, mientras que la última posibilidad se aplica cuando el L-ribo-LNA en cuestión es el “monómero” 3'-terminal (3'-terminal se refiere a la posición correspondiente al átomo de carbono 3' de una porción ribosa en un nucleósido).

En el contexto actual, el término “monómero” se refiere a los nucleósidos que existen de forma natural, a los nucleósidos que existen de forma no natural, a los PNA, los LNA, y demás, así como a los L-ribo-LNA. Por tanto, el término “monómero sucesivo” se refiere al monómero vecino en la dirección 5'-terminal, y el “monómero precedente” se refiere al monómero vecino en la dirección 3'-terminal. Tales monómeros sucesivo y precedente, vistos de la posición de un monómero de L-ribo-LNA, pueden ser nucleósidos que existen de forma natural o nucleósidos que existen de forma no natural, o incluso monómeros de L-ribo-LNA.

En consecuencia, en el contexto presente (tal y como puede derivarse de las definiciones anteriores), el término “oligómero” significa un oligonucleótido modificado mediante la incorporación de uno o más L-ribo-LNA.

La parte crucial de la presente invención es la configuración como L-ribo del anillo de 5 miembros, combinado con la condición de que R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> juntos designan un birradical que forma un anillo fusionado sobre el anillo de 5 miembros.

En los grupos que constituyen los birradicales, Z se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R<sup>a</sup>)-, y R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre el hidrógeno, C<sub>1-2</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alqueno opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquino opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxilo, C<sub>2-12</sub>-alquenoiloxilo, carboxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxycarbonilo, C<sub>1-12</sub>-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, C<sub>1-6</sub>-alquilsulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquitio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, (en donde los últimos grupos pueden incluir un espaciador tal y como se ha definido para el sustituyente B), en donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos. Además, dos dos sustituyentes geminales R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> juntos pueden designar una olefina de metileno (=CH<sub>2</sub>), opcionalmente sustituida con uno o dos sustituyentes, tal y como se definieron como sustituyentes opcionales para arilo).

## ES 2 283 298 T3

En el contexto actual, es decir, en la presente descripción y reivindicaciones, la orientación de los birradicales es tal que el lado izquierdo representa el sustituyente con el número más bajo, y el lado derecho representa el sustituyente con el número más elevado, por tanto, cuando  $R^{2*}$  y  $R^{4*}$  designan juntos un birradical “-O-CH<sub>2</sub>-”, se entenderá que el átomo de oxígeno representa  $R^*$ , por tanto, el átomos de oxígeno está unido, por ejemplo, a la posición  $R^{2*}$ , y el grupo metileno representa  $R^{4*}$ .

Considerando las posibilidades interesantes para la estructura del birradical o birradicales en el o los L-ribo-LNA incorporados en los oligómeros de la presente invención, se cree que el o los birradicales constituidos por pares de sustituyente no geminales se seleccionan preferiblemente de entre  $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$ ,  $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-Y-$ ,  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$ ,  $-Y-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$ ,  $-(CR^*R^*)_{r+s}$ ,  $-Y-$ ,  $-Y-Y-$ , en donde cada Y se selecciona independientemente de entre -O-, -S-, -Si(R<sup>\*</sup>)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>\*</sup>)-, >C=O, -C(=O)-N(R<sup>\*</sup>)-, y -N(R<sup>\*</sup>)-C(=O)-, cada R<sup>\*</sup> se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di(C<sub>1-6</sub>-alquil) amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, y/o dos R<sup>\*</sup> adyacentes (no geminales) pueden juntos designar un doble enlace, y cada uno de r y s es 0-4, a condición de que la suma r+1 sea 1-4; Son situaciones particularmente interesantes aquellas en donde cada birradical se selecciona independientemente de entre -Y-,  $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ ,  $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$ , y  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$ , en donde cada uno de r y s es 0-3, a condición de que la suma r+1 sea 1-4.

Son oligómeros particularmente interesantes aquellos en donde se cumplen los siguientes criterios: y  $R^{2*}$  y  $R^{4*}$  juntos designan un birradical seleccionado de entre -O-, -S-, -N(R<sup>\*</sup>)-,  $-(CR^*R^*)_{r+s+1}-$ ,  $-(CR^*R^*)_r-O-(CR^*R^*)_s-$ ,  $-(CR^*R^*)_r-S-(CR^*R^*)_s-$ ,  $-(CR^*R^*)_r-N(R^*)-(CR^*R^*)_s-$ ,  $-O-(CR^*R^*)_{r+s}-O-$ ,  $-S-(CR^*R^*)_{r+s}-O-$ ,  $-O-(CR^*R^*)_{r+s}-S-$ ,  $-N(R^*)-(CR^*R^*)_{r+s}-O-$ ,  $-O-(CR^*R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ ,  $-S-(CR^*R^*)_{r+s}-S-$ ,  $-N(R^*)-(CR^*R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ ,  $-N(R^*)-(CR^*R^*)_{r+s}-S-$ , y  $-S-(CR^*R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ ; en donde cada uno de r y s es 0-3, a condición de que la suma r+1 sea 1-4, y en donde R se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, y cualesquier sustituyentes R<sup>\*</sup> restantes son hidrógeno.

En una realización preferida, un grupo R<sup>\*</sup> en el birradical de al menos un LNA se selecciona de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos (en donde los últimos grupos pueden incluir un espaciador tal como el definido para el sustituyente B).

En otra realización preferida, un grupo R<sup>\*</sup> en el birradical de al menos un LNA se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, y cualesquier sustituyentes R<sup>\*</sup> restantes son hidrógeno.

Con referencia a los sustituyentes  $R^{1*}$ ,  $R^2$ ,  $R^{3*}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5*}$ ,  $R^6$ , y  $R^{6*}$  presentes, se seleccionan independientemente de entre el hidrógeno, C<sub>1-2</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquenilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxilo, C<sub>2-12</sub>-alqueniloxilo, carboxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxycarbonilo, C<sub>1-12</sub>-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino-C<sub>1-6</sub>-alquil-aminocarbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, C<sub>1-6</sub>-alquilsulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquitio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos (en donde los últimos grupos pueden incluir un espaciador tal y como se ha definido para el sustituyente B), en donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, tioxo, imino, u metileno opcionalmente sustituido, o juntos pueden formar un birradical spiro, consistente de una cadena de alquileo de 1-5 átomos de carbono, la cual está opcionalmente interrumpida y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR<sup>N</sup>)-, en donde R<sup>N</sup> se seleccionan de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo, y en donde dos sustituyente adyacente (no geminales) pueden designar un enlace adicional resultante en un doble enlace; y R<sup>N\*</sup>, cuando está presente, se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo.

Preferiblemente, cada uno de los sustituyentes  $R^{1*}$ ,  $R^2$ ,  $R^{3*}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5*}$ ,  $R^6$ , y  $R^{6*}$  del L-ribo-LNA, que está presente, se selecciona independientemente de entre hidrógeno, C<sub>1-6</sub>-alquilo, C<sub>2-6</sub>-alquenilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-6</sub>-alcoxilo, C<sub>2-6</sub>-alqueniloxilo, carboxilo, C<sub>1-6</sub>-alcoxycarbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilo, formilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, azido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquitio, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, y en donde R<sup>N\*</sup>, cuando está presente, se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo.

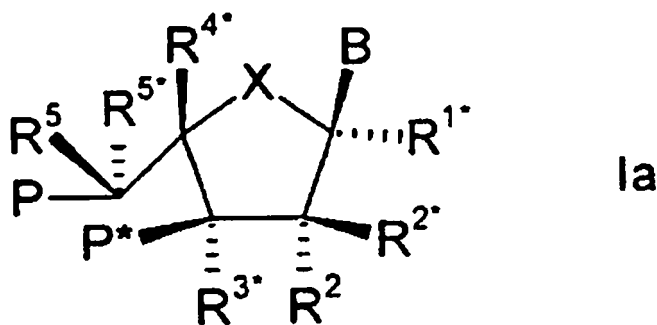
En una realización preferida de la presente invención, X se selecciona de entre -O-, -S-, y -NRN<sup>\*</sup>-, en particular de -O-, y cada uno de los sustituyentes  $R^{1*}$ ,  $R^2$ ,  $R^{3*}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5*}$ ,  $R^6$ , y  $R^{6*}$  del L-ribo-LNA, que están presentes, designa un hidrógeno.

## ES 2 283 298 T3

En una realización aún más preferida de la presente invención, X es O, los R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup>, y R<sup>5\*</sup> designan un hidrógeno, y R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> de un L-ribo-LNA incorporado en un oligómero designan juntos un birradical, seleccionado de entre -O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-N(R<sup>N</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, y -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-, en particular de entre -O-CH<sub>2</sub>-, -S-CH<sub>2</sub>- y -NRH-CH<sub>2</sub>-. Generalmente, con el debida consideración a los resultados obtenidos hasta la fecha, se prefiere que el birradical que constituye R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> forme un puente de dos átomos, es decir, el birradical forma un anillo de cinco miembros con el anillo de furanosa (X=O).

En una realización de la presente invención, el birradical es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-.

Para estas interesantes realizaciones, se prefiere que los L-ribo-LNA tengan la Fórmula general Ia siguiente,



Es también interesante, como un aspecto distinto de la presente invención, la variante de la Fórmula Ia en donde B está en la “configuración b”.

Los oligómeros de la invención típicamente comprenden 1-10000 L-ribo-LNA de la Fórmula general Ia (de la más detallada Fórmula general Ia), y 0-10000 nucleósidos seleccionados de entre nucleósidos que existen de forma natural y análogos de nucleósidos. La suma del número de nucleósidos y el número de L-ribo-LNA (n) es al menos 2, preferiblemente al menos 3, en particular al menos 5, especialmente al menos 7, tal como en el rango 2-15000, preferiblemente en el rango 2-100, tal como 3-100, en particular en el rango 2-50, tal como 3-50 ó 5-50 ó 7-50.

Se ha hallado que los oligómeros parcialmente modificados con L-ribo-LNA se hibridan con fuerza (con afinidad incrementada) al ADN y ARN. Se cree actualmente que los oligómeros completamente modificados con L-ribo-LNA, y los oligómeros consistentes de monómeros de L-ribo-LNA junto con otros análogos de nucleótidos configurados como L-ribo, darán lugar a propiedades de hibridación comparables.

En el contexto actual, el término “nucleósido” significa un glicósido de una base heterocíclica. El término “nucleósido” se usa ampliamente con la finalidad de incluir los nucleósidos que existen de forma no natural, los nucleósidos que ocurren de forma natural, así como otros análogos de nucleósido.

Son ejemplos ilustrativos de nucleósidos los ribonucleósidos que comprenden una porción ribosa, así como los desoxirribonucleósidos que comprenden una porción desoxirribosa. En relación a las bases de tales nucleósidos, debería sobrentenderse que éstas pueden ser cualquiera de las bases que existen de forma natural, por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina y uracilo, así como cualesquiera variantes modificadas de las mismas o cualesquiera bases no naturales.

Cuando se consideran las definiciones y los nucleósidos conocidos (que ocurren de forma natural o de forma no natural) y los análogos de nucleósidos (incluyendo los análogos bi- y tricíclicos conocidos), es evidente que un oligómero puede comprender uno o más L-ribo-LNA (los cuales pueden ser idénticos o diferentes, tanto con respecto a la selección de sustituyente, como con respecto a la selección del birradical), y uno o más análogos de nucleósidos y/o nucleósido. En el presente contexto, “oligonucleótido” significa una cadena sucesiva de nucleósidos conectados a través de enlaces internucleósidos, sin embargo, debe sobrentenderse que una nucleobase en una o más unidades nucleotídicas (monómeros) en un oligómero (oligonucleótido) puede haberse modificado con un sustituyente B tal y como se definió más arriba.

Los oligómeros pueden ser lineales, ramificados o cíclicos. En el caso de un oligómero ramificado, los puntos de ramificación pueden estar ubicados en un nucleósido, en un enlace internucleósidos, o, en una realización fascinante, en un L-ribo-LNA. Se cree que en el último caso, los sustituyentes R<sup>2</sup> y R<sup>3\*</sup> pueden designar un grupo P\* que designa un enlace internucleósido a un monómero precedente, en particular, R<sup>2</sup> designa un P\* adicional.

Tal y como se ha mencionado más arriba, los L-ribo-LNA de un oligómero están conectados con otros monómeros a través de un enlace internucleósido. En el contexto presente, el término “enlace internucleósidos” significa un enlace consistente en 2 a 4, preferiblemente 3, grupos/átomos seleccionados de entre -CH<sub>2</sub>-, -O-, -S-, -NR<sup>H</sup>-,

## ES 2 283 298 T3

$>C=O$ ,  $>C=NR^H$ ,  $>C=S$ ,  $-\text{Si}(R'')_2-$ ,  $-\text{SO}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{P}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{PO}(\text{BH}_3)-$ ,  $-\text{P}(\text{O},\text{S})-$ ,  $-\text{P}(\text{S})_2-$ ,  $-\text{PO}(\text{R}'')$ ,  $-\text{PO}(\text{OCH}_3)-$ , y  $-\text{PO}(\text{NHR}^H)-$ , en donde  $R^H$  se selecciona de entre hidrógeno y  $C_{1-4}$ -alquilo, y  $R''$  se selecciona de entre  $C_{1-6}$ -alquilo y fenilo. Son ejemplos ilustrativos de tales enlaces internucleósidos:  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=($  incluyendo  $R^S$  cuando se usa como enlace a un monómero sucesivo),  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}^H-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{NR}^H-\text{CO}-\text{O}-$ ,  $-\text{NRH}-\text{CO}-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{NR}^H-\text{CS}-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{NR}^H-\text{C}(=\text{NRH})-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{NR}^H-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{NR}^H-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}=($  incluyendo  $R^S$  cuando se usa como enlace a un monómero sucesivo),  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{CONR}^H-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{CO}-$ ,  $-\text{O}-\text{NR}^H-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=($  incluyendo  $R^S$  cuando se usa como enlace a un monómero sucesivo),  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{SCH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{SO}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{NRH}-$ ,  $-\text{NRH}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}'')$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{OPO}(\text{OCH}_3)-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{R})-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{BH}_3)-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^N)-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{NR}^H-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{NR}^H)-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ , y  $-\text{O}-\text{Si}(R'')_2-\text{O}-$ ; entre los cuales son especialmente preferidos:  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^H-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}^H-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{NR}^H)-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}'')$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{CH}_3)-\text{O}-$ , y  $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^N)-\text{O}-$ , en donde  $R^H$  se selecciona de entre hidrógeno y  $C_{1-4}$ -alquilo, y  $R''$  se selecciona de entre  $C_{1-6}$ -alquilo y fenilo. Se proporcionan ejemplos ilustrativos adicionales en Mesmaeker *et. al.*, *Current Opinion in Structural Biology*, 5:343-355 (1995). El lado izquierdo del enlace internucleósido está unido al anillo de 5-miembros como sustituyente  $P^*$ , mientras que el lado derecho está unido a la posición 5' de un monómero precedente.

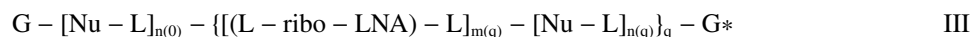
De lo anterior se deduce que el grupo P puede designar también un grupo 5'-terminal en el caso en que el L-ribo-LNA en cuestión es el monómero 5'-terminal. Son ejemplos de tales grupos 5'-terminales: el hidrógeno, hidroxilo,  $C_{1-6}$ -alquilo opcionalmente sustituido,  $C_{1-6}$ -alcoxilo opcionalmente sustituido,  $C_{1-6}$ -alquilcarboniloxilo opcionalmente sustituido, ariloxilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, y  $-\text{W}-\text{A}'$ , en donde W se selecciona de entre  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ , y  $-\text{N}(\text{R}^H)-$ , en donde  $R^H$  se selecciona de entre hidrógeno y  $C_{1-6}$ -alquilo, y en donde  $A'$  se selecciona de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos (en donde los últimos grupos pueden incluir un espaciador tal como el definido para el sustituyente B).

En la presente descripción y reivindicaciones, los términos "monofosfato", "difosfato", y "trifosfato" significan grupos respectivamente con las fórmulas:  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ , y  $-\text{OP}(\text{O})_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ .

En una realización particularmente interesante, el grupo P designa un grupo 5'-terminal seleccionado de entre monofosfato, difosfato y trifosfato. Es especialmente interesante como sustrato la variante trifosfato de la Fórmula II, tal como para enzimas, especialmente aquéllos activos sobre ácidos nucleicos.

Análogamente, el grupo  $P^*$  puede designar un grupo 3'-terminal en el caso en el que el L-ribo-LNA en cuestión es el monómero 3'-terminal. Son ejemplos de tales grupos 3'-terminales: el hidrógeno, hidroxilo,  $C_{1-6}$ -alcoxilo opcionalmente sustituido,  $C_{1-6}$ -alquilcarboniloxilo opcionalmente sustituido, ariloxilo opcionalmente sustituido, y  $-\text{W}-\text{A}'$ , en donde W se selecciona de entre  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ , y  $-\text{N}(\text{R}^H)-$ , en donde  $R^H$  se selecciona de entre hidrógeno y  $C_{1-6}$ -alquilo, y en donde  $A'$  se selecciona de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos (en donde los últimos grupos pueden incluir un espaciador tal como el definido para el sustituyente B).

En una realización preferida de la presente invención, el oligómero tiene la siguiente Fórmula III:



en donde,

q es 1-50;

cada uno de  $n(0)$ , ...,  $n(q)$  es independientemente 0-10000;

cada uno de  $m(1)$ , ...,  $m(q)$  es independientemente 1-10000;

a condición de que la suma de  $n(0)$ , ...,  $n(q)$  y  $m(1)$ , ...,  $m(q)$  sea 2-15000;

G designa un grupo 5'-terminal;

cada Nu designa independientemente un nucleósido seleccionado a partir de nucleósidos de existen de forma natural y análogos de nucleósidos;

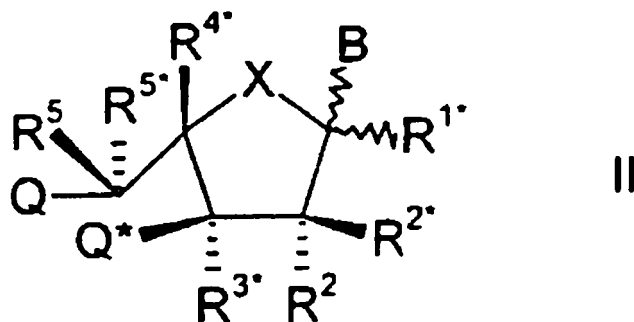
cada L-ribo-LNA designa independientemente un análogo de nucleósido;

cada L designa independientemente un enlace internucleósido entre dos grupos seleccionados de entre Nu y L-ribo-LNA, o L junto con G<sup>\*</sup> designan un grupo 3'-terminal; y cada (L-ribo-LNA)-L designa independientemente un análogo de nucleósido con la Fórmula general I definida más arriba, o, preferiblemente, con la Fórmula Ia tal y como se definió más arriba.

En esta realización, así como de forma general, la presente invención proporciona la fascinante posibilidad de incluir L-ribo-LNA con diferentes nucleobases, en particular, con nucleobases seleccionadas de entre timina, citosina y uracilo, y nucleobases seleccionadas de entre adenina y guanina. El oligómero puede comprender, en una realización, al menos un L-ribo-LNA en donde B (en la Fórmula I ó Ia) se selecciona de entre el grupo que comprende adenina y guanina, y al menos un L-ribo-LNA en donde B se selecciona de entre el grupo que comprende timina, citosina y uracilo.

Aparte de los oligómeros definidos más arriba, la presente invención también proporciona L-ribo-LNA monoméricos útiles, por ejemplo, en la preparación de oligómeros, como sustratos para, por ejemplo, polimerasas de ácido nucleico, quinasas de polinucleótidos, transferasas terminales, y como agentes terapéuticos, ver más adelante. Los L-ribo-LNA monoméricos corresponden en la estructura conjunta (especialmente en cuanto a los posibles birradicales) a los L-ribo-LNA definidos como constituyentes en los oligómeros, sin embargo, en relación a los grupos P y P', los L-ribo-LNA monoméricos difieren ligeramente, tal y como se explicará. Además, los L-ribo-LNA monoméricos pueden comprender grupos protectores del grupo funcional, especialmente en los casos en los que los L-ribo-LNA monoméricos deben incorporarse en los oligómeros mediante síntesis química.

La invención se refiere además a nucleósidos L-ribo-LNA monoméricos (L-ribo-LNA) con la Fórmula general II:



en donde el sustituyente B se selecciona de entre nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos; X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R<sup>N\*</sup>)-, y -C(R6R6\*)-, preferiblemente de entre -O-, -S-, y -N(R<sup>N\*</sup>)-;

cada uno de Q y Q\* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, amino, Prot-N(R<sup>H</sup>)-, Act-N(R<sup>H</sup>)-, mono- ó di(C<sub>1-6</sub>-alquil) amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquenilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alqueniloxi opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquinilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquiniloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH<sub>2</sub>-, Act-O-CH<sub>2</sub>-, aminometilo, Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo protector respectivamente para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), Act es un grupo de activación respectivamente para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-6</sub>-alquilo;

R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> juntos designan un birradical seleccionado de entre -O-, -S-, -N(R\*)-, -(CR\*R\*)<sub>r+s+1</sub>-, -(CR\*R\*)<sub>r</sub>-O-(CR\*R\*)<sub>s</sub>-, -(CR\*R\*)<sub>r</sub>-S-(CR\*R\*)<sub>s</sub>-, -(CR\*R\*)<sub>r</sub>-N(R\*)-(CR\*R\*)<sub>s</sub>-, -O-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-O-, -S-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-O-, -O-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-S-, -N(R\*)-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-O-, -O-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-N(R\*)-, -S-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-S-, -N(R\*)-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-N(R\*)-, -N(R\*)-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-S-, y -S-(CR\*R\*)<sub>r+s</sub>-N(R\*)-; en donde R\* es tal y como se definió más arriba para los oligómeros; y cada un de los sustituyentes R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, y R<sup>5\*</sup>, que no están implicados en Q ó Q\*, son tal y como se definió más arriba para los oligómeros.

Los L-ribo-LNA monoméricos comprenden también su sales básicas y sus sales por adición de ácido.

Además, debería sobrentenderse que cualquier grupo químico (incluyendo cualquier nucleobase) que sea reactivo en las condiciones que predominan en la síntesis química de oligonucleótidos, tenga opcionalmente protegido su grupo funcional, tal y como se conoce en el estado de la técnica. Esto significa que grupos tales como los grupos hidroxilo, amino, carboxilo, sulfono y mercapto, así como las nucleobases, de un L-ribo-LNA monomérico tienen su grupo funcional opcionalmente protegido. La protección (y la desprotección) se realiza según procedimientos conocidos por los especialistas en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Greene, T. W. y Wuts, P. G. M., "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª ed., John Wiley, N.Y. (1991), y M.J. Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, 1984).

Son ejemplos ilustrativos de grupos protectores de hidroxilo, los tritilo (Tr) opcionalmente sustituido (Tr), tales como el 4,4'-dimetoxitritilo (DMT), 4-monometoxitritilo (MMT), y tritilo, 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo) opcionalmente sustituido, etoxocarboniloxilo opcionalmente sustituido, p-fenilazofeniloxycarbonilo, tetrahidropirano (thp), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), metoxitetrahidropirano (mthp), sililoxilos tales como el trimetilsililo (TMS), el triisopropilsililo (TIPS), tert-butildimetilsililo (TBDMS), trietilsililo (TES) y fenildimetilsililo, benciloxycarbonilos o éteres de benciloxycarbonilos sustituidos, tales como el 2-bromo-benciloxycarbonilo, tert-butiléteres, alquiléteres tales como el metiléter, acetales (incluyendo dos grupos hidroxilos), aciloxilos tales como el acetilo o los acetilos sustituidos con halógenos, por ejemplo, cloroacetilo o fluoroacetilo, isobutirilo, pivaloilo, benzoilo y benzoilo sustituido, metoximetilo (MOM), benciléteres o benciléteres sustituidos, tales como el 2,6-diclorobencilo (2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl). Alternativamente, el grupo hidroxilo puede protegerse mediante el anclado a un soporte sólido, opcionalmente a través de un engarce.

Son ejemplos ilustrativos de grupos protectores de amino, el Fmoc (fluorenilmetoxycarbonilo), BOC (tert-butoxycarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxycarbonilo (alloc, AOC), benciloxycarbonilo (Z, Cbz), benciloxycarbonilos sustituidos tales como el 2-cloro-benciloxycarbonilo (2-ClZ), monometoxitritilo (MMT), dimetoxitritilo (DMT), ftaloilo, y 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo).

Son ejemplos ilustrativos de grupos protectores de carboxilos, los alilésteres, metilésteres, etilésteres, 2-cianoetilésteres, trimetilsililésteres, bencilésteres (Obzl), 2-adamantilésteres (O-2-Ada), ciclohexilésteres (OchHex), 1,3-oxazolinas, oxazolera, 1,3-oxazolidinas, amidas o hidrazidas.

Son ejemplos ilustrativos de grupos protectores de mercaptos, el tritilo (Tr), acetamidometilo (acm), trimetilacetamidometilo (Tacm), 2,4,6-trimetoxibencilo (Tmob), tert-butilsulfenilo (StBu), 9-fluorenilmetilo (Fm), 3-nitro-2-piridinesulfenilo (Npys), y 4-metilbencilo (Meb).

Además, puede ser necesario o deseable proteger cualquiera nucleobase incluida en un L-ribo-LNA monomérico, especialmente cuando el L-ribo-LNA monomérico ha de incorporarse en un oligómero de la invención. En el contexto actual, el término "nucleobases protegidas" significa que la nucleobase en cuestión es portadora de un grupo protector seleccionado de entre los grupos que son bien conocidos para un especialista en la técnica (ver, por ejemplo, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", vol 20, (Ed. Sudhir Agrawal), Humana Press, 1993, Totowa, NJ; S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 49:6123 (1993); S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223 (1992); y E. Uhlmann y A. Peyman, *Chem. Rev.*, 90:543 (1990)). Son ejemplos ilustrativos el benzoilo, isobutirilo, tert-butilo, tert-butiloxycarbonilo, 4-cloro-benciloxycarbonilo, 9-fluorenilmetilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, 4-metoxibenzoilo, 4-metoxitriphenilmetilo, triazoló opcionalmente sustituido, p-toluensulfonilo, sulfonilo opcionalmente sustituido, isopropilo, amidinas opcionalmente sustituidas, tritilo opcionalmente sustituido, fenoxiacetilo, acilo opcionalmente sustituido, pixilo, tetrahydropirano, sililéteres opcionalmente sustituido, y 4-metoxibenciloxycarbonilo. Capítulo 1 en "Protocols for oligonucleotide conjugates", *Methods in Molecular Biology*, vol 26, (Ed. Sudhir Agrawal), Humana Press, 1993, Totowa, NJ., y S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223 (1992) describen ejemplos apropiados adicionales.

En una realización preferida, el grupo B en un L-ribo-LNA monomérico se selecciona preferiblemente de entre nucleobases y nucleobases protegidas.

En una realización de los L-ribo-LNA monoméricos de la presente invención, uno de Q y Q\*, preferiblemente Q\*, designa un grupo seleccionado de entre Act-O-, Act-S-, Act-N(R<sup>H</sup>)-, Act-O-CH<sub>2</sub>-, Act-S-CH<sub>2</sub>-, Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, y el otro de Q y Q\*, preferiblemente Q, designa un grupo seleccionado de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, mercapto, Prot-S-, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, amino, Prot-N(R<sup>H</sup>)-, mono- ó di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquenilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquinoxilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquínilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquínilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquínilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH<sub>2</sub>-, aminometilo, Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, carboximetilo, sulfonometilo, y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-6</sub>-alquilo.

En el caso descrito más arriba, el grupo Prot designa respectivamente un grupo protector para -OH, -SH, y -NH (R<sup>H</sup>). Tales grupos protectores se seleccionan respectivamente del mismo conjunto que se definió más arriba para los grupos protectores de hidroxilo, el grupo protector de mercapto, y los grupos de protección de aminos, tomando en consideración, sin embargo, la necesidad de un grupo protector estable y reversible. Sin embargo, se prefiere que cualquier grupo protector para -OH se seleccione de entre tritilos opcionalmente sustituidos, tales como el dimetoxitritilo (DMT), monometoxitritilo (MMT), y tritilo, y 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo), opcionalmente sustituido, tetrahidropirano (thp) (otros grupos protectores de hidroxilo apropiados se describen en Agrawal, editor, "Protocols for Oligonucleotide Conjugates"; *Methods in Molecular Biology*, vol. 26, Humana Press, Totowa, NJ (1994) y *Protocols for Oligonucleotides and Analogs*, vol 20, (editor Sudhir Agrawal), Humana Press, 1993, Totowa, NJ), o se protegen como acetal; que cualquier grupo protector para -SH se selecciona de entre el tritilo, tal como el dimetoxitritilo (DMT), monometoxitritilo (MMT), y tritilo, y 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo), opcionalmente sustituido, tetrahidropirano (thp) (en Agrawal *et al.* (ver más arriba) se describen grupos protectores de mercapto apropiados adicionales para la síntesis de oligonucleótidos); y que cualquier grupo protector para el -NH(R<sup>H</sup>) se selecciona de entre tritilo, tal como el dimetoxitritilo (DMT), monometoxitritilo (MMT), y el tritilo, y el 9-(9-fenil)xantenilo (pixilo), opcionalmente sustituido,

tetrahidropirranilo (thp) (en Agrawal (ver más arriba) se describen también grupos protectores adicionales apropiados para la síntesis de oligonucleótidos fosforamiditos).

En la realización anterior, así como para cualquier L-ribo-LNAs monomérico definido en la presente invención, Act designa respectivamente un grupo de activación para -OH, -SH, y -NH(R<sup>H</sup>). Tales grupos de activación se seleccionan, por ejemplo, de entre O-fosforamidito opcionalmente sustituido, O-fosfotriéster opcionalmente sustituido, O-fosfodiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido, y O-fosfonato opcionalmente sustituido.

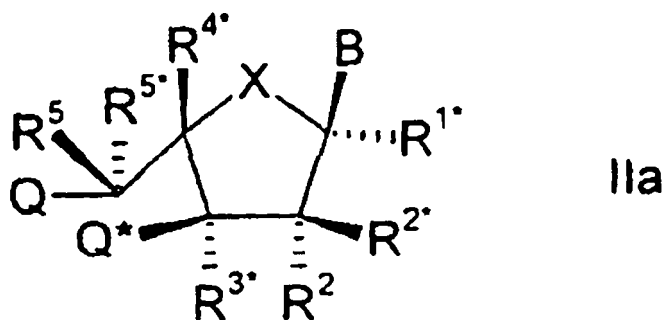
En el contexto actual, el término “fosforamidito” significa un grupo con la fórmula -P(OR<sup>x</sup>)-N(R<sup>y</sup>)<sub>2</sub>, en donde R<sup>x</sup> designa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, metilo, 2-cianoetilo, o bencilo, y cada uno de R<sup>y</sup> designa grupos alquilos opcionalmente sustituidos, por ejemplo, etilo o isopropilo, o el grupo -N(R<sup>y</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo morfolino (-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O). R<sup>x</sup> preferiblemente designa 2-cianoetilo, y los dos R<sup>y</sup> son preferiblemente idénticos y designan isopropilo. Por tanto, un fosforamidito especialmente relevante es el N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil) fosforamidito.

Debería sobrentenderse que los grupos protectores usados en la presente invención para un único L-ribo-LNA monomérico o varios L-ribo-LNA monoméricos pueden seleccionarse de forma que cuando este/estos L-ribo-LNA estén incorporados en un oligómero de la invención, será posible realizar una desprotección simultánea o una desprotección secuencial de los grupos funcionales. Esta última situación abre la posibilidad de introducir de forma regioselectiva uno o varios grupos “activos/funcionales”, tales como intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde tales grupos pueden unirse a través de un espaciador, tal y como se describió más arriba.

En una realización preferida, Q se selecciona de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, mercapto, Prot-S-, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, amino, Prot-N(R<sup>H</sup>)-, mono- ó di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquenilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquinilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquiniloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH<sub>2</sub>-, aminometilo, Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo protector respectivamente para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-6</sub>-alquilo; y Q\* se selecciona de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Act-O-, mercapto, Act-S-, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, amino, Act-N(R<sup>H</sup>)-, mono- ó di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquenilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alqueniloxilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquinilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquiniloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxilo, sulfono, en donde Act es un grupo de activación respectivamente para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-6</sub>-alquilo.

Los L-ribo-LNA monoméricos de la Fórmula general II pueden, al igual que los L-ribo-LNA incorporados en oligómeros, representar varios estereoisómeros. Por tanto, se cree que las variantes estereoquímicas descritas más arriba para los L-ribo-LNA incorporados en oligómeros son igualmente aplicables en el caso de L-ribo-LNA monoméricos (no obstante, debería destacarse que P debería remplazarse entonces con Q).

En una realización preferida de la presente invención, el LNA monomérico tiene la Fórmula general IIa



en donde los sustituyentes se definen como más arriba:

Además, en relación a las definiciones de los sustituyentes, birradicales, R\*, etc, también se aplican las mismas realizaciones preferidas tal y como se definieron más arriba para el oligómero de la invención.

En una realización particularmente interesante de los L-ribo-LNA monoméricos de la presente invención, B designa una nucleobase, preferiblemente una nucleobase seleccionada de entre timina, citosina, uracilo, adenina y guanina (en particular, adenina y guanina), X es -O-, R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> juntos designan un birradical seleccionado de entre

$-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-3^-}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{S}-(\text{CH}_2)_{1-3^-}$ , y  $-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{N}(\text{R}^{\text{N}})-(\text{CH}_2)_{1-3^-}$ , en particular  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-$  y  $-\text{R}^{\text{N}}-\text{CH}_2-$ , en donde  $\text{R}^{\text{N}}$  se selecciona de entre hidrógeno y  $\text{C}_{1-4}$ -alquilo, Q designa Prot-O-,  $\text{Q}^*$  designa Act-OH, y  $\text{R}^{1*}$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^{3*}$ ,  $\text{R}^5$ , y  $\text{R}^{5*}$  designan cada uno hidrógeno. En esta realización,  $\text{R}^{\text{N}}$  puede seleccionarse también de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos.

En una realización adicional particularmente interesante de los L-ribo-LNA de la presente invención, B designa una nucleobase, preferiblemente una nucleobase seleccionada de entre timina, citosina, uracilo, adenina y guanina (en particular, adenina y guanina), X es  $-\text{O}-$ ,  $\text{R}^{2'}$  y  $\text{R}^{4*}$  juntos designan un birradical seleccionado de entre  $-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-3^-}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{S}-(\text{CH}_2)_{1-3^-}$ , y  $-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{N}(\text{R}^{\text{N}})-(\text{CH}_2)_{1-3^-}$ , en particular  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-$  y  $-\text{R}^{\text{N}}-\text{CH}_2-$ , en donde  $\text{R}^{\text{N}}$  se selecciona de entre hidrógeno y  $\text{C}_{1-4}$ -alquilo, Q se selecciona de entre hidroxilo, mercapto,  $\text{C}_{1-6}$ -alquiltio, amino, mono- o di( $\text{C}_{1-6}$ -alquil)amino,  $\text{C}_{1-6}$ -alcoxilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{2-6}$ -alqueniloxilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{2-6}$ -alquiniloxilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, y trifosfato,  $\text{Q}^*$  se selecciona de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto,  $\text{C}_{1-6}$ -alquiltio, amino, mono- o di( $\text{C}_{1-6}$ -alquil) amino,  $\text{C}_{1-6}$ -alcoxilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{2-6}$ -alqueno opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{2-6}$ -alqueniloxilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{2-6}$ -alquinilo opcionalmente sustituido, y  $\text{C}_{2-6}$ -alquiniloxilo opcionalmente sustituido,  $\text{R}^{3*}$  se selecciona de entre hidrógeno,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{2-6}$ -alqueno opcionalmente sustituido, y  $\text{C}_{2-6}$ -alquinilo opcionalmente sustituido, y  $\text{R}^{1*}$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^{3*}$ ,  $\text{R}^5$ , y  $\text{R}^{5*}$  designan cada uno hidrógeno. También aquí,  $\text{R}^{\text{N}}$  puede seleccionarse también de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos.

Un aspecto de la invención es proporcionar varios derivados de los L-ribo-LNA para su incorporación en fase sólida y/o fase en solución a un oligómero. Como un ejemplo ilustrativo, los monómeros apropiados para la incorporación de (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(citosin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(uracil-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(guanin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, y (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(adenin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, usando la estrategia del fosforamidito, la estrategia del fosfotriéster, y la estrategia del H-fosfonato son, respectivamente, el (1R,3R,4S,7R)-7-(2-cianoetoxi(diisopropil-amino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano-7-O-(2-clorofenilfosfato), y (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano-7-O-(H-fosfonato) y, respectivamente, los análogos 3-(citosin-1-il), 3-(uracil-1-il), 3-(adenin-1-il) y 3-(guanin-1-il) de los mismos. Además, los análogos en los que el birradical metilenoxilo de los monómeros se sustituye con un metilendio, un metilenamino, o un birradical 1,2-etileno, también se espera que constituyan variantes particularmente interesantes dentro de la presente invención. Se cree que los análogos metilendio y metilenamino son igualmente aplicables como el análogo metilenoxilo, y, por tanto, los reactivos específicos correspondientes a los mencionados para la incorporación de (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(citosin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(uracil-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(guanin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, y (1R,3R,4S,7R)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(adenin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano, deberían considerarse como monómeros reactivos particularmente interesantes dentro de la presente invención. Para el análogo metilenamino debería destacarse que la amina secundaria puede portar un sustituyente seleccionado de entre  $\text{C}_{1-6}$ -alquilos, tal como el metilo y bencilo,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilcarbonilos opcionalmente sustituidos, tal como el trifluoroacetilo, arilcarbonilos opcionalmente sustituidos, y heteroarilcarbonilos opcionalmente sustituidos.

Es también interesante, como un aspecto distinto de la presente invención, la variante de la Fórmula II o IIa en donde B está en la "configuración b".

#### 50 Preparación de monómeros

En una realización preferida, se sintetizó un  $\alpha$ -L-ribo-LNA que contenía un puente metileno 2'-O,4'-C, mediante el siguiente procedimiento: bencilación de 4-C-hidroximetil- $\alpha$ -D-xilofuranosa 1 (T.F. Tam y B. Fraser-Ried, *Can. J. Chem.*, 57:2818 (1979)) proporcionó el derivado di-O-benzoilo 2, el cual se convirtió posteriormente en la furanosa 1,2-di-O-acetilada 3 mediante acetólisis usando ácido acético al 80%, seguida por acetilación Empleando una metodología de Vorbrüggen modificada (H. Vorbrüggen, K. Krolikiewicz y B. Bennua, *Chem. Ber.*, 114:1234 (1981); H. Vorbrüggen y G. Höfle, *Chem. Ber.*, 114:1256 (1981)), el nucleósido de timina configurado en  $\beta$  4 se obtuvo de forma estereoselectiva mediante la silylación *in situ* del acoplamiento mediado por timina y trimetilsililo. El tratamiento del compuesto 43 con metóxido sódico resultó en la desacilación para rendir el triol del nucleósido 5. La protección con 4,4'-dimetoxitritilo, seguida por una tosiliación, proporcionó el derivado 7 del nucleósido 5'-O-4,4'-dimetoxitritilo protegido. El cierre del anillo inducido por base proporcionó el derivado 8 del nucleósido bicíclico. La desbencilación rindió el análogo 9 del nucleósido bicíclico, el cual se transformó en el derivado de fosforamidito 10 para la síntesis de oligonucleótido. El procedimiento de acoplamiento usado en el ejemplo es sólo uno de los posibles procedimientos, tal y como será evidente para una persona experta en la materia.

Como una ruta alternativa, puede usarse la secuencia sintética mostrada en la Figura 3 (Ejemplos 12-14). De este modo, el nucleósido 5 se trimetilsililó para rendir el nucleósido 11, el cual puede ciclarse usando NaOH/EtOH/H<sub>2</sub>O. En las condiciones experimentales usadas, se observó la conversión concomitante del grupo mesiloxilo restante a un

grupo hidroxilo, rindiendo el nucleósido 12. Se espera que la protección estándar con DMT, tal y como se esbozó en el Ejemplo 14, rinda el nucleósido 8, un intermediario conveniente hacia la síntesis del derivado 10 de fosoramidito del nucleósido  $\alpha$ -L-ribo-LNA (Figura 2).

5 Se pretende que el ejemplo descrito sea ilustrativo de los procedimientos y ejemplos de esta invención. Las estructuras de los compuestos sintetizados se verificaron usando 1D-RMN.

10 Los procedimientos descritos en los Esquemas 1, 2 y 3 pueden probablemente usarse para sintetizar nucleósidos  $\alpha$ -L-ribo-LNA derivados de otras bases pirimidínicas distintas de la timina, por ejemplo, el uracilo, la citosina, el uracilo sustituido en 5, la citosina sustituida en 5, así como otras pirimidinas sustituidas de otro modo. Alternativamente, los derivados de uracilo pueden convertirse en los correspondientes derivados de citosina, y los derivados de timina en los correspondientes derivados de 5-metilcitosina, usando procedimientos bien conocidos (Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel, J., *Tetrahedron*, 54:3607 (1998); Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Andoh, J., Morio, K., Doi, T., Imanishi, T., *Tetrahedron Lett.*, 39:5401 (1998)).

15 Para la síntesis de derivados de nucleósido  $\alpha$ -L-ribo-LNA de purinas pueden idearse un cierto número de procedimientos sintéticos apropiados. Debería destacarse que el término "cara- $\alpha$ ", cuando se menciona más abajo, se refiere a la cara- $\alpha$  de los monómeros de nucleósido de ARN naturales, que el término "cara- $\beta$ ", cuando se menciona más abajo, se refiere a la cara- $\beta$  de los monómeros de nucleósido de ARN naturales, y que el término "nucleósido de  $\beta$ -purina" o "nucleósido de  $\beta$ -pirimidina" significa que las nucleobases están colocadas como en los monómeros de nucleósidos de ARN naturales. Como un ejemplo de una posible ruta sintética hacia los derivados de nucleósidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA de purina, puede utilizarse la ciclización de análogos configurados como arabino (grupo 2'-OH colocado en la cara- $\beta$  del anillo de furanosa). Estos nucleósidos pueden prepararse a partir de los correspondientes nucleósidos matriz configurados como arabino, a través de la oxidación en 5', la condensación del aldol, y la reducción.

20 Las manipulaciones y activación del grupo protector del grupo 5'-OH (colocado en la cara- $\beta$  del anillo de furanosa) debería preparar entonces para la ciclización deseada tal y como se mencionó más arriba. Alternativamente, la oxidación en 2' del grupo 2'-OH de los derivados 4'-C-hidroximetilo de los nucleósidos ribofuranosilo de  $\beta$ -purina (con los grupos 2'-OH y 3'-OH colocados en la cara- $\alpha$  del anillo de furanosa, y el 3'-OH colocado en la cara- $\beta$  del anillo de furanosa (o, alternativamente, en la cara- $\alpha$  del anillo de furanosa) con la inversión concomitante en C3'), seguida por la reducción estereoselectiva (usando, por ejemplo, NaBH<sub>4</sub>) debería suministrar el nucleósido deseado con la configuración invertida en el átomo de carbono 2'. Las manipulaciones y activación del grupo protector del grupo 5'-OH (colocado en la cara- $\beta$  del anillo de furanosa) debería preparar entonces para la ciclización deseada tal y como se mencionó más arriba. Pueden anticiparse otros procedimientos que serán útiles para la inversión de la configuración en el átomo de carbono 2' de los derivados 4'-C-hidrometilo de los nucleósido ribofuranosilos de  $\beta$ -purina (con los grupos 2'-OH y 3'-OH colocados en la cara- $\alpha$  del anillo de furanosa, y el 3'-OH colocado en la cara- $\beta$  del anillo de furanosa, o, alternativamente, en la cara- $\alpha$ , con la inversión concomitante en C3', del anillo de furanosa), por ejemplo, la reacción de Mitsunobu o las reacciones de desplazamiento nucleofílico de derivados 2'-O-activados (por ejemplo, derivados 2'-O-mesilo, 2'-O-tosilo, o 2'-O-trifluorometanosulfonilo) con O-nucleófilos como el acetato, el benzoato, el alcóxido y similares. La desprotección posterior para proporcionar un derivado 5'-hidroxi-4'-C-hidroximetilo, la activación para preparar la ciclización (por ejemplo, mediante mono- o dimesilación, mono- o ditosilación, o mono- o ditrifluorometanosulfonación), la ciclización (después de la desprotección del grupo 2'-OH, si es necesario), y las desprotecciones deberían suministrar los nucleósidos  $\alpha$ -L-ribo de purina deseados. Debería destacarse que las bases de purina preferiblemente deberían protegerse en los monómeros diana, y que esto puede conseguirse durante la ruta sintética escogida, o como el último paso, mediante la trimetilsililación, la protección del grupo amino libre de las bases purínicas, y la desililación. Los derivados 4'-C-hidroximetilo de partida de los nucleósidos  $\beta$ -purina pueden, en una realización, prepararse mediante acoplamiento del derivado de furanosa 3 (Figura 1) con derivados de adenina o guanina convenientemente protegidos, siguiendo los procedimientos de acoplamiento conocidos del tipo Vorbrüggen (ver, por ejemplo, la síntesis del nucleósido 4; Figura 1) (Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel, J., *Tetrahedron*, 54:3607 (1998)).

25 Se anticipa que la inversión de la configuración tal como se ha descrito más arriba puede realizarse sobre nucleósidos ribofuranosilos de  $\beta$ -purina naturales (con el grupo 2'-OH colocado en la cara- $\alpha$  del anillo de furanosa, y el grupo 3'-OH colocado en la cara- $\beta$  del anillo de furanosa, o, alternativamente, en la cara- $\alpha$  del anillo de furanosa, con la inversión concomitante en C3'), con la introducción del grupo 4'-C-hidroximetilo adicional, para continuar a partir de ese punto usando procedimientos conocidos, por ejemplo, los descritos más arriba. También se puede esperar que las reacciones enzimáticas o químicas de transglicosilación, sobre nucleósidos de pirimidina convenientemente derivatizados y protegidos, bien nucleósidos furanosilo de  $\beta$ -pirimidina configurados como arabino, nucleósidos furanosilo de 4'-C-hidroximetil- $\beta$ -pirimidina configurados como arabino, o nucleósidos  $\alpha$ -L-ribo-LNA de pirimidina ya ciclizados, sean rutas sintéticas posibles hacia los derivados de nucleósidos  $\alpha$ -L-ribo-LNA de purina. Alternativamente, la 4-C-hidroximetilación, la inversión de la configuración en el átomo de carbono 2, y la ciclización, o uno de estos procedimientos, o dos de estos procedimientos (el que sea necesario depende del material de partida aplicado) puede realizarse partiendo de una furanosa o hexosa. Posteriormente, antes o después de la ciclización, el acoplamiento con diferentes bases (purinas o pirimidinas - protegidas si es necesario) proporcionará derivados de nucleósidos útiles para la síntesis de nucleósidos  $\alpha$ -L-ribo-LNA de pirimidina o purina, después de las necesarias manipulaciones de los grupos protectores y/o de las activaciones del grupo OH. Aún debería ser posible otro procedimiento para sintetizar nucleósidos  $\alpha$ -L-ribo-LNA de pirimidina o purina, la construcción directa de la nucleobase deseada, en dos o más pasos químicos) a partir de un derivado furanosilo convenientemente derivatizado, por ejemplo, una furanosilamina.

En una realización preferida, los procedimientos descritos en los Ejemplos 15, 16 y 17 (Figura 4) pueden usarse para preparar los monómeros de  $\alpha$ -L-LNA de purina, por ejemplo, los derivados de adenina o guanina. Por tanto, el azúcar 3 se acopló con N-6-benzoiladenina para proporcionar el nucleósido 13, el cual se desacetiló selectivamente y se convirtió posteriormente en el derivado 2'-O-trifluorometanosulfonilo. La reacción concomitante con acetato potásico proporciona el derivado 2'-O-acetilo 14 con inversión en C2'. La completa desacilación, seguida por la re-protección de la porción adenina, la mesilación selectiva de los dos grupos hidroxilos primarios, y el tratamiento con hidróxido sódico en agua:dioxano rindió el nucleósido 15 de adenina  $\alpha$ -L-LNA. La protección con DMT del nucleósido 15, seguida por la desbencilación y la 3'-O-fosfitilación (Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel, J., *Tetrahedron*, 54:3607 (1998)) es una ruta posible para obtener el derivado fosforamidito 16. La desbencilación de 15 seguida por la protección selectiva con DMT del grupo hidroxilo primario y la 3'-O-fosfitilación es otra ruta que rinde el derivado fosforamidito 16.

Todos los métodos y procedimientos descritos más arriba para la síntesis de los nucleósidos de purina  $\alpha$ -L-ribo-LNA son también aplicables como procedimientos alternativos para la síntesis de nucleósidos de pirimidina  $\alpha$ -L-ribo-LNA.

Los procedimientos descritos más arriba para la síntesis de nucleósidos de purina y pirimidina  $\alpha$ -L-ribo-LNA conducen de forma natural a procedimientos útiles para la síntesis de derivados 2'-amino y 2'-tio de nucleósidos  $\alpha$ -L-ribo-LNA. Como un ejemplo, la ciclización mediante el ataque de un grupo 2'-amino o 2'-tio, ubicado en la cara  $\beta$  del anillo de furanosa, sobre un grupo 5'-OH convenientemente activado, debería proporcionar los nucleósidos pirimidínicos 2'-amino o 2'-tio  $\alpha$ -L-ribo-LNA. Alternativamente, la ciclización mediante el ataque de un grupo 5'-amino o 5'-tio, ubicado en la cara  $\beta$  del anillo de furanosa, sobre un grupo 2'-OH convenientemente activado, y ubicado en la cara  $\alpha$  del anillo de furanosa, debería proporcionar los nucleósidos pirimidínicos o purínicos 2'-amino o 2'-tio  $\alpha$ -L-ribo-LNA. Como otro procedimiento, la ciclización de derivados convenientemente activados, protegidos y configurados, por ejemplo, nucleósidos 2'-O,5'-O-dimesilo, 2'-O,5'-O-ditosilo, ó 2'-O,5'-O-ditrifluorometanosulfonilo, usando amino o tio nucleófilos (por ejemplo, respectivamente benzilamina y tioacetato potásico) debería proporcionar los derivados 2'-amino y 2'-tio de nucleósidos  $\alpha$ -L-LNA. De igual modo, un ataque por parte de un grupo 5'-OH, ubicado en la cara  $\beta$  del anillo de furanosa, sobre un grupo 2'-OH convenientemente activado, y ubicado en la cara  $\alpha$  del anillo de furanosa, debería proporcionar los nucleósidos pirimidínicos o purínicos  $\alpha$ -L-ribo-LNA originales.

Se espera que el procedimiento usado para la oligomerización de los nucleósidos pirimidínicos  $\alpha$ -L-ribo-LNA pueda usarse exitosamente también para los nucleósidos purínicos  $\alpha$ -L-ribo-LNA. Alternativamente, también debería ser aplicable cualquier procedimiento para la síntesis automatizada o en fase de solución de oligonucleótidos y análogos, por ejemplo, el procedimiento del fosfotriéster, el procedimiento del H-fosfonato, o cualquier variante del procedimiento del fosforamidito usado para la oligomerización de los nucleósidos pirimidínicos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA.

#### Preparación de oligómeros

Los oligo- y polinucleótidos lineales, ramificados (M. Groetli y B. S. Sproat, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 495 (1995); R. H. E., Hudson y M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:2119 (1993); M. Von Büren, G. V. Petersen, K. Rasmussen, G. Brandenburg, J. Wengel y F. Kirpekar, *Tetrahedron*, 51:8491 (1995)) y circulares (G. Prakash y E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:3523 (1992)) de la invención pueden producirse usando las técnicas de polimerización de la química de ácidos nucleicos, que son bien conocidas por una persona con formación ordinaria en las técnicas de la química orgánica. La química del fosforamidito (S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 49:6123 (1993); S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223 (1992)) se usó, pero, por ejemplo, también pueden usarse la química del H-fosfonato, la química de 1 fosfotriéster, o la síntesis química. Las condiciones de acoplamiento estándares para la estrategia del fosforamidito se modificaron ligeramente al usar hidrócloruro de piridina en vez de 1*H*-tetrazola como un reactivo altamente eficiente para activar los fosforamiditos de nucleósido durante la síntesis del oligonucleótido, y una prolongación del tiempo de acoplamiento de entre 10 a 30 minutos.

Una vez sintetizada la secuencia deseada, la desprotección y la separación del soporte sólido (separación del soporte sólido y la supresión de los grupos protectores usando amoníaco concentrado en metanol, a temperatura ambiente, durante 12 horas), y la purificación posterior en fase inversa usando cartuchos desechables comercialmente (lo que incluye la destilación), rindió el producto oligomérico final. Alternativamente, la purificación de los oligonucleótidos de L-ribo-LNA puede efectuarse usando la HPLC en fase inversa desechable, y/o la precipitación a partir de etanol o butanol. La electroforesis en gel capilar se usó para verificar la pureza y la composición de los análogos de oligonucleótidos sintetizados, sin embargo, la pureza y la composición se pueden verificar también usando HPLC en fase inversa y MALDI-MS.

Generalmente, la presente invención proporciona el uso de los L-ribo-LNA, tal y como se han definido en la presente, para la preparación de oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA. Debe sobrentenderse que los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA pueden comprender nucleósidos normales (es decir, nucleósidos que existen de forma natural, tales como los ribonucleósidos y/o los desoxirribonucleósidos), así como nucleósidos modificados diferentes de los definidos con la Fórmula general II.

Además, los materiales de soporte sólido que tienen inmovilizado sobre sí un LNA opcionalmente con una nucleobase protegida, y opcionalmente con un 5'-OH protegido, son especialmente interesantes como material para la síntesis de oligonucleótidos modificados con LNA, en los que se incluye un monómero de LNA en el extremo 3'. En este caso,

el material del soporte sólido preferiblemente es CPG, por ejemplo, un material de CPG fácilmente (comercialmente) disponible, sobre el cual se ha fijado un LNA, opcionalmente con una nucleobase protegido y opcionalmente con un 5'-OH protegido, usando las condiciones establecidas por el suministrador para ese material concreto. Puede usarse el soporte CPG Universal de BioGenex (BioGenex, EE.UU.). El grupo protector del 5'-OH puede ser, por ejemplo, un grupo DMT. El grupo funcional en 3' debería escogerse con la debida consideración a las condiciones aplicables al material CPG en cuestión.

#### Aplicaciones

La presente invención describe el sorprendente hallazgo de que los derivados L-ribo-LNA, cuando se incorporan en oligonucleótidos parcialmente modificados, disminuyen la afinidad de estos oligonucleótidos modificados por ambos, el ADN y el ARN complementarios, en comparación con los oligonucleótidos sin modificar. No obstante, cuando se incorporan en oligonucleótidos completamente modificado con L-ribo-LNA, se observa un incremento dramático en las propiedades de hibridación con ambos, ADNss y ARNss complementarios. El  $\alpha$ -L-ribo-LNA, una variante especial de los L-ribo-LNA, además de las propiedades descritas tiene la capacidad de discriminar entre dianas de ARN y ADN cuando se hibrida. Dependiendo de la aplicación, el uso de oligonucleótido de L-ribo-LNA completamente modificado, ofrece, por tanto, la fascinante posibilidad de, o bien incrementar enormemente la afinidad de un oligonucleótido estándar sin comprometer su especificidad (oligonucleótido de tamaño constante), incrementar significativamente la especificidad sin comprometer la afinidad (reducción en el tamaño del oligonucleótido), o hibridarse específicamente a dianas de ARN.

Se cree también que los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA, además de mejorar enormemente sus propiedades de hibridación, muestran muchas de las útiles propiedades fisicoquímicas de los oligonucleótidos de ADN y ARN normales. Las posibilidades incluyen, una excelente solubilidad, una respuesta de los oligonucleótidos modificados con LNA a las sales como el cloruro sódico y cloruro de tetrametilamonio que imita la de los oligonucleótidos no modificados, la capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA para actuar como cebadores de una variedad de polimerasas, la capacidad de los nucleótidos modificados con LNA para actuar como cebadores en una reacción de amplificación de una diana usando una polimerasa del ADN termoestable, la capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA para actuar como un sustrato de la quinasa de polinucleótidos de T4, la capacidad de los LNA biotinilados para capturar amplicones de la PCR de forma específica para la secuencia sobre una superficie sódica recubierta de estreptoavidina, la capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA inmovilizados para capturar amplicones de forma específica según la secuencia, y de forma muy importante, la capacidad de los oligonucleótidos modificados con LNA para apuntar específicamente según la secuencia ADN de doble hebra mediante invasión de la hebra. Por tanto, es evidente para alguien con la formación ordinaria en el campo, que estos novedosos análogos de nucleósido son herramientas extremadamente útiles para mejorar en general las prestaciones de las técnicas terapéuticas, de diagnósticos y de la biología molecular basadas en oligonucleótidos.

Un objeto de la presente invención es proporcionar L-ribo-LNA monoméricos de la invención, los cuales pueden incorporarse en oligonucleótidos usando procedimientos y equipamiento bien conocido por alguien experto en el campo de la síntesis de oligonucleótidos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos (oligómeros) modificados total o parcialmente con L-ribo-LNA, los cuales son capaces de hibridarse, de forma específica para una secuencia, con oligonucleótidos complementarios, formando dúplex o triplexes de afinidad sustancialmente mayor que los complejos correspondientes formados por oligonucleótidos no modificados.

Otro objeto de la presente invención es usar oligonucleótidos completamente modificados con L-ribo-LNA para obtener una especificidad mejorada de los oligonucleótidos sin comprometer la eficacia.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos completa o parcialmente modificados, que comprenden tanto L-ribo-LNA, como nucleósidos normales, y otros análogos de nucleósidos.

Un objeto adicional de la presente invención es explotar la elevada afinidad de los L-ribo-LNA para crear oligonucleótidos completamente modificados de afinidad extrema, los cuales son capaces de unirse a sus secuencias diana en un molécula de ADNds por medio del "desplazamiento de la hebra".

Un objeto adicional de la invención es proporcionar diferentes clases de L-ribo-LNA, los cuales, cuando se incorporan en los oligonucleótidos, difieren en su afinidad por sus nucleósidos complementarios. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sustituyendo las nucleobases normales G, A, T, C y U con derivados que tengan, por ejemplo, sus posibilidades de puentes de hidrógeno alteradas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA, los cuales son más resistentes a las nucleasas que sus homólogos no modificados.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA, los cuales pueden discriminar entre dianas de ADN y ARN cuando se están hibridando. Se ha mostrado sorprendentemente mediante mediciones de la  $T_m$  que la  $T_m$  de un  $\alpha$ -L-ribo-LNA respecto oligonucleótidos de ARN está incrementada 5,7°C por modificación, en comparación con sólo 2,7°C por modificación respecto el ADN complementario (tal y

como se muestra en el Ejemplo 11, Tabla 3). Por tanto, los oligos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA tendrán una afinidad incrementada hacia el ARN en comparación con el ADN, permitiendo que se creen condiciones en las cuales el  $\alpha$ -L-ribo-LNA se hibridará específicamente a un ARN determinado, pero no a un ADN que tenga la misma secuencia de bases. Esta capacidad para discriminar entre ARN y ADN puede explotarse en un cierto número de situaciones descritas más abajo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar oligonucleótidos que pueden reclutar la RNAsaH.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar L-ribo-LNA que pueden actuar como sustratos para las polimerasas de ADN y ARN, permitiendo de ese modo que los análogos se incorporen en una cadena de ácido nucleico en crecimiento, o que actúen como terminadores de cadena.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar L-ribo-LNA que pueden actuar como agentes terapéuticos. Se conocen muchos ejemplos de análogos de nucleósidos terapéuticos, y pueden sintetizarse derivados similares de los análogos de nucleósido descritos en la presente invención usando los procedimientos conocidos a partir de la literatura (E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 38:2491 (1995); P. Herdewijn y E. De Clercq: "Classical Antiviral Agents and Design of New Antiviral Agents", en: *A Textbook of Drug Design and Development*; Editores P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors y U. Madsen; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996, p. 425; I. K. Larsen: "Anticancer Agents". En: *A Textbook of Drug Design and Development*; Editores P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors y U. Madsen; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996, p. 460).

Se ha demostrado que el ARN de doble cadena posee actividad antivírica y actividad supresora de tumores (Sharp *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 230(1):97-103 (1995), Lengyel-P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(13):5893-5895 (1993), y Laurent-Crawford *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8(2):285-290 (1992)). Es probable que los LNA de doble cadena puedan imitar el efecto de los ARN de doble cadena terapéuticamente activos, y en consecuencia tales LNA de doble cadena tienen un potencial como drogas terapéuticas.

Cuando se usa en la presente invención, el término "ácido nucleico natural" se refiere a ácidos nucleicos en el sentido más amplio, como, por ejemplo, los ácidos nucleicos presentes en células intactas de cualquier origen, o los virus o los ácidos nucleicos liberados a partir de tales fuentes mediante medios químicos o físicos, o los ácidos nucleicos derivados a partir de tales fuentes primarias por medio de la amplificación. El ácido nucleico puede ser de hebra simple, doble, o parcialmente doble, y puede ser una especie relativamente pura o una mezcla de diferentes ácidos nucleicos. Puede ser también un componente de una muestra biológica cruda que comprende otros ácidos nucleicos y otros componentes celulares. Por otra parte, el término "ácidos nucleicos sintéticos" se refiere a cualquier ácido nucleico producido mediante síntesis química.

La presente invención también proporciona el uso de oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA en la terapia y diagnóstico basados en ácido nucleico, y en la biología molecular. Los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA pueden usarse en la detección, identificación, captura, caracterización, cuantificación y fragmentación de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, y como agentes bloqueadores de la traducción y transcripción *in vivo* e *in vitro*. En muchos casos, será interesante unir varias moléculas a los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA. Tales moléculas pueden unirse a cualquier extremo del oligonucleótido, o pueden unirse a una o más posiciones internas. Alternativamente, pueden unirse al oligonucleótido a través de espaciadores unidos al extremo 5' ó 3'. Son grupos representativos de tales moléculas: los intercaladores del ADN, los grupos fotoquímicamente activos, los grupos termoquímicamente activos, los grupos quelantes, los grupos indicadores, y los ligandos; Generalmente, todos los procedimientos para marcar con estas moléculas oligonucleótidos de ADN y ARN no modificados pueden usarse también para marcar oligonucleótidos marcados con L-ribo-LNA. De igual modo, todos los procedimientos para detectar oligonucleótidos marcados generalmente se aplican a los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA y marcados.

Por tanto, un oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA puede usarse para el marcaje de células, en donde la marca permite que las células se puedan distinguir o separar de células no marcadas.

#### Terapia

El término "desplazamiento de la hebra" se refiere a un proceso en donde un oligonucleótido se une a su secuencia diana complementaria en un ADN o ARN de doble hebra, para desplazar la otra hebra de dicha hebra diana.

En un aspecto de la presente invención, los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA y capaces de realizar el "desplazamiento de la hebra" se explotan en el desarrollo de drogas farmacéuticas novedosas en la estrategia del "antígeno". En contraste con los oligonucleótidos capaces de formar hélices triples, tales oligonucleótidos de "desplazamiento de la hebra" permiten apuntar a cualquier secuencia en un ADNds, y hacerlo a fuerza iónica y pH fisiológicos.

Los oligonucleótidos de "desplazamiento de la hebra" puede usarse también ventajosamente en la estrategia antisentido en casos en los que la secuencia diana de ARN es inaccesible debido a los puentes de hidrógeno intramoleculares. Tales estructuras pueden ocurrir en ARNm y pueden causar problemas significativos cuando se intenta "cerrar" la traducción del ARNm mediante la estrategia de antisentido.

Otras clases de ARN celulares, como por ejemplo los ARNt, ARNr, ARNsn y ARNsc, comprenden estructuras intramoleculares que son importantes por su función. Estas clases de ARN altamente estructurados no codifican proteínas, sino que (en forma de partículas de ARN/proteínas) participan en un conjunto de funciones celulares, tales como el plegado del ARNm, la poliadenilación, la traducción, la edición, el mantenimiento de la integridad de los extremos de los cromosomas. Debido a su elevado grado de estructura, que dificulta o incluso impide que los oligonucleótidos normales se hibriden eficientemente, ha sido difícil hasta la fecha usar estas clases de ARN como dianas inventadas. Sin embargo, con los nuevos y sorprendente resultados de los  $\alpha$ -L-ribo-LNA presentados en la presente invención, apuntar a estos ARN con los  $\alpha$ -L-ribo-LNA es una posibilidad, tal y como se describe más abajo.

Se sabe que un cierto número de antibióticos interactúan con los ribosomas bacterianos e inhiben de ese modo la traducción. Se sabe que algunos antibióticos (por ejemplo, la estreptomycin, la tetraciclina, la espectinomycin, la edeína, la higromicina y las neomicinas) se unen a regiones específicas sobre el ARNr 16S bacteriano (Moazed D y Noller HF, *Nature*, 327(6121):389 (1987)). De forma similar, otros antibióticos (por ejemplo, el cloramfenicol, la eritromicina, la carbomicina, y la vernamicina B) interactúan con regiones específicas sobre el ARNs 23 S bacteriano (Moazed D y Noller HF, *Biochimie*, 69(8):879 (1987)). Una estrategia similar parece realizable también en organismos superiores (Spangler EA y Blackburn EH, *J. Biol. Chem.*, 260(10):6334 (1985)).

Además, se sabe que los PNA (PNA, Ácidos péptido-nucleicos) son moléculas que interactúan específicamente con el ADN en un tipo de emparejamiento Watson-Crick, y que lo hacen con una estabilidad térmica ( $T_m$ ) algo incrementada. Dirigidos a sitios funcionales y accesibles en el ARN ribosómico, pueden inhibir la traducción en *Escherichia coli* (Good L y Nielsen PE, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(5):2073 (1998)), indicando que los oligonucleótidos de afinidad elevada, los cuales se unen a ciertos sitios del ARN, pueden imitar el efecto de los antibióticos que se unen al ARNr. Puesto que los LNA se unen al ARN con un  $T_m$  aún mayor que la de los PNA, es altamente probable que puedan diseñarse LNA que se unan específicamente al ARNr bacteriano e inhiban la traducción en la bacteria. Como una extensión de esta estrategia, puede ser posible explotar las pequeñas pero significativas diferencias en las secuencias de ARNr entre organismos superiores, para diseñar LNA-oligos que inhiban la traducción en unos, pero no en los otros. Una aplicación de esta estrategia sería desarrollar LNA específicamente, los cuales inhiban la traducción en *Plasmodium spp.* (los parásitos de la malaria), *Schistosoma spp.* (que causa la Bilharzia), diversas filarias (causantes de la Elefantiasis y de la Ceguera del Rfo), anquilostomas (causantes de anemia) y otros parásitos patogénicos.

El uso de monómeros de L-ribo-LNA de elevada afinidad debería facilitar la construcción de sondas antisentido con la termoestabilidad suficiente para hibridarse efectivamente a tales ARN dianas. Por tanto, en una realización preferida, el L-ribo-LNA se usa para conferir una afinidad suficiente al oligonucleótido para permitir que se hibride con esas clases de ARN, modulando de ese modo la función cualitativa y/o cuantitativa de las partículas en las que se halla el ARN.

Los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA a usarse en terapias antisentido se diseñan con el doble propósito de la elevada afinidad y de la capacidad para reclutar la RNAsaH. Esto puede conseguirse, por ejemplo, teniendo segmentos de L-ribo-LNA flanqueando un segmento de ADN central no modificado. Además, la capacidad especial del  $\alpha$ -L-ribo-LNA para discriminar entre el ARN y el ADN puede explotarse en varias aplicaciones antisentido terapéuticas generales, a causa de la preferencia de los  $\alpha$ -L-ribo-LNA por el ARN. Mediante el diseño de oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA específicos para el ARN de interés, se evita la unión no específica a fragmentos de ADN con una secuencia de nucleótidos similar a la del ARN diana, impidiéndose de ese modo la asociación estable de los oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA con el ADN cromosómico, la cual podría cambiar la estructura del ADN e inducir, por tanto, mutaciones en el gen en cuestión. Este cambio en la estructura del ADN y las mutaciones asociadas pueden causar efectos tóxicos secundarios no deseados.

Aún otra realización de la presente invención es diseñar ribozimas con especificidad incrementada. Los ribozimas son oligodesoxirribonucleótidos, y análogos de los mismos, que combinan la actividad catalítica de la RNasa con la capacidad de tener una interacción específica para la secuencia con una diana de ARN complementario. Han atraído mucho interés como moléculas terapéuticas, y parece probable que las características atractivas de los oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA puedan usarse para mejorar el diseño de ribozimas dirigido contra ARN específicos.

Aún otra realización de la presente invención son oligonucleótidos de L-ribo-LNA que interactúan específicamente con nucleoproteínas celulares, las cuales contienen ARN como un componente integrado y esencial de la proteína activa, dos ejemplos de las cuales son los ribosomas y la telomerasa. La capacidad de los oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA para inhibir la telomerasa puede aplicarse a aplicaciones importantes.

Los cromosomas de los eucariotas superiores (incluyendo el hombre) son lineales. La estructura primaria (la secuencia de ADN) de los extremos del cromosoma ha sido elucidada, y parece ser que las secuencias de ADN de todos los extremos de cromosomas -en un organismo determinado- consisten en una unidad sencilla que se repite con un extremo de hebra simple que sobresale. El extremo del cromosoma se denomina telómero. En el hombre, los telómeros contienen tiradas largas de múltiples repeticiones de doble hebra de la secuencia 5'-TTAGGG-3' (secuencia en una hebra, en la dirección desde el centrómero hacia el extremo del cromosoma). Puesto que todas las polimerasas de ADN requieren tanto la hebra de plantilla como el cebador de oligonucleótido para iniciar la síntesis de una hebra de ADN complementario, la polimerasa de ADN no es capaz por sí misma de replicar los extremos finales de los cromosomas. Esto conduce a un acortamiento progresivo de los cromosomas cuando los cromosomas se replican. Mirando la lon-

gitud de los telómeros en células somáticas normales, la longitud del telómero pare ser más corta durante cada ciclo de replicación, hasta que el telómero tiene solamente de 5-15 k.b. de longitud. Cuando los telómeros son tan cortos, las células cesan normalmente de dividirse y entran gradualmente en la fase de senescencia. La única excepción a esto son las células madre. Las células madre son células especializadas que son capaces de continuar dividiéndose durante la vida de un organismo. De forma interesante, los telómeros de las células madre continúan siendo largos (10-15 kb). Esto se debe a la actividad de un enzima particular, la telomerasa. La telomerasa es un enzima único, el cual es capaz de prolongar específicamente el extremo sobresaliente de hebra única del telómero, permitiendo de ese modo que los telómeros tengan una longitud estable. La telomerasa es un enzima ribonucleoproteína, es decir, una proteína que contiene un ARN, y que depende del ARN para su actividad enzimática. La estructura de la telomerasa es algo similar a la de la transcriptasa inversa - una proteína vírica que también es capaz de sintetizar ADN usando un ARN como plantilla.

La capacidad enzimática de la telomerasa para prolongar el telómero depende de la correcta posición del extremo 3' del telómero libre sobre la molécula de ARN. Las moléculas que son capaces de interactuar específicamente con el extremo final del telómero, o quizás con el componente de ARN de la telomerasa, inhibirán el enzima. El  $\alpha$ -L-ribo-LNA puede diseñarse para satisfacer estos requisitos. Esto será interesante en la terapia del cáncer -excepto para las células madre-, puesto que las células somáticas normales no contienen actividad telomerasa detectable, lo que supone un amplio contraste con las células de cáncer, la mayoría de las cuales contiene actividad telomerasa fácilmente detectable. Las células cancerosas son inmortales, no envejecen, sino que continúan proliferando y forman masas tumorales hasta que el organismo muere. La evidencia global hasta la fecha sugiere que la actividad telomerasa es esencial para la inmortalización de las células cancerosas. De forma interesante, los telómeros de las células cancerosas son sustancialmente más cortos que los telómeros de las células madre, indicando que las células cancerosas alcanzarían la "barrera de la longitud del telómero" antes que las células madre, y sugiriendo que un fármaco que inhiba específicamente la actividad telomerasa es útil como fármaco anticáncer.

En relación a esto, será un aspecto importante explotar las propiedades excepcionales del  $\alpha$ -L-ribo-LNA para diseñar oligómeros de  $\alpha$ -L-ribo-LNA dirigidos contra partes específicas del componente ARN de la telomerasa, con el propósito de inhibir la actividad telomerasa de las células cancerosas humanas.

Otra realización de la presente invención es el uso de oligonucleótidos de L-ribo-LNA, especialmente de oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA, como aptámeros. Esta prometedora nueva clase de oligonucleótidos terapéuticos se selecciona *in vitro* para unirse específicamente a una diana determinada con elevada afinidad, como, por ejemplo, los receptores de ligando. Sus características de unión son probablemente un reflejo de la capacidad de los oligonucleótidos para formar estructuras tridimensionales mantenidas juntas mediante el emparejamiento intramolecular de las nucleobases. Es altamente probable que los aptámeros que contienen oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA puedan presentar características ventajosas que pueden explotarse con fines terapéuticos.

En algunos casos, puede ser ventajoso regular a la baja la expresión de un gen, mientras que en otros casos puede ser ventajoso activarlo. Tal como mostraron Moellegaard *et al.* (Moellegaard, N. E.; Buchardt, O.; Egholm, M.; Nielsen, P. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:3892 (1994)), los oligómeros capaces de "desplazamiento de la hebra" pueden funcionar como activadores de la transcripción del ARN. En un aspecto de la presente invención, los LNA capaces de "desplazamiento de la hebra" se usan para activar genes de interés terapéutico.

En la quimioterapia de numerosas infecciones víricas y cánceres, varias formas de nucleósidos y análogos de nucleósidos han probado ser efectivas. Los nucleósidos de L-ribo-LNA son potencialmente útiles como tales fármacos basados en nucleósidos.

En un cierto número de casos, se ha descrito que el ARN de doble hebra (ARNds) tiene actividades farmacéuticas específicas. Los dúplex que implican oligonucleótidos completamente modificados con L-ribo-LNA son potencialmente útiles como tales fármacos de doble hebra, y es además altamente posible que los oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA de doble hebra añadan moléculas importantes al repertorio de moléculas parecidas al ARN de doble hebra biológicamente activas.

El potencial terapéutico de los LNA de doble hebra (DS-LNA) puede, por tanto, estar en el tratamiento del cáncer o de las infecciones víricas, tal y como se explica más abajo.

Se ha descrito que varios tipos de DS-ARN, bien sólo o en sinergia con el interferón-gamma, inhiben el crecimiento de varios tipos de células cancerosas (Borecky *et al.*, *Tex Rep Biol Med*, 41:575 (1981); Sharp *et al.*, *Eur J Biochem*, 230(1):97 (1995)). Los DS-ARN inhiben el crecimiento de las células cancerosas en cultivo, así como en tumores en animales de experimentación. Al menos dos enzimas activables por el ARN de doble hebra parecen estar implicados en la actividad supresora de tumores del DS-ARN, la proteína quinasa activable por el ARN de doble hebra y la ribonucleasa L (Lengyel-P, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(13):5893 (1993)). Mientras que la PKR es activada directamente por el DS-ARN, la RNasa L es activada por el DS-ARN a través de la (2'-5')oligoadenilato sintetasa, la cual está latente a menos que sea activada por el DS-ARN. El DS-ARN también induce la actividad de las células asesinas naturales (NK), y esta actividad probablemente contribuye a la actividad antitumoral del DS-ARN.

Aunque el DS-ARN que ocurre de forma natural típicamente está asociado con la infección por virus, se ha demostrado también que el DS-ARN posee actividad anti-vírica. El DS-ARN ha demostrado su actividad contra los virus de

la inmunodeficiencia humana VIH-1 y VIH-2 (Haines *et al.*, *J Cell Biochem*, 46(1):9 (1991)). El DS-ARN, y por tanto los DS-LNA, pueden por tanto ser un candidato potencial como fármaco terapéutico en el tratamiento del SIDA.

El DS-ARN aun ha de probar su eficacia clínica en la práctica. Sin embargo, las células de mamífero contienen un cierto número de nucleasas específicas para el DS-ARN, y quizá a causa de estas actividades el DS-ARN es rápidamente eliminado de los pacientes. El LNA es bastante parecido al ARN, y comparte la mayoría de las características químicas del ARN (Koshkin *et al.*, *Tetrahedron*, 54:3607 (1998)), el LNA forma dúplex estable y el cambio estructural del ARN al LNA es bastante sutil. Por tanto, es probable que LNA de doble hebra adecuados puedan imitar el efecto de cierto DS-ARN y, en consecuencia, activar la PKR y/o (2'-5')oligoadenilato sintetasa, y puesto que se ha probado que el LNA presenta estabilidad exonucleótica (Singh *et al.*, *Chem. Commun.*, 455 (1998)) es posible que las moléculas de DS-LNA puedan presentar una eficacia terapéutica mejorada en comparación con el DS-ARN.

Esta invención también concierne a una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido, modificado con L-ribo-LNA, farmacéuticamente activo, o un monómero de L-ribo-LNA farmacéuticamente activo, tal y como se definieron más arriba, en comparación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Tales composiciones pueden estar en una forma adaptada a la administración oral, parenteral (intravenosa, intraperitoneal), intramuscular, rectal, intranasal, dérmica, vaginal, bucal, ocular, o pulmonar, preferiblemente en una forma adaptada a la administración oral, y tales composiciones pueden prepararse de una forma bien conocida por el especialista en la técnica, por ejemplo, como se describe de forma general en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17ª edición, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., 1985 y en ediciones más recientes, y en las monografías en la serie "Drugs and the Pharmaceutical Sciences", Marcel Dekker.

#### Diagnósticos

Se han desarrollado varios procedimientos diagnósticos y de biología molecular que utilizan conjuntos de diferentes oligonucleótidos para analizar simultáneamente un ácido nucleico diana en busca de la presencia de un plétora de mutaciones posibles. Típicamente, los conjuntos de oligonucleótidos están inmovilizados en un patrón determinado sobre un soporte sólido, de forma que la presencia de una mutación determinada en el ácido nucleico diana puede revelarse por la posición sobre el soporte sólido en donde se hibrida. Una importante condición previa para el uso exitoso de conjuntos de diferentes oligonucleótidos en el análisis de ácidos nucleicos, es que todos sean específicos para su secuencia diana concreta en la única condición de hibridación aplicada. Puesto que la afinidad y especificidad de los oligonucleótidos estándares por sus secuencias diana complementarias dependen intensamente de su secuencia y tamaño, hasta la fecha ha sido difícil satisfacer este criterio.

Además, se han desarrollado un cierto número de técnica para caracterizar los diversos tipos de ARN que las células pueden contener. Una estrategia común para la caracterización es la hibridación del ácido nucleico, los ejemplos de tales técnicas son: la hibridación *in situ*, la hibridación por transferencia de puntos, la hibridación por la transferencia de puntos inversa, la hibridación Northern, y la transcripción inversa con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Estas técnicas se preparar a menudo sobre muestra que contienen tanto ADN como ARN, y frecuentemente este hecho crea problemas en los ensayos, los cuales podrían evitarse fácilmente si existieran sondas que fueran convenientemente discriminatorias entre el ADN y el ARN. Este es un problema, en particular, en las hibridaciones *in situ* realizadas sobre varios especímenes de tejido. Con sus propiedades de hibridación altamente discriminatorias hacia el ARN, se puede diseñar un  $\alpha$ -L-ribo-LNA oligo que se hibride específicamente con el ARN en la muestra, eliminándose de ese modo la posibilidad de resultados erróneos obtenidos de la hibridación con ADN irrelevantes con la misma secuencia de nucleótidos.

Por tanto, en una realización preferida, los L-ribo-LNA pueden usarse como un medio para incrementar la afinidad y/o especificidad de las sondas, y como un medio para igualar la afinidad de diferentes oligonucleótidos por sus secuencias complementarias. Tal y como se describe en la presente invención, la modulación de la afinidad puede conseguirse mediante, por ejemplo, la sustitución de nucleósidos seleccionados en el oligonucleótido con un L-ribo-LNA portador de una nucleobase similar. En concreto, esto se aplica a los oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA.

En otra realización preferida, se explota la elevada afinidad y especificidad de los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA en la captura específica de secuencia y en la purificación de ácidos nucleicos naturales o sintéticos. En un aspecto, los ácidos nucleicos naturales o sintéticos se ponen en contacto con el oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA e inmovilizado sobre una superficie sólida. En este caso, la hibridación y la captura ocurren simultáneamente. Los ácidos nucleicos capturados pueden, por ejemplo, detectarse, caracterizarse, cuantificarse o amplificarse directamente sobre la superficie mediante una variedad de procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica, o pueden liberarse de la superficie antes de que ocurra tal caracterización o amplificación, sometiendo el oligonucleótido modificado, inmovilizado, y al ácido nucleico capturado a condiciones de deshibridación, tales como, por ejemplo, el calor o usando tampones de baja fuerza iónica.

El soporte sólido puede escogerse de entre un amplio rango de materiales poliméricos, tales como, por ejemplo, el CPG (vidrio de poro controlado), el polipropileno, el poliestireno, el policarbonato o el polietileno, y puede adoptar una variedad de formas, tales como, por ejemplo, un tubo, una placa de microvaloración, una palillo, una cuenta, un filtro, etc. El oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA puede inmovilizarse sobre el soporte sólido a través de sus extremos 5' ó 3' (o a través del extremo de engarces unidos al extremo 5' ó 3') mediante una variedad de procedimientos

químicos o fotoquímicos empleados usualmente en la inmovilización de oligonucleótidos, o mediante acoplamiento no covalente, tal como, por ejemplo, a través de unión de oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA biotinilado para inmovilizar la estreptoavidina. Un procedimiento preferido para inmovilizar los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA sobre diferentes soportes sólidos es fotoquímico, usando una antraquinona fotoquímicamente activa unida al extremo 5' ó 3' del oligonucleótido modificado (opcionalmente a través de engarces), tal y como se describe en (WO 96/31557). Por tanto, la presente invención proporciona también una superficie portadora de un oligonucleótido modificado con LNA.

En otro aspecto, el oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA porta un ligando unido covalentemente a uno de los extremos 5' ó 3'. En este caso, el oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA se pone en contacto con los ácidos nucleicos naturales o sintéticos en solución, después de lo cual, los híbridos formados se capturan sobre un soporte sólido portando moléculas que pueden unir específicamente el ligando.

En todavía otro aspecto, los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA capaces de realizar el “desplazamiento de la hebra”, se usan en la captura de ácidos nucleicos naturales y sintéticos sin desnaturalización previa. Tales oligonucleótidos modificados son particularmente útiles en los casos en los que es difícil o imposible acceder a la secuencia diana mediante oligonucleótidos normales debido a la formación rápida de estructuras intramoleculares estables. Son ejemplos de ácidos nucleicos que contienen tales estructuras: el ARNr, ARNt, ARNsn y el ARNsc.

En otra realización preferida, los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA diseñados con el propósito de especificidad elevada se usan como cebadores en la secuenciación de ácidos nucleicos, y como cebadores en cualquiera de las diversas reacciones de amplificación bien conocidas, tal como la reacción de la PCR. Tal y como se muestra en la presente invención, el diseño de los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA determina si experimentarán una amplificación de diana exponencial o lineal. Los productos de la reacción de amplificación pueden analizarse mediante una variedad de procedimientos aplicables al análisis de los productos de amplificación generados con cebadores de ADN normales. En el caso concreto en el que los cebadores de oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA se diseñan para experimentar una amplificación lineal, los amplicones resultantes portarán extremos de hebra simple que pueden apuntarse mediante sondas complementarias sin desnaturalización. Tales extremos pueden usarse, por ejemplo, para capturar amplicones mediante otros oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA complementarios y unidos a una superficie sólida.

En otro aspecto, los oligos modificados con L-ribo-LNA capaces de “desplazamiento de la hebra” se usan como cebadores en reacciones de amplificación lineal o exponencial. Se espera que el uso de tales oligos potencie los rendimientos globales de amplicón, mediante la competición efectiva con la rehibridación del amplicón en las últimas etapas de la reacción de amplificación. Demers *et al.* (*Nucl. Acid Res.*, 23:3050-3055 (1995)) descubren el uso de oligos de elevada afinidad, no extensibles, como un medio para incrementar el rendimiento global de una reacción de la PCR. Se cree que los oligómeros elicitán estos efectos interfiriendo con la rehibridación del amplicón en las etapas finales de la reacción de la PCR. Se espera que los oligos modificados con L-ribo-LNA y bloqueados en su extremo 3' proporcionen la misma ventaja. El bloqueo del extremo 3' puede conseguirse de numerosas formas, como, por ejemplo, intercambiando el grupo 3' hidroxilo con hidrógeno o fosfato. Tales oligos modificados con L-ribo-LNA y bloqueados en 3' pueden usarse también para amplificar selectivamente secuencias de ácidos nucleicos estrechamente relacionadas, de forma similar a la descrita por Yu *et al.* (*Biotechniques*, 23:714-716 (1997)).

En años recientes, se han inventado nuevas clases de sondas que pueden usarse en, por ejemplo, la detección en tiempo real de amplicones generados mediante reacciones de amplificación de una diana. Una de tales clases de sondas se ha denominado “Balizas Moleculares”. Estas sondas se sintetizan como oligonucleótidos parcialmente auto-complementarios que comprenden un fluoróforo en un extremo y una molécula atenuadora en el otro extremo. Cuando está libre en solución, la sonda se pliega en una estructura en horquilla (guiada por las regiones auto-complementarias), lo que ubica el atenuador lo suficientemente cerca del fluoróforo como para atenuar su señal fluorescente. A partir de la hibridación con su ácido nucleico diana, la horquilla se abre separando de ese modo el fluoróforo y el atenuador, y dando lugar a una señal fluorescente.

Otra clase de sondas se ha denominado “sondas Taqman”. Estas sondas también comprenden un fluoróforo y una molécula atenuadora. Sin embargo, al contrario que las Balizas Moleculares, la capacidad de los atenuadores para atenuar la señal fluorescente procedente del fluoróforo se mantiene después de la hibridación de la sonda a su secuencia diana. En cambio, la señal fluorescente se genera después de la hibridación mediante la separación de cualquiera del atenuador o fluoróforo de la sonda por medio de la acción de la actividad 5'-exonucleasa de una polimerasa, la cual ha iniciado la síntesis a partir de un cebador ubicado 5' respecto el sitio de unión de la sonda Taqman.

La elevada afinidad por el sitio diana es una característica importante en ambos tipos de sondas y, en consecuencia, tales sondas tienden a ser bastante largas (típicamente de 30 a 40 meros). Como resultado, se hallan problemas significativos en la producción de sondas de elevada calidad. Por tanto, en una realización preferida, el LNA se usa para mejorar la producción y posteriores prestaciones de las sondas Taqman y de las Balizas Moleculares, reduciendo su tamaño mientras que retienen la afinidad requerida.

En un aspecto adicional, los L-ribo-LNA se usan para construir pares de afinidad (sean oligonucleótidos total o parcialmente modificados). Las constantes de afinidad pueden ajustarse fácilmente a lo largo de un amplio rango, y pueden diseñarse y sintetizarse un vasto número de pares de afinidad. Una parte del par de afinidad puede unirse a

la molécula de interés (por ejemplo, proteínas, amplicones, enzimas, polisacáridos, anticuerpos, haptenos, péptidos, PNA, etc.) mediante procedimientos estándares, mientras que la otra parte del par de afinidad puede unirse a, por ejemplo, un soporte sólido, tal como cuentas, membranas, placas de microvaloración, palillos, tubos, etc. El soporte sólido puede escogerse de entre un amplio rango de materiales poliméricos, tales como, por ejemplo, el polipropileno, el poliestireno, el policarbonato o el polietileno. Los pares de afinidad pueden usarse en el aislamiento selectivo, en la purificación, en la captura, y en la detección de una diversidad de las moléculas diana mencionadas más arriba.

El principio de capturar una molécula marcada con L-ribo-LNA por medio de la interacción con otro oligonucleótido de L-ribo-LNA complementario (bien total o parcialmente modificado) puede usarse para crear un número infinito de nuevos pares de afinidad.

En otra realización preferida, se explota la elevada afinidad y especificidad de los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA en la construcción de sondas útiles para la hibridación *in situ*. Por ejemplo, el L-ribo-LNA puede usarse para reducir el tamaño de las sondas de ADN tradicionales mientras que se mantiene la afinidad requerida, incrementándose de ese modo las cinéticas de las sondas y su capacidad para penetrar el espécimen de muestra.

### Purificación

Otra realización de la presente invención es el uso de oligonucleótidos de L-ribo-LNA, especialmente de oligonucleótidos de  $\alpha$ -L-ribo-LNA, en procedimientos de purificación específicos para el ARN. Los procedimientos tradicionalmente empleados para aislar ácidos nucleicos procedentes de células procariotas, células eucariotas, o de muestras biológicas complejas, usan solventes orgánicos tales como el fenol y el cloroformo. Estos aislamientos de ácidos nucleico típicamente empiezan con una digestión enzimática de la muestra, realizada con proteasas, seguidas por la lisis celular usando detergentes iónicos, y a continuación la extracción con fenol o una combinación fenol/cloroformo. Las fases orgánica y acuosa se separan, y los ácidos nucleicos que se han repartido en la fase acuosa se recuperan mediante la precipitación con alcohol. No obstante, el fenol, o una mezcla fenol/cloroformo, es corrosivo para la piel humana, y se considera un residuo peligroso, el cual debe manipularse cuidadosamente y desecharse correctamente. Adicionalmente, las extracciones estándares usando los procedimientos de fenol/cloroformo resultan en mezclas de ARN y ADN. Por tanto, es ventajoso preparar el aislamiento del ácido nucleico explotando la capacidad del  $\alpha$ -L-ribo-LNA para discriminar entre el ARN y el ADN, obteniéndose de ese modo muestras de ADN puro.

### Equipos

La presente invención también proporciona un equipo para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, en donde el equipo comprende un cuerpo de reacción, y uno o más oligonucleótidos (oligómeros) modificados con L-ribo-LNA, tal y como se describen en la presente invención. Los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA están preferiblemente inmovilizados sobre dicho cuerpo de reacción.

La presente invención también proporciona un equipo para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, en donde el equipo comprende un cuerpo de reacción, y uno o más L-ribo-LNA, tal y como se describen en la presente invención. Los L-ribo-LNA están preferiblemente inmovilizados sobre dichos cuerpos de reacción (por ejemplo, usando las técnicas de inmovilización descritas más arriba).

Para los equipos de la invención, el cuerpo de reacción es preferiblemente un material de soporte sólido, seleccionado, por ejemplo, de entre el vidrio de borosilicato, el vidrio soda-lima, el poliestireno, policarbonato, polipropileno, polietileno, tereftalato de polietilenglicol, polivinilacetato, polivinilpirrolidona, polimetilmetacrilato y polivinilcloruro, preferiblemente poliestireno y policarbonato. El cuerpo de reacción puede adoptar la forma de un tubo para espécimen, un vial, un portaobjetos, una lámina, una película, una cuenta, un precipitado, un disco, una placa, un anillo, una barra, una red, un filtro, una bandeja, una placa de microvaloración, un palillo, o un palillo con múltiples palas.

Los equipos están típicamente acompañados por una hoja de instrucciones escritas detallando las condiciones óptimas para usar el equipo.

## Experimental

### General

Las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera de nitrógeno cuando se usaron solventes anhidros. La cromatografía en columna se llevó a cabo en columnas de vidrio usando gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm). Después de la cromatografía en columna, las fracciones que contenían producto se mezclaron, se evaporaron a sequedad bajo presión reducida, y se secaron bajo vacío para rendir el producto. Después de secar las fases orgánicas usando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se llevó a cabo la filtración. Se usó éter de petróleo del intervalo de destilación 60-80°C. Los valores de desplazamiento químico  $\delta$  están en ppm relativas al tetrametilsilano como referencia interna (RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), y son relativas al  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85% (RMN de  $^{31}\text{P}$ ). Los microanálisis se realizaron en el "The Microanalytical Laboratory", Departamento de Química, Universidad de Copenhague.

## ES 2 283 298 T3

Las siguientes descripciones específicas están acompañadas por las Figuras 1-4 y las Tablas 1-3.

### Preparación de monómeros de *L*-ribo-LNA

#### 5 Ejemplo 1

##### 5-*O*-benzoil-4-*C*-benzoiloximetil-3-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -*D*-glucofuranosa (2)

A una solución enfriada en hielo y agitada de 3-*O*-bencil-4-*C*-hidroximetil-1,2-isopropilideno- $\alpha$ -*D*-glucofuranosa (1) (5,00 g, 0,016 mol) en piridina anhidra (60 cm<sup>3</sup>) se le añadió cloruro de bencilo (4,1 cm<sup>3</sup>, 0,035 mol). Después de agitarla a temperatura ambiente durante 4 h, se enfrió la mezcla de reacción a 0°C, se añadió H<sub>2</sub>O (50 cm<sup>3</sup>), y se extrajo la mezcla con diclorometano (100 cm<sup>3</sup> × 3). La fase orgánica combinada se lavó con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (30 cm<sup>3</sup> × 3) y salmuera (20 cm<sup>3</sup> × 3), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando primero éter de petróleo/diclorometano (1:1, v/v), y a continuación diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir la furanosa 2 (7,50 g, 90%) como un aceite amarillento, después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida.  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8,02-7,23 (15H, m), 6,08 (1H, d, J 4,2), 4,81-4,50 (7H, m), 4,22 (1H, d, J 1,0), 1,59 (3H, s), 1,37 (3H, s).  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 166,1, 165,8, 136,7, 133,1, 133,0, 129,9, 129,7, 129,6, 129,5, 128,5, 128,4, 128,3, 128,0, 127,9, 113,3, 105,4, 86,4, 85,1, 83,8, 72,3, 64,3, 63,8, 27,0, 26,4. FAB-MS *m/z* 521 [M+H]<sup>+</sup>. Hallado (%) C, 69,1; H, 5,9; C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub> requiere C, 69,2; H, 6,2.

#### Ejemplo 2

##### 5-*O*-benzoil-4-*C*-benzoiloximetil-3-*O*-bencil-1,2-*O*-acetil-*D*-glucofuranosa (3)

Una solución de la furanosa 2 (7,40 g, 0,014 mol) en ácido acético al 80% (60 cm<sup>3</sup>) se agitó durante 9 h a 90°C. La mezcla se evaporó a sequedad bajo presión reducida y el residuo se coevaporó con tolueno (10 cm<sup>3</sup> × 3) y se disolvió en piridina anhidra (80 cm<sup>3</sup>). Se añadió anhídrido acético (5,5 cm<sup>3</sup>) y se agitó la solución durante 46 h a temperatura ambiente. La mezcla se evaporó a sequedad bajo presión reducida, y el residuo se coevaporó con tolueno (10 cm<sup>3</sup> × 3) y se disolvió en diclorometano (150 cm<sup>3</sup>). La solución se lavó con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (30 cm<sup>3</sup> × 3) y salmuera (20 cm<sup>3</sup> × 3), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando primero éter de petróleo/diclorometano (1:1, v/v), y a continuación diclorometano/metanol (99:1, v/v) como eluyente para rendir la mezcla anomérica 3 (a:b = 3:1, 7,33 g, 92%) como un aceite claro, después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida. Este aceite se usó en el paso siguiente sin purificación adicional.  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 169,4, 169,0, 165,8, 165,6, 137,0, 133,2, 133,1, 133,0, 129,6, 129,5, 129,2, 128,3, 127,8, 127,7, 127,4, 99,4, 92,3, 87,0, 83,2, 82,2, 80,7, 77,4, 76,9, 76,3, 73,2, 72,4, 20,9, 20,8, 20,6, 20,3. FAB-MS *m/z* 562 [M]<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 3

##### 1-(2-*O*-acetil-5-*O*-benzoil-4-*C*-benzoiloximetil-3-*O*-bencil- $\beta$ -*D*-xilofuranosil)timina (4)

A una suspensión agitada de la mezcla anomérica 3 (7,26 g, 0,013 mol) y timina (3,25 g, 0,028 mol) en acetonitrilo anhidro (80 cm<sup>3</sup>) se le añadió *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (19,1 cm<sup>3</sup>, 0,077 mol). La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 1 h y entonces se enfrió hasta 0°C. Se añadió triflato de trimetilsililo (4,1 cm<sup>3</sup>, 0,023 mol) gota a gota durante 10 min, y posteriormente se calentó la mezcla durante 22 h con reflujo. Después de enfriarla hasta temperatura ambiente, se añadió una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (30 cm<sup>3</sup>), y se realizó la extracción usando diclorometano (100 cm<sup>3</sup> × 3). La fase orgánica combinada se lavó con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (30 cm<sup>3</sup> × 3) y salmuera (50 cm<sup>3</sup> × 3), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (0,5-2,0% metanol, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 4 (6,88 g, 85%) como un material sólido blanco, después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida.  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8,97 (1H, br s), 8,04-7,23 (16H, m), 6,37 (1H, d, J 3,6), 5,42 (1H, t, J 3,1), 4,89-4,56 (6H, m), 4,22 (1H, d, J 2,6), 2,13 (3H, s), 1,74 (1H, d, J 0,8).  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 169,9, 166,0, 165,7, 163,4, 150,4, 136,2, 135,2, 133,5, 133,4, 129,8, 129,7, 129,6, 129,5, 129,0, 128,6, 128,4, 128,2, 112,0, 87,4, 86,0, 81,3, 80,3, 72,6, 63,1, 62,9, 20,8, 12,3. FAB-MS *m/z* 629 [M+H]<sup>+</sup>. Hallado (%) C, 64,4; H, 4,9; N, 4,4; C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>, 0,25H<sub>2</sub>O requiere C, 64,5; H, 5,1; N, 4,4.

#### Ejemplo 4

##### 60 1-(3-*O*-bencil-4-*C*-hidroximetil- $\beta$ -*D*-xilofuranosil)timina (5)

A una solución agitada del nucleósido 4 (9,00 g, 0,014 mol) en metanol (130 cm<sup>3</sup>) se le añadió metóxido sódico (3,87 g, 0,0716 mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, y entonces se neutralizó con ácido clorhídrico diluido. La mezcla se evaporó a sequedad bajo presión reducida, seguida por coevaporación usando tolueno (15 cm<sup>3</sup> × 3). El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (4-15% metanol, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido triol 5 (4,82 g, 89%) como un material sólido blanco, después de la evaporación de los solventes bajo presión reducida.  $\delta_{\text{H}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 7,89 (1H, d, J 1,2), 7,40-7,24 (5H, m), 5,97 (1H, d, J 6,2), 4,83-4,65 (2H, m), 4,53 (1H, t, J 6,2), 4,21 (1H, d, J 6,2), 3,84 (1H, d,

## ES 2 283 298 T3

J 12,0), 3,63 (1H, d, J 12,0), 3,59 (2H, d, J 2,6), 1,82 (1H, d, J 1,1).  $\delta_C$  (CD<sub>3</sub>OD) 164,4, 150,9, 137,5, 136,6, 127,5, 127,0, 126,9, 109,8, 86,7, 86,4, 82,8, 78,0, 72,1, 62,3, 61,1, 10,5 (CH<sub>3</sub>). FAB-MS m/z 379 [M+H]<sup>+</sup>. Hallado (%) C, 56,2; H, 6,0; N, 7,0; C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·0,25H<sub>2</sub>O requiere C, 56,5; H, 5,9; N, 7,3.

### 5 Ejemplo 5

#### *1-(3-O-bencil-4-C-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-β-D-xilofuranosil)timina (6)*

10 A una solución del nucleósido 1-(3-O-bencil-4-C-hidroximetil-β-D-xilofuranosil)timina 5 (5,38 g, 14,2 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (400 cm<sup>3</sup>) se le añadió AgNO<sub>3</sub> (2,66 g, 15,7 mmol) seguido por piridina anhidra (5,7 cm<sup>3</sup>) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (5,30 g, 15,6 mmol). La mezcla se agitó a oscuras, bajo nitrógeno, durante 18 horas, a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (10 cm<sup>3</sup>), y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano. La fase orgánica combinada se evaporó a sequedad bajo presión reducida, y el residuo se coevaporó con tolueno y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol/piridina (0,5% metanol; 0,5% piridina, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 6 (3,13 g, 31%) como una espuma blanca después de la evaporación de los solventes.  $\delta_C$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 164,1 (C-4), 158,4, 145,1, 138,5, 137,0, 135,9, 135,7, 130,1, 130,1, 129,2, 128,5, 128,5, 128,2, 128,1, 127,7, 127,6, 127,0, 125,7, 113,5 (DMT, bencilo, C-6), 151,4 (C-2), 110,1 (C-5), 85,8, 85,2, 84,6, 83,5 (C-1', C-3', C-4', DMT), 76,8 (C-2'), 72,3 (CH<sub>2</sub>Ph), 65,2 (C-5''), 62,1 (C-5'), 55,4 (2 × CH<sub>3</sub>O), 12,6 (5-CH<sub>3</sub>).

### Ejemplo 6

#### *1-(3-O-bencil-4-C-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-2,5-di-O-(p-toluensulfonil)-β-D-xilofuranosil)timina (7)*

25 A una solución del nucleósido 6 (2,79 g, 3,9 mmol) en piridina anhidra (50 cm<sup>3</sup>) se le añadió una cantidad catalítica de 4-(N,N-dimetilamino)piridina y cloruro de p-toluensulfonilo (6,50 g, 34 mmol). La mezcla se agitó a oscuras, durante 24 horas, a temperatura ambiente, bajo nitrógeno. La reacción se detuvo mediante la adición de una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (100 cm<sup>3</sup>), y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato sódico (3 × 75 cm<sup>3</sup>) y cloruro sódico (2 × 75 cm<sup>3</sup>). La fase orgánica separada se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol/piridina (0,5% metanol; 0,5% piridina, v/v) como eluyente para proporcionar el nucleósido 7 (2,40 g, 62%) como una espuma amarillenta después de la evaporación de los solventes.  $\delta_C$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 163,2 (C-4), 158,2, 145,9, 145,1, 144,3, 136,8, 135,0, 134,9, 134,8, 131,8, 131,6, 130,2, 130,0, 129,7, 128,2, 127,9, 127,8, 127,6, 127,5, 127,5, 127,4, 126,8, 113,3 (DMT, C-6, 2 × Ts, bencilo), 150,2 (C-2), 110,8 (C-5), 95,0, 86,2 (DMT, C-4'), 82,2, 81,9 (C-1', C-2'), 81,2 (C-3'), 72,9 (CH<sub>2</sub>Ph), 79 (C-5''), 64 (C-5'), 55,1 (2 × CH<sub>3</sub>O), 21,2, 21,2 (2 × CH<sub>3</sub>), 12,0 (5-CH<sub>3</sub>).

### 40 Ejemplo 7

#### *(1R,3R,4S,7R)-7-benciloxi-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (8)*

45 A una solución del nucleósido 7 (3,87 g, 3,92 mmol) en una mezcla de etanol y H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) se le añadió una solución acuosa de NaOH (2 M, 8 cm<sup>3</sup>). La mezcla se calentó con reflujo durante 24 h, y después de enfriarla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (2 × 75 cm<sup>3</sup>), y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol/piridina (0,5% metanol; 0,5% piridina, v/v) como eluyente para proporcionar el nucleósido 8 (2,10 g, 81%) como una espuma blanca después de la evaporación de los solventes.  $\delta_C$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 163,8 (C-4), 158,2, 158,1, 144,7, 137,7, 135,9, 135,2, 135,1, 129,8, 129,7, 128,3, 127,9, 127,7, 127,7, 127,4, 126,7, 113,35 (DMT, bencilo, C-6) 150,3 (C-2), 108,1 (C-5), 88,4, 85,5 (C-4', DMT), 86,4 (C-1'), 79,5 (C-2'), 76,3 (C-3'), 72,6 (C-5'), 71,2 (CH<sub>2</sub>Ph), 58,9 (C-5''), 55,1 (2 × CH<sub>3</sub>O), 12,4 (5-CH<sub>3</sub>).

### 55 Ejemplo 8

#### *(1R,3R,4S,7R)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-7-hidroxil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (9)*

60 A una solución del nucleósido 8 (1,09 g, 1,65 mmol) en metanol (30 cm<sup>3</sup>) se le añadió formato amónico (0,33 g, 5,29 mmol). Se añadió una cantidad catalítica de Pd/C suspendido en metanol (10 cm<sup>3</sup>), y se calentó la mezcla durante 2 h con reflujo. Después de enfriarla hasta temperatura ambiente, la mezcla se evaporó a sequedad bajo presión reducida, y el residuo se coevaporó con tolueno y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol/piridina (2% metanol; 0,5% piridina, v/v) como eluyente para rendir el nucleósido 9 (0,76 g, 80%) como un material sólido blanco después de la evaporación de los solventes.  $\delta_C$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 163,9 (C-4), 158,2, 144,8, 135,8, 135,4, 135,3, 129,8, 127,9, 127,7, 126,8, 113,3 (DMT, C-6), 150,4 (C-2), 108,0 (C-5), 89,2, 85,4 (C-4', DMT), 86,4 (C-1'), 78,9 (C-2'), 72,9 (C-3'), 72,3 (C-5'), 59,9 (C-5''), 55,1 (2 × CH<sub>3</sub>O), 12,5 (5-CH<sub>3</sub>).

## Ejemplo 9

(1R,3R,4S,7R)-7-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (10)

5 A una solución del nucleósido 9 (420 mg, 0,73 mmol) en diclorometano anhidro (4 cm<sup>3</sup>) se le añadió N,N-diisopropiletilamina (0,4 cm<sup>3</sup>) y 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridito (0,4 cm<sup>3</sup>). La mezcla se agitó a oscuras, bajo nitrógeno, durante 18 horas, a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de metanol, y la mezcla se diluyó con acetato de etilo (10 cm<sup>3</sup>), se lavó con soluciones acuosas saturadas de hidrógeno carbonato  
10 sódico (3 × 10 cm<sup>3</sup>) y cloruro sódico (2 × 10 cm<sup>3</sup>) y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se coevaporó con acetonitrilo anhidro, y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando éter de petróleo/acetato de etilo/piridina (30-40% acetato de etilo; 0,2% piridina, v/v) como eluyente para rendir un aceite. Este aceite se disolvió en diclorometano (1 cm<sup>3</sup>), y se precipitó un producto a partir de éter de petróleo (20 cm<sup>3</sup>) a  
15 -40°C con agitación enérgica. El precipitado se recolectó mediante filtración, y se coevaporó con acetonitrilo anhidro para rendir el nucleósido 10 (117 mg, 21%) como una espuma blanca. d<sub>p</sub> (CH<sub>3</sub>CN) 149,9, 149,3.

*Preparación de oligonucleótidos de LNA*

## Ejemplo 10

20 *Síntesis de oligonucleótidos modificados y oligonucleótidos que comprenden L-ribo-LNA derivados del fosforamidito 10 (Fórmula X)*

Los L-ribo-LNA y los oligonucleótidos de referencia se prepararon en un Sintetizador de ADN Biosearch 8750. El acoplamiento del amidito 10 se realizó mediante "acoplamiento a mano" (mezclando previamente el amidito y el  
25 activador en acetonitrilo en una jeringa; enjuagando el reactor en columna aproximadamente dos veces cada minuto a lo largo del tiempo de acoplamiento aplicado; soportes sólidos de CPG). La síntesis de los L-ribo-LNA se llevó a cabo usando hidrocloreto de piridina como activador (10-30 min de tiempo de acoplamiento; los rendimientos del acoplamiento paso a paso para el amidito 10 fueron del 96-99%). Los 2'-desoxinucleósido-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamiditos sin modificar se acoplaron mediante el uso de programa de ADN estándar del sintetizador, excepto  
30 para los acoplamientos que seguían inmediatamente a un monómero X, los cuales se realizaron de acuerdo con el programa de ARN del sintetizador. Una vez completadas las secuencias, la desprotección usando amoniaco concentrado en metanol (32% (p/p), temperatura ambiente, 12 h) de los oligos 5'-O-DMT-ON, y la purificación posterior en fase inversa (cartuchos comercialmente disponibles (Cruachem); el procedimiento incluye la destilación), rindió  
35 los productos oligoméricos finales. Sin embargo, en el caso de los oligonucleótidos no modificados y los L-ribo-LNA que comprendían sólo un monómero X, el grupo 5'-O-DMT se eliminó en el sintetizador inmediatamente después de completarse la secuencia. El tratamiento posterior con amoniaco concentrado en metanol (32% (p/p), 12 h, 55°C) y la precipitación con etanol rindieron los oligómeros producto. La electroforesis en gel capilar se usó para analizar la pureza de los L-ribo-LNA sintetizados.

*Datos de hibridación*

## Ejemplo 11

45 *Termoestabilidad de los oligonucleótidos que comprenden el monómero X*

La termoestabilidad de los oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA se determinó espectrofotométricamente usando un espectrofotómetro equipado con un elemento Peltier termorregulado. Las mezclas de hibridación de 1 ml se prepararon usando una solución de tampón medio salino (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM  
50 EDTA), y cantidades equimolares (1 μM o 1,5 μM) de los diferentes oligonucleótidos modificados con L-ribo-LNA y sus oligonucleótidos de ADN o ARN complementarios. Como referencias se prepararon mezclas de hibridación idénticas usando los oligonucleótidos no modificados. Se registró la absorbancia a 260 nm mientras se incrementaba la temperatura linealmente entre 10-90°C (1°C/min). Las temperaturas de fusión (valores de T<sub>m</sub>) se obtuvieron como los máximos (± 1°C) de la primera derivada de las curvas de fusión. Las Tablas 1-3 resumen los resultados (los L-ribo-LNA están marcados con negrita). La Figura 2 ilustra el L-ribo-LNA monomérico usado.

A partir de la Tabla 1 puede observarse que la incorporación de uno o más monómeros X de α-L-ribo-LNA en una secuencia de oligonucleótido (A) y (B) no cambia la afinidad de unión de los α-L-ribo-LNA hacia el ADN complementario, mientras que la afinidad de unión hacia el ARN complementario está fuertemente incrementada.

60 La Tabla 2 muestra los estudios de unión de LNA diastereoisoméricos de homo-timina hacia el ARN (rA<sub>14</sub>), ARN con un único emparejamiento erróneo (5'-r(A<sub>6</sub>CA<sub>7</sub>)), ARN enantiomérico (ent-rA<sub>14</sub>), y ARN enantiomérico con un único emparejamiento erróneo (ent-5'-r(A<sub>6</sub>CA<sub>7</sub>)).

65 La Tabla 3 muestra los estudios de unión de ADN 9-meros de secuencia mixta, LNA y α-L-ribo-LNA.

## ES 2 283 298 T3

### Procedimiento alternativo

#### Ejemplo 12

##### 5 *1-(3-O-bencil-2,5-di-O-metanosulfonil-4-C-(metanosulfoniloximetil)-β-D-xilofuranosil)timina (11)*

A una solución del nucleósido 5 (1100 mg, 2,91 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (20 cm<sup>3</sup>) se le añadió piridina anhidra (5 cm<sup>3</sup>), seguida por cloruro de metanosulfonilo (1,2 ml, 15,5 mmol). La mezcla se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 18 horas, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad bajo presión reducida y se disolvió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato sódico (3 × 10 cm<sup>3</sup>) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La fase orgánica se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (2% metanol, v/v) como eluyente para proporcionar el nucleósido 11 (908 mg, 51%). δ<sub>C</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 163,3, 150,6, 135,6, 134,6, 128,7, 128,3, 112,2, 87,9, 85,0, 83,1, 80,9, 77,2, 76,9, 76,6, 73,3, 66,6, 66,2, 38,6, 37,6, 37,6, 12,2.

#### 15 Ejemplo 13

##### *(1R,3R,4S,7R)-1-(hidroximetil)-7-benciloxi-3-(timin-1-il)-2,5-dioxabicyclo-[2.2.1]heptano (12)*

20 A una solución del nucleósido 11 (329 mg, 0,54 mmol) en etanol/agua (10 cm<sup>3</sup>, 1:1, v/v) se le añadió NaOH 6 M (aq) (0,9 ml, 5,4 mmol). La mezcla se sometió a reflujo a 80°C durante 43 h, seguida por evaporación a sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano/metanol (2,4% metanol, v/v) como eluyente para proporcionar el nucleósido 12 (85 mg, 44%). δ<sub>C</sub> ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 163,8, 150,3, 138,0, 135,8, 128,3, 127,7, 127,5, 108,0, 90,2, 86,5, 86,4, 79,3, 76,5, 72,5, 71,2, 57,2, 40,2, 40,0, 39,8, 39,6, 39,4, 39,2, 39,0, 12,3.

#### Ejemplo 14

##### *Síntesis del nucleósido 8 a partir del nucleósido 12*

30 La protección con DMT estándar del grupo hidroxilo primario del nucleósido 12 (por ejemplo, usando el mismo procedimiento que para la preparación del nucleósido 6 mediante la protección con FTM del grupo hidroxilo primario del nucleósido 5) rendirá el nucleósido 8, el cual puede usarse en la síntesis del derivado fosforamidito de nucleósido α-L-ribo-LNA 10 (ver la Figura 2 y los ejemplos relevantes).

#### 35 Ejemplo 15

##### *9-(2-O-acetil-5-O-benzoil-4-C-(benzoiloximetil)-3-O-bencil-α-L-ribofuranosil)-6-N-benzoiladenina (14)*

40 Se disolvió el azúcar 3 (2,05 g) en acetonitrilo anhidro (30 ml). Se añadieron N-6-benzoiladenina (1,86 g) seguida por SnCl<sub>4</sub> (1,3 ml), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3,7 h, transcurridas las cuales se añadió una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta la neutralización. Después de la filtración a través de Celite, el filtrado se lavó sucesivamente con una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 × 150 ml) y H<sub>2</sub>O (2 × 150 ml), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (40-60% NaOAc en éter de petróleo) para rendir un intermediario del nucleósido completamente protegido (1,40 g, rendimiento del 52%). Este intermediario (1,29 g) se disolvió en metanol (35 ml), y se añadió una solución saturada de NH<sub>3</sub> en metanol (35 ml). Después de agitarla a 0°C durante 2,3 h, se evaporó la mezcla a sequedad bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (1% de metanol en diclorometano) para rendir un intermediario, el cual se disolvió en diclorometano anhidro (40 ml). Después de enfriarla hasta -50°C, se añadió piridina anhidra (3 ml) junto con trifluorometanosulfónico anhídrido (0,65 ml). Después de agitarla durante 50 min, se añadió trifluorometanosulfónico anhídrido (0,65 ml) adicional, y se continuó la agitación a -10°C durante 1 h. Se añadió diclorometano (100 ml) y se realizó el lavado usando una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 × 100 ml). La fase orgánica separada se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó a sequedad bajo presión reducida para rendir un intermediario. Este intermediario se disolvió en tolueno (20 ml) y KOAc (0,85 g), y se añadió 18-corona-6 (0,92 g), y la mezcla resultante se agitó a 80°C durante 7 h, transcurridas las cuales, la evaporación a sequedad bajo presión reducida rindió un residuo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (0-1,5% metanol en diclorometano) para rendir el nucleósido 14 (1,1 g, 84% para tres pasos). δ<sub>C</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 168,8, 165,8, 142,7, 136,0, 133,5, 133,3, 132,7, 129,6, 129,6, 128,8, 128,6, 128,5, 128,4, 128,4, 128,1, 127,8, 83,8, 82,2, 78,4, 74,3, 70,8, 64,7, 63,4, 20,5. MS (m/z) 742,0 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 60 Ejemplo 16

##### *(1R,3R,4S,7R)-7-benciloxi-1-hidroximetil-3-(N-6-benzoiladenin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (15)*

65 El nucleósido 14 (3,05 g) se disolvió en una solución saturada de NH<sub>3</sub> en metanol (200 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 4 días, transcurridos los cuales se añadió una solución acuosa al 33% de NH<sub>3</sub> (60 ml), y se continuó la agitación durante 4 h. La mezcla se evaporó a sequedad bajo presión reducida para rendir un intermediario, el cual se disolvió en piridina anhidra (100 ml). Se añadió TMSCI (7,8 ml) y se continuó la agitación a temperatura ambiente

## ES 2 283 298 T3

durante 5 h. Después de enfriarla hasta 0°C, se añadió cloruro de benzoilo (2,4 ml), y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió H<sub>2</sub>O (50 ml), seguida, 5 min más tarde, por una solución acuosa saturada al 25% de NH<sub>3</sub> (25 ml). Después de agitarla durante 20 min a temperatura ambiente, se evaporó la mezcla a sequedad bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (2-5% de metanol en diclorometano) para rendir un intermediario (1,76 g, 87% a lo largo de los dos pasos). Este intermediario (326 mg) se disolvió en piridina anhidra (50 ml), y se añadió cloruro de mesilo (0,11 ml) a 0°C con agitación. Después de agitarla durante 2 h, se añadió H<sub>2</sub>O (5 ml) y se redujo el volumen de la mezcla hasta aproximadamente el 50% mediante evaporación bajo presión reducida. Se añadió diclorometano (100 ml), y se realizó el lavado con una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 × 20 ml). Se secó la fase orgánica (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (2-4% metanol en diclorometano) para rendir un intermediario (284 mg). Este intermediario (354 mg) se disolvió en una mezcla de dioxano (15 ml), H<sub>2</sub>O (15 ml) y NaOH 2 M (5,5 ml). Después de agitarla durante 72 h bajo reflujo, se añadió una solución al 7% (p/p) se HCl en dioxano hasta la neutralización. El lavado se realizó con una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 × 100 ml), y la fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (0-4% metanol en diclorometano) para rendir el nucleósido bicíclico 15 (24 mg).  $\delta_C$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 156,0, 152,6, 149,4, 138,8, 138,0, 128,3, 127,7, 127,5, 118,3, 89,7, 83,9, 79,7, 77,0, 73,0, 71,2, 57,2.  $\delta_H$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 8,38 (1H, s), 8,14 (1H, s), 7,40-7,30 (7H, m), 6,37 (1H, s), 5,06 (1H, t, J 5,8 Hz), 4,73-4,66 (3H, m), 4,46 (1H, s), 4,15 (1H, d, J 8,4 Hz), 4,04 (1H, d, J 8,2 Hz), 3,75 (2H, d, J 5,7 Hz).

### 20 Ejemplo 17

*(1S,3R,4S,7R)-7-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-3-(6-N-benzoiladenin-9-il)-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptano (16)*

25 Se espera que la protección con DMT del nucleósido 15, seguida por la debencilación y la 3'-O-fosfitilación proporcionen el derivado fosforamidito 16. Otra ruta posible que rinde el 16 a partir del nucleósido 15 es la debencilación de 15 seguida por la protección selectiva con DMT del grupo hidroxilo primario y la eventual 3'-O-fosfitilación. Las reacciones esbozadas en este ejemplo siguen procedimientos estándares (Consulta, por ejemplo: Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel, J., *Tetrahedron*, 54:3607 (1998)).

TABLA 1

35

Secuencia <sup>a</sup>		T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup>
5' -T <sub>7</sub> X <sub>1</sub> T <sub>6</sub>	(A)	32	33
5' -T <sub>5</sub> X <sub>4</sub> T <sub>5</sub>	(C)	36	46
5' -T <sub>3</sub> (Y) <sub>4</sub> (X) <sub>4</sub> T <sub>3</sub>	(F)	64	63
5' -X <sub>9</sub> T	(G)	63	66
5' -T <sub>10</sub>	(E')	24/20	18
5' -T <sub>14</sub>	(E)	32	28
<sup>a</sup> X = monómero derivado del fosforamidito 10 Y = LNA monómeros que contienen un puente 2'-O,4'-C-metileno, cf. Singh et al. (ver más arriba)			
<sup>b</sup> Complejado con 5'-dA <sub>14</sub>			
<sup>c</sup> Complejado con 5'-rA <sub>14</sub>			

60

65

ES 2 283 298 T3

TABLA 2

Secuencia <sup>a</sup>	rA <sub>14</sub> T <sub>m</sub> (°C)	5'-r(A <sub>6</sub> CA <sub>7</sub> ) T <sub>m</sub> (°C)	ent-rA <sub>14</sub> T <sub>m</sub> (°C)	ent-5'- r(A <sub>6</sub> CA <sub>7</sub> ) T <sub>m</sub> (°C)
T <sub>10</sub>	18	sin T <sub>m</sub> <sup>c</sup>	sin T <sub>m</sub> <sup>c</sup>	sin T <sub>m</sub> <sup>c</sup>
5'-(Y) <sub>9</sub> T	71	61	52	51
5'-(X) <sub>9</sub> T	66	49	39	sin T <sub>m</sub> <sup>c</sup>
5'-(xilo-Y) <sub>9</sub> T	57	47	39	36
5'-(xilo-X) <sub>9</sub> T	sin T <sub>m</sub> <sup>d</sup>	sin T <sub>m</sub> <sup>d</sup>	sin T <sub>m</sub> <sup>d</sup>	sin T <sub>m</sub> <sup>d</sup>

<sup>a</sup> como más arriba para la TABLA 1;  
<sup>d</sup> no se midió un punto de fusión cooperativo en el rango de temperaturas 10-95°C

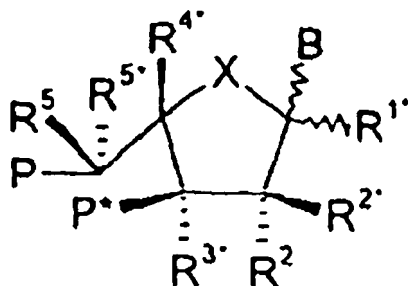
TABLA 3

N= Entrada	5'-d(GZGAZAZGC) vs:					
	3'-d(CACTNTACG)			3'-r(CACUNUACG)		
	A T <sub>m</sub> (°C)	C T <sub>m</sub> (°C)	T T <sub>m</sub> (°C)	G T <sub>m</sub> (°C)	A T <sub>m</sub> (°C)	C T <sub>m</sub> (°C)
1 Z = T	28/28*	11/13*	12/15 *	19/20*	28/29*	10/no T <sub>m</sub> *
2 Z = Y	44	23	27	30	50	33
3 Z = X	37	19	19	28	45	23

\* resultados de dos experimentos idénticos

## REIVINDICACIONES

1. Oligómero que comprende al menos un análogo de nucleósido con la Fórmula general I



en donde X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R<sup>N\*</sup>)-, -C(R<sup>6</sup>R<sup>6\*</sup>)-;

B se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C<sub>1-4</sub>-alcoxilo opcionalmente sustituido, C<sub>1-4</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>1-4</sub>-aciloxilo opcionalmente sustituido, nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos;

P designa la posición radical para un enlace internucleósidos a un monómero sucesivo, o un grupo 5'-terminal, tal enlace internucleósidos o grupo 5'-terminal incluyendo opcionalmente el sustituyente R<sup>5</sup> o, de forma igualmente aplicable, el sustituyente R<sup>5\*</sup>;

P\* designa un enlace internucleósidos a un monómero precedente, o un grupo 3'-terminal;

R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> juntos designan un birradical consistente en 1-4 grupos/átomos seleccionados de entre -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>a</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=N-, -O-, -Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-, -S-, -SO<sub>2</sub>-, -N(R<sup>a</sup>)-, y >C=Z, en donde Z se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R<sup>a</sup>)-, y R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre el hidrógeno, C<sub>1-2</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alqueno opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquenoil opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxilo, C<sub>2-12</sub>-alquenoiloxilo, carboxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxycarbonilo, C<sub>1-12</sub>-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino-C<sub>1-6</sub>-alquil-aminocarbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, C<sub>1-6</sub>-alquilsulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquitio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> juntos pueden designar una olefina de metileno (=CH<sub>2</sub>) opcionalmente sustituida;

cada uno de los sustituyentes R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5\*</sup>, R<sup>6</sup>, y R<sup>6\*</sup> que está presente se selecciona independientemente de entre el hidrógeno, C<sub>1-2</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquenoil opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquenoil opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxilo, C<sub>2-12</sub>-alquenoiloxilo, carboxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxycarbonilo, C<sub>1-12</sub>-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino-C<sub>1-6</sub>-alquil-aminocarbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, C<sub>1-6</sub>-alquilsulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquitio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, tioxo, imino, u metileno opcionalmente sustituido, o juntos pueden formar un birradical spiro, consistente de una cadena de alqueno de 1-5 átomos de carbono, la cual está interrumpida opcionalmente y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR<sup>N</sup>)-, en donde R<sup>N</sup> se seleccionan de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo, y en donde dos sustituyente adyacente (no geminales) pueden designar un enlace adicional resultante en un doble enlace; y R<sup>N\*</sup>, cuando está presente, se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo;

y sales básicas y sales por adición de ácido de los mismos.

2. Oligómero según la reivindicación 1, que comprende 1-10.000 L-ribo-LNA de la Fórmula general I, y 0-10.000 nucleósidos seleccionados de entre nucleósidos que existen de forma natural y análogos de nucleósidos, a condición de que la suma del número de nucleósidos y el número de L-ribo-LNA es al menos 2, preferiblemente al menos 3, tal como en el rango de 2-15.000.

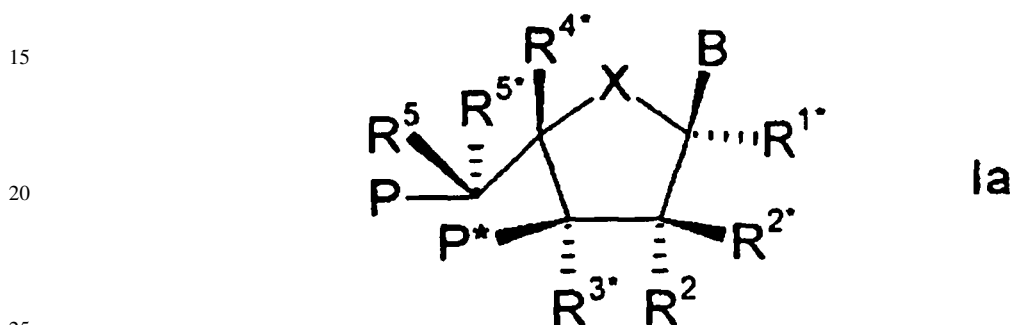
## ES 2 283 298 T3

3. Oligómero según la reivindicación 2, en donde al menos un L-ribo-LNA comprende una nucleobase como el sustituyente B.

4. Oligómero según la reivindicación 2, en donde el oligonucleótido comprende al menos 7, preferiblemente al menos 9, en particular al menos 11, especialmente al menos 13 monómeros de L-ribo-LNA sucesivos.

5. Oligómero según la reivindicación 2, en donde todos los monómeros de nucleósido de un oligómero son L-ribo-LNA.

6. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el/los L-ribo-LNA tiene/tienen la siguiente Fórmula Ia



en donde P, P\*, B, X, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>2\*</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>4\*</sup>, R<sup>5</sup>, y R<sup>5\*</sup> son tal y como se definieron en la reivindicación 1.

7. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde X se selecciona de entre -(CR<sup>6\*</sup>R<sup>6\*</sup>)-, -O-, -S-, y -N(R<sup>N\*</sup>)-, preferiblemente -O-, -S-, y -N(R<sup>N\*</sup>)-, en particular -O-.

8. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el birradical constituido por R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> se selecciona de entre -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-Y-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-Y-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-Y-, -Y-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-Y-, -Y-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-Y-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-, -Y-, -Y-Y-, en donde cada Y se selecciona independientemente de entre -O-, -S-, -Si(R<sup>\*</sup>)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>\*</sup>)-, >C=O-, -C(=O)-N(R<sup>\*</sup>)-, y -N(R<sup>\*</sup>)-C(=O)-, cada R<sup>\*</sup> se selecciona independientemente de entre hidrógeno, halógeno, azido, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, y/o dos R<sup>\*</sup> adyacentes (no geminales) pueden juntos designar un doble enlace, y cada uno de r y s es 0-4, a condición de que la suma r+s sea 1-4.

9. Oligómero según la reivindicación 8, en donde el birradical se selecciona de entre -Y-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-Y-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, e -Y-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-Y-, en donde cada uno de r y s es 0-3, a condición de que la suma r+s sea 1-4.

10. Oligómero según la reivindicación 9, en donde el birradical se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R<sup>\*</sup>)-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s+1</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-, -N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, -O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-, -S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-, -O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-, -N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-, -O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-, -S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-, -N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-, -N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-, y -S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-, en donde cada uno de r y s es 0-3, a condición de que la suma r+s sea 1-4, y en donde X se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R<sup>H</sup>)-, en donde R<sup>H</sup> designa hidrógeno o C<sub>1-4</sub>-alquilo.

11. Oligómero según la reivindicación 10, en donde X es O, R<sup>2</sup> se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, y C<sub>1-6</sub>-alcoxilo opcionalmente sustituido, y R<sup>1\*</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, y R<sup>5\*</sup> designan hidrógeno.

12. Oligómero según la reivindicación 11, en donde el birradical se selecciona de entre -O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, y -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-N(R<sup>N</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, tal como -O-CH<sub>2</sub>-, -S-CH<sub>2</sub>- y -N(R<sup>N</sup>)-CH<sub>2</sub>-.

13. Oligómero según la reivindicación 11 ó reivindicación 12, en donde B se selecciona de entre las nucleobases.

14. Oligómero según la reivindicación 8, en donde el birradical es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-.

15. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde un R<sup>\*</sup> se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, y cualesquier sustituyentes R<sup>\*</sup> restantes son hidrógeno.

16. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde cualesquier enlaces internucleósido de los L-ribo-LNA se selecciona de entre enlaces consistentes de 2 a 4, preferiblemente 3, grupos/átomos seleccionados

## ES 2 283 298 T3

de entre  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $>\text{C}=\text{O}$ ,  $>\text{C}=\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $>\text{C}=\text{S}$ ,  $-\text{Si}(\text{R}'')$ ,  $-\text{SO}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{P}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{P}(\text{O},\text{S})-$ ,  $-\text{P}(\text{S})_2-$ ,  $-\text{PO}(\text{R}''')$ ,  $-\text{PO}(\text{OCH}_3)-$ , y  $-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-$ , en donde  $\text{R}^{\text{H}}$  se selecciona de entre hidrógeno y  $\text{C}_{1-4}$ -alquilo, y  $\text{R}''$  se selecciona de entre  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo y fenilo.

5 17. Oligómero según la reivindicación 16, en donde cualquier enlace internucleósido de los L-ribo-LNA se selecciona de entre  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CSNR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{C}(=\text{NR}^{\text{H}})-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{OCO}-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}=\text{CH}_2-\text{ONR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-$ ,  $-\text{O}-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{SO}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}''')-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_3)-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{BH}_3)-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{NR}^{\text{H}})-\text{O}-$ , y  $-\text{O}-\text{Si}(\text{R}'')$ .

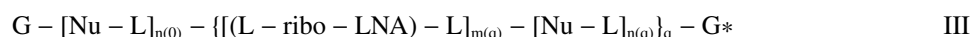
18. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde cada uno de los sustituyentes  $\text{R}^{1*}$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^{3*}$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^{5*}$ ,  $\text{R}^6$ , y  $\text{R}^{6*}$  del L-ribo-LNA, que está presente, se selecciona independientemente de entre hidrógeno,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo,  $\text{C}_{2-6}$ -alqueno opcionalmente sustituido, hidroxilo,  $\text{C}_{1-6}$ -alcoxilo,  $\text{C}_{2-6}$ -alquenoiloxilo, carboxilo,  $\text{C}_{1-6}$ -alcoxicarbonilo,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilcarbonilo, formilo, amino, mono- y di( $\text{C}_{1-6}$ -alquil)amino, carbamoilo, mono- y di( $\text{C}_{1-6}$ -alquil)amino-carbonilo,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilcarbonilamino, carbamido, azido,  $\text{C}_{1-6}$ -alcanoiloxilo, sulfono, sulfanilo,  $\text{C}_{1-6}$ -alquiltio, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, y en donde  $\text{R}^{\text{N}}$ , cuando está presente, y no se está implicado en un birradical, se selecciona de entre hidrógeno y  $\text{C}_{1-4}$ -alquilo.

19. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde X se selecciona de entre  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ , y  $-\text{NR}^{\text{N}}$ , y cada uno de los sustituyentes  $\text{R}^{1*}$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^{3*}$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^{5*}$ ,  $\text{R}^6$ , y  $\text{R}^{6*}$  del L-ribo-LNA, que están presentes, designa un hidrógeno.

20. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde P es un grupo 5'-terminal seleccionado de entre hidrógeno, hidroxilo,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{1-6}$ -alcoxilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilcarboniloxilo opcionalmente sustituido, ariloxilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, y  $-\text{W}-\text{A}'$ , en donde W se selecciona de entre  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ , y  $-\text{N}(\text{R}^{\text{H}})-$ , en donde  $\text{R}^{\text{H}}$  se selecciona de entre hidrógeno y  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo, y en donde  $\text{A}'$  se selecciona de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos.

21. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde  $\text{P}^*$  es un grupo 3'-terminal seleccionado de entre hidrógeno, hidroxilo,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{1-6}$ -alcoxilo opcionalmente sustituido,  $\text{C}_{1-6}$ -alquilcarboniloxilo opcionalmente sustituido, ariloxilo opcionalmente sustituido, y  $-\text{W}-\text{A}'$ , en donde W se selecciona de entre  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ , y  $-\text{N}(\text{R}^{\text{H}})-$ , en donde  $\text{R}^{\text{H}}$  se selecciona de entre hidrógeno y  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo, y en donde  $\text{A}'$  se selecciona de entre intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos.

22. Oligómero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que tiene la siguiente Fórmula III:



en donde,

q es 1-50;

cada uno de  $\text{n}(0)$ , ...,  $\text{n}(q)$  es independientemente 0-10000;

cada uno de  $\text{m}(1)$ , ...,  $\text{m}(q)$  es independientemente 1-10000;

a condición de que la suma de  $\text{n}(0)$ , ...,  $\text{n}(q)$  y  $\text{m}(1)$ , ...,  $\text{m}(q)$  sea 2-15000;

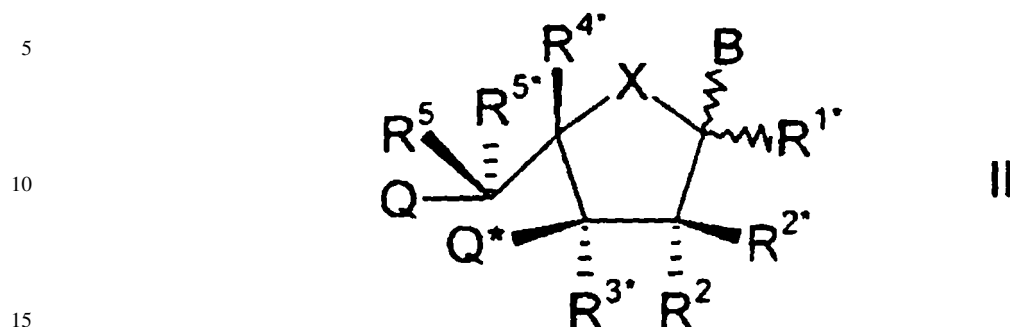
G designa un grupo 5'-terminal;

cada Nu designa independientemente un nucleósido seleccionado a partir de nucleósidos de existen de forma natural y análogos de nucleósidos;

cada L-ribo-LNA designa independientemente un análogo de nucleósido; cada L designa independientemente un enlace internucleósido entre dos grupos seleccionados de entre Nu y L-ribo-LNA, o L junto con  $\text{G}^*$  designan un grupo 3'-terminal;

cada L-ribo-LNA-L designa independientemente un análogo de nucleósido con la Fórmula general I.

23. Análogo de nucleósido (L-ribo-LNA) de la Fórmula general II.



20 en donde el sustituyente B se selecciona de entre nucleobases, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos;

X se selecciona de entre -O-, -S-, -N(R<sup>N\*</sup>)-, -C(R<sup>6\*</sup>R<sup>6\*</sup>)-;

25 cada uno de Q y Q\* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, amino, Prot-N(R<sup>H</sup>)-, Act-N(R<sup>H</sup>)-, mono- ó di(C<sub>1-6</sub>-alquil) amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alqueniolo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquenioloxi opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquinilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquiniloxi opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH<sub>2</sub>-, Act-O-CH<sub>2</sub>-, aminometilo, Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo protector respectivamente para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), Act es un grupo de activación respectivamente para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-6</sub>-alquilo; y

35 R<sup>2\*</sup> y R<sup>4\*</sup> juntos designan un birradical seleccionado de entre -O-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s+1</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, -(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-, -O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-, -S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-, -O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-, -N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-, -O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-, -S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-, -N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-, -N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-, y -S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-;

40 en donde cada R\* se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, mercapto, amino, mono- o di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, y/o dos R\* adyacentes (no geminales) pueden juntos designar un doble enlace, y cada uno de r y s es 0-3, a condición de que la suma r+1 sea 1-4;

45 cada uno de los sustituyentes R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5\*</sup>, R<sup>6</sup>, y R<sup>6\*</sup> se selecciona independientemente de entre el hidrógeno, C<sub>1-2</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alqueniolo opcionalmente sustituido, C<sub>2-12</sub>-alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxilo, C<sub>2-12</sub>-alquenioloxi, carboxilo, C<sub>1-12</sub>-alcoxicarbonilo, C<sub>1-12</sub>-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, amino-C<sub>1-6</sub>-alquilaminocarbonilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino-C<sub>1-6</sub>-alquil-aminocarbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, C<sub>1-6</sub>-alquilsulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, halógeno, intercaladores del ADN, grupos intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, tioxo, imino, u metileno opcionalmente sustituido, o juntos pueden formar un birradical spiro, consistente de una cadena de alqueno de 1-5 átomos de carbono, la cual está interrumpida opcionalmente y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de entre -O-, -S-, y -(NR<sup>N</sup>)-, en donde R<sup>N</sup> se seleccionan de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo, y en donde dos sustituyente adyacente (no geminales) pueden designar un enlace adicional resultante en un doble enlace; y R<sup>N\*</sup>, cuando está presente, se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo;

60 y sus sales básicas y sales por adición de ácido.

y a condición de que cualquier grupo químico (incluyendo cualquier nucleobase) que sea reactivo en las condiciones que predominan en la síntesis de oligonucleótidos tenga opcionalmente protegido su grupo funcional.

65 24. Análogo de nucleósido según la reivindicación 23, en donde B se selecciona de entre las nucleobases y nucleobases con el grupo funcional protegido.

## ES 2 283 298 T3

25. Análogo de nucleósido según la reivindicación 23 ó reivindicación 24, en donde X se selecciona de entre -O-, -S-, y -N(R<sup>N\*</sup>)-.

26. Análogo de nucleósido según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde cada uno de los sustituyentes R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5\*</sup>, R<sup>6</sup>, y R<sup>6\*</sup>, que está presente, se selecciona independientemente de entre hidrógeno, C<sub>1-6</sub>-alquilo, C<sub>2-6</sub>-alqueno opcionalmente sustituido, hidroxilo, C<sub>1-6</sub>-alcoxilo, C<sub>2-6</sub>-alquenoiloxilo, carboxilo, C<sub>1-6</sub>-alcoxi-carbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilo, formilo, amino, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(C<sub>1-6</sub>-alquil)-amino-carbonilo, C<sub>1-6</sub>-alquilcarbonilamino, carbamido, azido, C<sub>1-6</sub>-alcanoiloxilo, sulfono, sulfanilo, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en donde dos sustituyentes geminales juntos pueden designar oxo, y en donde R<sup>N\*</sup>, cuando está presente, y no se está implicado en un birradical, se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-4</sub>-alquilo, a condición de que cualquier hidroxilo, amino, mono(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, sulfanilo, y carboxilo esté opcionalmente protegido.

27. Análogo de nucleósido según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, cada uno de los sustituyentes R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5\*</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>6\*</sup>, que está presente, designa hidrógeno.

28. Análogo de nucleósido según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, en donde Q se selecciona independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, mercapto, Prot-S-, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, amino, Prot-N(R<sup>H</sup>)-, mono- ó di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alqueno opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquenoiloxilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquinoiloxilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquinoxilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxilo, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH<sub>2</sub>-, aminometilo, Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo protector respectivamente para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-6</sub>-alquilo; y Q<sup>\*</sup> se selecciona de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Act-O-, mercapto, Act-S-, C<sub>1-6</sub>-alquiltio, amino, Act-N(R<sup>H</sup>)-, mono- ó di(C<sub>1-6</sub>-alquil)amino, C<sub>1-6</sub>-alcoxi opcionalmente sustituido, C<sub>1-6</sub>-alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alqueno opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquenoiloxilo opcionalmente sustituido, C<sub>2-6</sub>-alquinoxilo opcionalmente sustituido, monofosfato, difosfato, trifosfato, intercaladores del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxilo, sulfono, en donde Act es un grupo de activación respectivamente para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y C<sub>1-6</sub>-alquilo.

29. Análogo de nucleósido según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en donde X es O, R<sup>2</sup> se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, y C<sub>1-6</sub>-alcoxilo opcionalmente sustituido, y R<sup>1\*</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, y R<sup>5\*</sup> designan hidrógeno.

30. Análogo de nucleósido según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29, en donde el birradical se selecciona de entre -O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, y -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-N(R<sup>N</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-.

31. Análogo de nucleósido según la reivindicación 30, en donde el birradical se selecciona de entre -O-CH<sub>2</sub>-, -S-CH<sub>2</sub>- y -N(R<sup>N</sup>)-CH<sub>2</sub>-.

32. Análogo de nucleósido según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 31, en donde el birradical es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-, preferiblemente -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-.

33. Conjugado de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, y un compuesto seleccionado de entre las proteínas, amplicones, enzimas, polisacáridos, anticuerpos, haptenos, péptidos y PNA.

34. Uso de un L-ribo-LNA tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32 para la preparación de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

35. Uso según la reivindicación 34, en donde la incorporación de L-ribo-LNA modula la capacidad del oligonucleótido para actuar como un sustrato para los enzimas activos de ácidos nucleicos.

36. Uso de un L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, para la preparación de un conjugado de un oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA, y un compuesto seleccionado de entre las proteínas, amplicones, enzimas, polisacáridos, anticuerpos, haptenos, péptidos y PNA.

37. Uso de un L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, como un sustrato para enzimas activos sobre ácidos nucleicos.

38. Uso según la reivindicación 37, en donde el L-ribo-LNA se usa como un sustrato para las polimerasas de ADN y ARN.

39. L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, para uso como un agente terapéutico.

## ES 2 283 298 T3

40. Uso de uno o más L-ribo-LNA, tal y como se definieron en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, en la construcción de una superficie sólida sobre la cual se unen oligonucleótidos modificados con LNA y de diferentes secuencias.
- 5 41. Uso de oligómeros modificados con L-ribo-LNA (ribozimas), tal y como se definieron en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el corte específico para la secuencia de ácidos nucleicos diana.
42. Oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para su uso en terapia, tal como un antisentido, un anti-gen, o un gen activador terapéutico.
- 10 43. Oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA según la reivindicación 42 para su uso en terapia, en donde el oligonucleótido modificado con LNA recluta la RNAsaH.
44. Complejos de más de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, estando definido dicho oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para su uso en terapia, tal como un antisentido, un anti-gen, o un gen activador terapéutico.
- 15 45. Oligonucleótido (oligómero) modificado con  $\alpha$ -L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 22, para su uso en terapia, en donde el oligonucleótido modificado con  $\alpha$ -L-ribo-LNA interacciona específicamente con ARN seleccionado de entre el grupo consistente en ARNt, ARNr, ARNsn y ARNsc, inhibiendo de ese modo cualquiera de los siguientes procesos celulares, seleccionados de entre el grupo consistente en traducción, ajuste del ARN, procesamiento del ARN, y otros procesos celulares esenciales.
- 20 46. Oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 22, para su uso en diagnósticos, tales como para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos.
- 25 47. Oligonucleótido (oligómero) modificado con  $\alpha$ -L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 22, para su uso en diagnósticos, tales como para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, siendo dicho oligonucleótido modificado con  $\alpha$ -L-ribo-LNA capaz de discriminar entre ARN y ADN, permitiendo de ese modo la hibridación selectiva con el ARN diana.
- 30 48. Oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA, según la reivindicación 46 o reivindicación 47, en donde el oligonucleótido comprende un grupo fotoquímicamente activo, un grupo termoquímicamente activo, un grupo quelante, un grupo indicador, o un ligando, que facilitan la detección directa o indirecta del oligonucleótido, o la inmovilización del oligonucleótido sobre un soporte sólido.
- 35 49. Oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA, según la reivindicación 48, en donde el grupo fotoquímicamente activo, el grupo termoquímicamente activo, el grupo quelante, el grupo indicador, o el ligando incluyen un espaciador (K), comprendiendo dicho espaciador un grupo separable químicamente.
- 40 50. Oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA, según la reivindicación 49, en donde el grupo fotoquímicamente activo, el grupo termoquímicamente activo, el grupo quelante, el grupo indicador, o el ligando, están unidos a través de un birradical (es decir, como R\*) de al menos uno de los LNA del oligonucleótido.
- 45 51. Oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA, según la reivindicación 50 para uso en diagnósticos tales como para la captura y detección de ácidos nucleicos que existen de forma natural o son sintéticos, de hebra doble o hebra simple, tales como el ARN o el ADN.
- 50 52. Oligonucleótido modificado con L-ribo-LNA, según la reivindicación 47 para uso en diagnósticos, tales como para la purificación de ácidos nucleicos que existen de forma natural, de hebra doble o hebra simple, tales como el ARN o el ADN.
- 55 53. Oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para su uso como un aptámero en el diagnóstico molecular.
54. Uso no terapéutico de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, como un aptámero en procesos catalíticos mediador por ARN.
- 60 55. Uso no terapéutico de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, como un aptámero en la unión específica de antibióticos, fármacos, aminoácidos, péptidos, proteínas estructurales, receptores de proteínas, enzimas de proteínas, sacáridos, polisacáridos, cofactores biológicos, ácidos nucleicos, o trifosfatos.
- 65 56. Uso no terapéutico de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, como un aptámero en la separación de enantiómeros a partir de mezclas racémicas mediante unión estereoespecífica.

## ES 2 283 298 T3

57. Uso no terapéutico de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para el etiquetado de células.

5 58. Uso de un L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, con propósitos diagnósticos.

59. Uso de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para hibridar los ARN celulares no codificantes de proteínas, tales como el ARNt, ARNr, ARNsn y ARNsc, *in vivo* o *in vitro*.

10 60. Uso de un oligonucleótido (oligómero) modificado con L-ribo-LNA, tal y como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en la construcción de un oligonucleótido que comprende un fluoróforo y un atenuador, ubicados de tal forma que el estado hibridado del oligonucleótido puede distinguirse del estado no unido del oligonucleótido mediante un incremento en la señal fluorescente procedente de la sonda.

15 61. Equipo para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, comprendiendo el equipo un cuerpo de reacción, y uno o más oligonucleótidos (oligómeros) modificados con L-ribo-LNA tal y como se definieron en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

20 62. Equipo para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación, o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, comprendiendo el equipo un cuerpo de reacción, y uno o más L-ribo-LNA, tal y como se definieron en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32.

25 63. Equipo según la reivindicación 62, en donde los L-ribo-LNA están inmovilizados sobre dicho cuerpo de reacciones.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

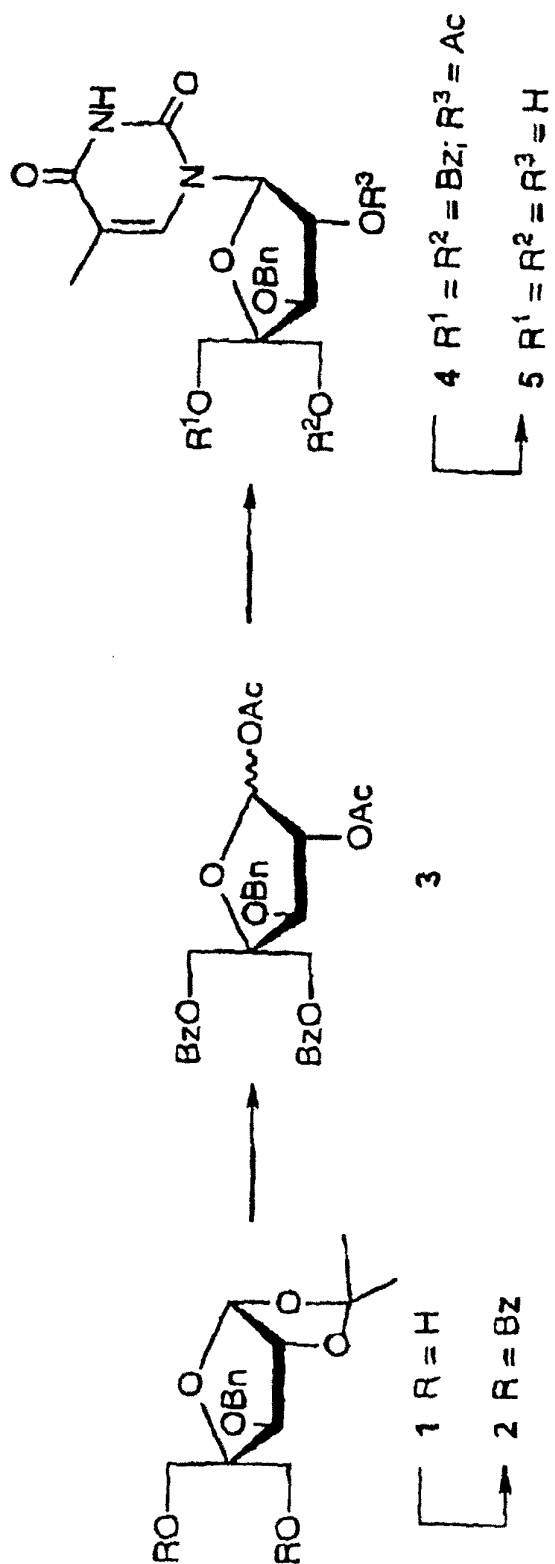
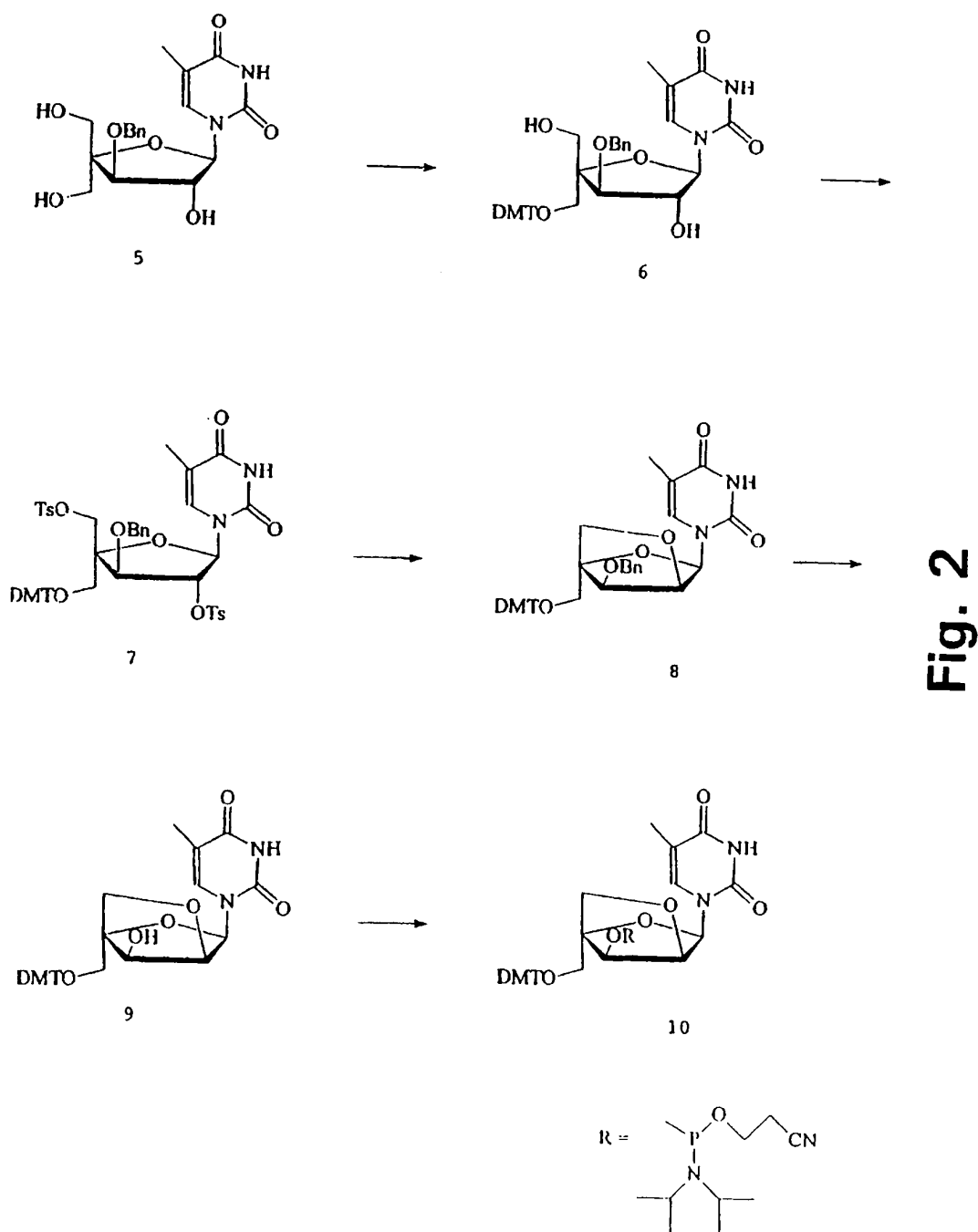


Fig. 1



**Fig. 2**

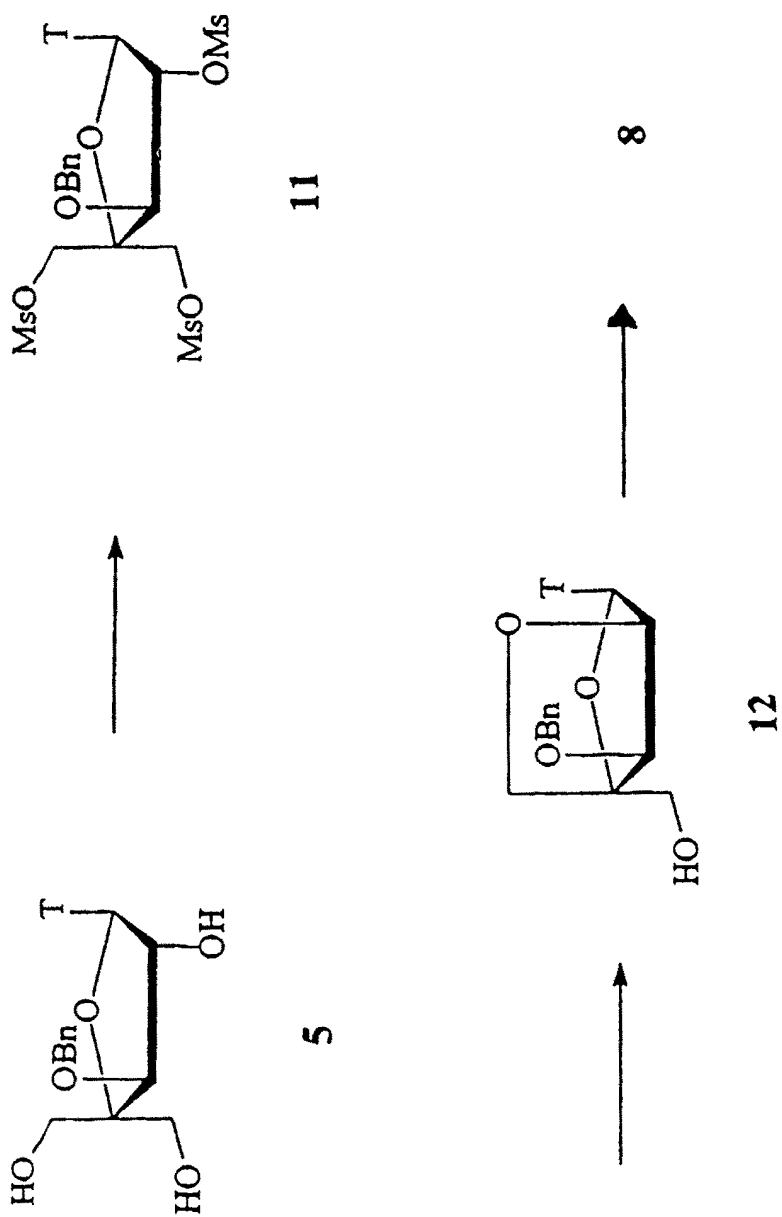


Fig. 3

Fig. 3

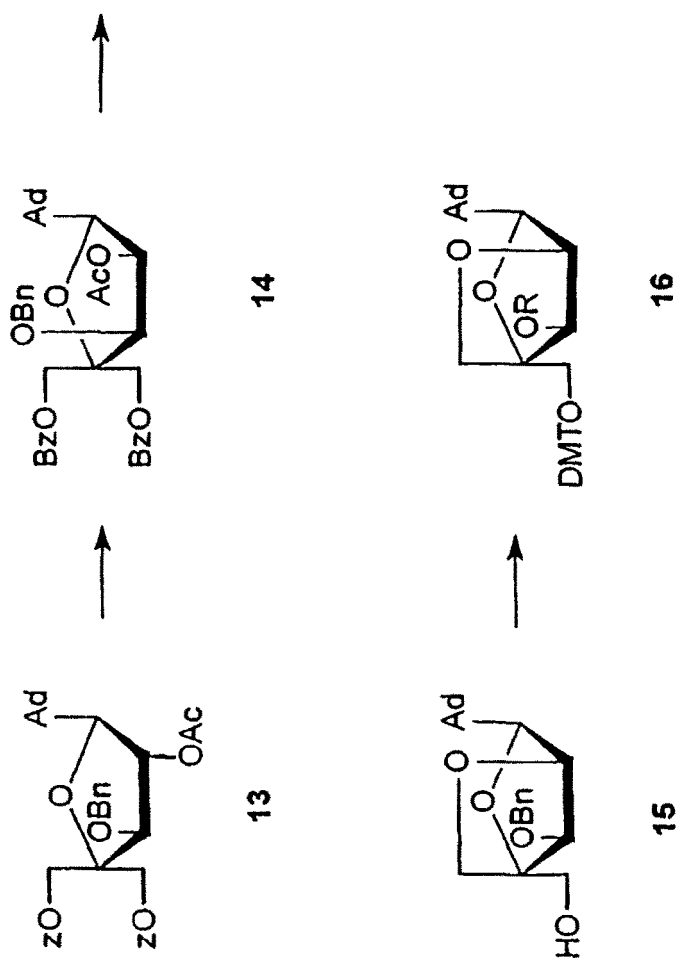


Fig. 4

Fig. 4