



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 886**

51 Int. Cl.:
C07H 19/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C07F 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03780024 .0**
86 Fecha de presentación : **21.11.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1565479**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54 Título: **Derivado de ribonucleósido 2'-O-sililoximetil trisustituido y el método para la preparación del mismo.**

30 Prioridad: **22.11.2002 GB 0227352**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es: **Natt, François, Jean-Charles;**
Hunziker, Jürg;
Hall, Jonathan y
Martin, Pierre

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 266 886 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

Derivado de ribonucleosido 2'-O-siloximetil trisustituido y el método para la preparación del mismo.

5 **Campo de la invención**

La invención está en el campo de la química de ácido nucleico y los métodos concernientes para la preparación y empleo de un derivado de ribonucleósidos con grupos protectores novedosos. Los compuestos inventivos son particularmente adaptados para la preparación automatizada de los oligoribonucleótidos.

10 **Antecedentes de la invención**

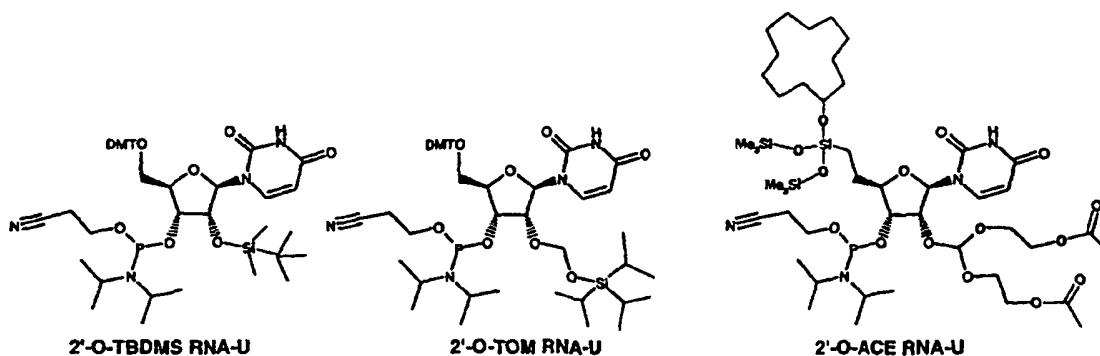
Las aplicaciones para ácidos nucleicos sintéticos son numerosas y claves para el entendimiento de procedimientos biológicos. Entre estas aplicaciones, el uso de oligonucleótidos sintéticos para la reducción de la expresión específica de proteínas por hibridación específica en la célula del oligonucleótido sintético a un mRNA se conoce como un mecanismo antisentido y ha sido descrito ampliamente (1). Más recientemente, la interferencia del ARN, una técnica utilizando dsARN conocido como siARN, ha sido empleada exitosamente para inhibir la traducción de mRNA de un mamífero a su proteína (2). La gran promesa de la tecnología de ARN ha creado una necesidad para el desarrollo de la preparación de oligoribonucleótidos sintéticos eficiente y rentable.

La síntesis de oligoribonucleótidos es más rebatible que la síntesis de oligodeoxinucleótidos, principalmente a causa del grupo 2'-OH que está presente en ácidos ribonucleicos, pero no en ácidos deoxiribonucleicos. La síntesis química de oligoribonucleótidos normalmente se basa en un derivado protegido de ribonucleósido inmovilizado sobre una fase sólida al cual además los derivados de ribonucleótidos protegidos son acoplados en etapas consecutivas de un ciclo de síntesis cada uno hasta que la longitud de la cadena deseada sea conseguida. Asegurar una síntesis eficiente y evitar la degradación de ARN durante el proceso de preparación, la estrategia del grupo protector por el grupo 2'-OH sería perfectamente ortogonal con aquellos de otros grupos protectores y el grupo protector sería retirado tan tarde como sea posible en el proceso. Hasta el momento, principalmente los siguientes tipos de grupos de protección han sido empleados para proteger el grupo 2'-OH:

La química 2'-O-TBDMS es el grupo protector comúnmente utilizado para la síntesis de ARN (3). Este es ortogonal con otros grupos protectores. Sin embargo, la migración fosforil 2'-3' durante la síntesis de oligoribonucleótido ha sido reportada (4). Además, el impedimento estérico del grupo de t-butildimetilsilil cerca del reactivo fosforamidita disminuye significativamente la eficiencia de acoplamiento. La última limitación puede ser reducida pero al precio de tiempos más largos de acoplamiento, el uso de excesos molares más altos de reactivos y activadores de fosforamidita como por ejemplo 5-(Benzilmercaptop)-1H-tetrazol (5).

La química de 2'-O-ACE ha sido descrita por Caruthers *et al.* (6) como una alternativa a la química de TBDMS. Allí, el 2'-OH es protegido por un ácido ortoéster inestable. En comparación con TBDMS, el impedimento bajo de este grupo protector permite tasas de acoplamiento más altas. La inestabilidad del ácido de 2' ortoéster requiere una protección temporal del 5'-OH con un ácido-no inestable. Se logró con grupos silil trisustituidos que se retiran al final de cada ciclo de acoplamiento mediante una que contiene fluoruro. Por lo tanto, los reactivos para la preparación de bloques de construcción de 2'-O-ACE tienen que ser escalados específicamente. Tal desprotección 5' puede en algunos casos ser problemática: requiere un sintetizador resistente dedicado a iones fluoruro y no es posible el uso de los soportes basados en silica empleados comúnmente (similares a Cristal de Poro Controlado). Química 2'-O-TOM se ha reportado por Pitsch *et al.* (6). Como para la estrategia del grupo protector 2'-OTBDMS, el grupo protector 2'-O-TOM se retira sobre el tratamiento con iones fluoruro. Originalmente, se desarrollo para permitir la síntesis de ARN sin la migración fosforil 2'-3' observada con 2'-O-TBDMS. En este caso, debido al acetal natural del enlace entre el nucleósido y el grupo protector, la no-migración del grupo protector en una posición diferente en el ribonucleótido derivado, en particular, puede ocurrir en la posición-O-3' adyacente. Tal isomerización es un problema conocido en la síntesis de las unidades de ARN 2'-O-silil-sustituidas convencionales.

Una ventaja importante adicional de este grupo protector es la barrera más baja del grupo protector debido al acetal espaciador entre el 2'-oxígeno y el grupo triisopropilsilil voluminoso.



Ambos 2'-O-TOM y 2'-O-ACE están favoreciendo las producciones del acoplamiento acercándose a aquellas observadas en la síntesis de oligodeoxinucleótido. Las producciones de acoplamiento satisfactorias también son obtenibles con química de 2'-O-TBDMS pero en el precio de activadores poco usuales o de excesos molares más altos de bloques de construcción. En todos los casos, los bloques de construcción mencionados están contribuyendo en gran medida a los costos de fabricación de oligoribonucleótidos. En segundo lugar, el procedimiento post-sintético de oligoribonucleótidos es más evidente como comparado con el procedimiento de oligodeoxiribonucleótidos. El último aspecto puede ser de especial importancia cuando la demanda del alto-rendimiento tiene que ser satisfecha.

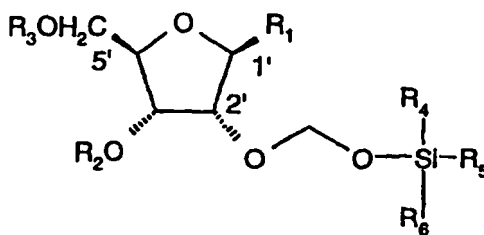
Hay una necesidad para mejorar los bloques de construcción de ARN que son accesibles fácilmente y permiten un procedimiento post-sintético más sencillo.

Grupos sililoximetil sustituidos han sido utilizados como grupos protectores de grupos hidroxil en el pasado (7, 8). El impedimento estérico de sustituyentes sobre un átomo de Si modula la estabilidad y retiran las condiciones del grupo protector. Por ejemplo, han sido reportados, carbonos terciarios que soportan el sililoximetil adyacente al átomo de Si (7), en estos casos, la producción para la sustracción de los grupos protectores eran subóptimas con respecto a esas observadas usualmente con la protección TBDMS, y aparentemente no adecuada para la síntesis de oligoribonucleótidos en fase sólida.

Ahora, la presente invención suministra grupos novedosos y mejorados para la protección en la posición 2'-OH de derivados de ribonucleósidos que particularmente son adecuadas para la síntesis automatizada de oligoribonucleótidos en fase sólida. Se proporciona un nuevo procedimiento para la preparación de estos bloques de construcción. Finalmente, se revela el empleo de estos bloques de construcción en la síntesis en fase sólida del ARN.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un derivado de ribonucleósidos de la fórmula



en donde

R₁ es una base de la familia de purina- o pirimidina- o un derivado de una familia base o un derivado de una base o cualquier otro residuo que sirve como un sustituto de una nucleobase,

R₂ es un protón o un derivado sustituido de ácido fosfónico,

R₃ es un protón o un grupo protector para el átomo de oxígeno en la posición 5',

R₄, R₅ y R₆ son independientemente un grupo alquilo o arilo o una combinación de alquilo y arilo o heteroátomo, R₄, R₅ o R₆ puede también estar cíclicamente conectados entre sí;

y

en donde al menos uno de los sustituyentes R₄, R₅ o R₆ comprende un átomo de C terciario o un heteroátomo cercano al átomo de Si.

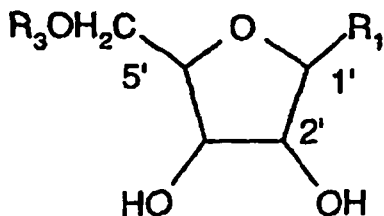
En un aspecto preferido, el sustituyente que comprende el átomo de C terciario cercano al átomo de Si comprende desde 4 a 24 átomos de C, más preferiblemente desde 5 a 24 átomos de C y aún más preferiblemente desde 6 a 24 átomos de C. en un aspecto más preferido, el sustituyente que comprende el átomo de C terciario cercano al átomo de Si es un alquilo-sustituyente seleccionado del grupo que consiste de ter-butil, ter-pentil, ter-hexil, ter-heptil, ter-octil, ter-nonil, ter-decil, ter-undecil, ter-dodecil. En otro aspecto preferido, el sustituyente que comprende el átomo de C terciario cercano al átomo de Si es seleccionado del grupo de 1,1-dimetil etil, 1,1-dimetil-propil, 1,1-dimetil-butil, 1,1-dimetil-pentil, 1,1-dimetil-hexil, texil (1,1,2-trimetil-propil), 1,1,2-trimetil-butil, 1,1,2-trimetil-pentil, 1,1,2-trimetil-hexil, 1,1,2,2-tetrametil-propil, 1,1,2,2-tetrametil-butil. En una modalidad más preferida, los sustituyentes de los grupos anteriores comprenden al menos 5 átomos de C, más preferiblemente al menos 6 átomos de C.

En un aspecto relacionado, la presente invención provee un derivado de ribonucleósidos en donde el sustituyente

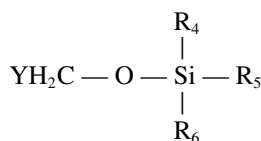
ES 2 266 886 T3

cercano al átomo de Si comprende un heteroátomo sustituido. En un aspecto preferido, el sustituyente cercano al átomo de Si comprende un heteroátomo bivalente sustituido, en un aspecto más preferido este sustituyente es oxígeno.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para la preparación de un derivado de ribonucleósido, que comprende la reacción de un nucleósido con la fórmula:

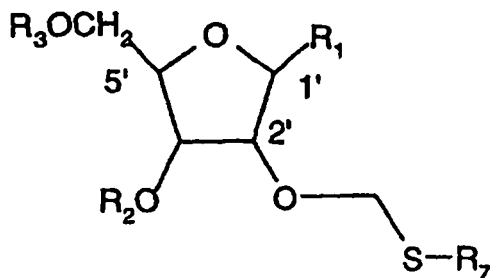


donde R_1 y R_3 son como se definieron arriba, con un derivado de sililoximetil de la fórmula

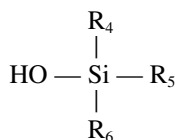


en donde Y es un grupo marginal apropiado y en donde R_4 , R_5 y R_6 son independientemente un grupo alquilo o arilo o una combinación de alquilo y arilo o un heteroátomo, R_4 , R_5 o R_6 también pueden estar cíclicamente conectados entre sí. En una modalidad preferida Y es halógeno. En otra modalidad preferida, R_4 , R_5 y R_6 juntos comprenden entre 6 y 30 átomos de carbono. En una modalidad preferida adicional, R_4 , R_5 y R_6 comprende al menos un heteroátomo sustituido cercano al átomo de Si, que es preferiblemente un átomo bivalente, más preferiblemente oxígeno. El derivado de ribonucleósido además puede ser sustituido sobre el oxígeno en la posición 3' con un grupo que consiste de un derivado de ácido fosfónico.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para la preparación de un derivado de ribonucleósido, que comprende la reacción de un derivado de ribonucleósido con la fórmula



bajo una activación electrofílica con un compuesto de fórmula:



en donde R_1 se define como arriba y R_7 es un grupo alquilo- o arilo-, o un grupo alquilo-arilo-,

en donde R_2 es un grupo protector,

en donde R_3 es un grupo protector,

en donde R_4 , R_5 y R_6 son como se definieron arriba.

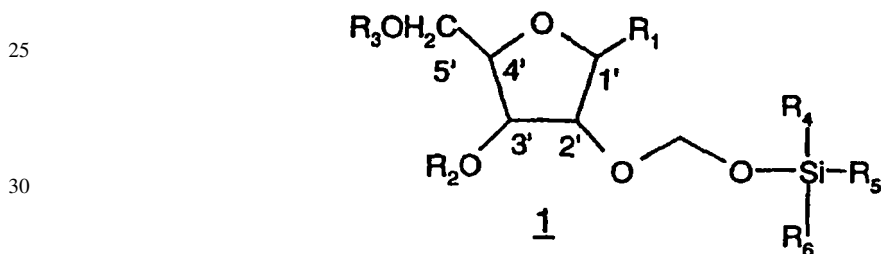
En una modalidad preferida, el derivado de ribonucleósido es adicionalmente sustituido sobre el oxígeno en la posición 3' con un grupo que consiste de un derivado de ácido fosfónico.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

5	TBDMS	t-butildimetilsilil
	ACE	bis[2-(acetiloxi)etoxi]metil
	TOM	(triisopropilsilil)oximetil
10	THEX	[((1,1,2-trimetil-propil)-dimetilsilil)]-oximetil
	DCA	Ácido dicloroacético
15	dsRNA	ARN bicatenario
	siRNA	ARN de pequeña interferencia.

20 La presente invención se relaciona con derivados de ribonucleótido 2'-O-siloximetil para una aplicación en la síntesis química de ácidos ribonucleicos que comprende una unidad de D o L-ribosa que tiene la siguiente fórmula estructural general:



35 Según la cual

40 R_1 es un base de la familia purina- o pirimidina- o un derivado de una base o cualquier otro residuo que sirve como un sustituto de una nucleobase, R_2 es un protón o un derivado sustituido de ácido fosfónico, R_3 es un protón o un grupo protector para el átomo de oxígeno en la posición 5', y R_4 , R_5 y R_6 son independientemente grupos alquilo- o arilo- o un grupo alquilo-arilo-. R_4 , R_5 o R_6 también pueden estar cíclicamente conectados entre sí.

45 La protección del grupo R_3 en la posición -O-5'- es por ejemplo un grupo monometoxitritil- o dimetoxitritil- o un grupo diferente, apropiado que se retira a partir del aumento de la secuencia durante la construcción de la cadena tal como liberar una posición del enlace para el acoplamiento de la siguiente unidad para ser adicionada a la cadena.

50 El R_1 componente base del derivado de ribonucleósido es preferiblemente una base de la familia de purina o pirimidina, por ejemplo una de las cinco nucleobases adenina, citosina, timina, uracil, guanina o un derivado de estos, o cualquier otro residuo que sirve como un sustituto de una nucleobase. Este puede ser protegido por un acil-sustituyente que puede ser retirado después de la creación de la cadena.

55 En la posición -O-3'-, R_2 es un derivado de ácido fosfónico, tal como un grupo fosoramidita N, N- y O-sustituido, por lo cual los N-sustituyentes son grupos alquilo- o arilo- que adicionalmente pueden ser sustituidos y/o conectados cíclicamente entre sí. Por la activación del nitrógeno del grupo amino- disustituido, el centro del fósforo se activa por acoplamiento de la unidad a una cadena en aumento.

60 Esta invención ahora provee nuevos y ventajosos grupos protectores 2'-O-siloximetil en donde R_4 , R_5 o R_6 es independientemente un alquilo- o arilo-sustituyente, o un alquilo-arilo- o arilo-alquilo o un heteroátomo sustituido sustituyente, y en donde al menos uno de los R_4 , R_5 o R_6 sustituyentes comprende un heteroátomo o un átomo de C terciario como puede ser representado por la fórmula



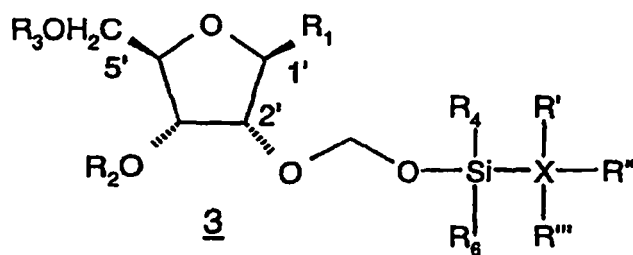
2

en donde R', R'' y R''' son alquilo- o arilo, o un alquilo-arilo-sustituyente- o arilo-alquilo o un heteroátomo sustituido, y en donde R', R'' y R''' no son H. R', R'' y R''' pueden ser iguales o diferentes, sustituyentes preferidos son los que comprenden de 1 a 12 átomos de C, preferiblemente 1 a 6 átomos de C y más preferiblemente son 1 a 4 átomos de C. R', R'' y R''' también pueden estar cíclicamente conectados entre sí, por ejemplo R' puede estar cíclicamente conectado a R'' o R''', o R'' puede estar cíclicamente conectado a R''''. En una modalidad preferida, dos de los sustituyentes son idénticos y comprenden desde 1 a 6 átomos de C, preferiblemente desde 1 a 4 átomos de C. El tercer sustituyente comprende preferiblemente al menos 3 átomos de C, preferidos son desde 3 a 12 átomos de C, más preferidos son desde 3 a 6 átomos de C.

De esta manera, en una modalidad al menos uno de los sustituyentes R₄, R₅ y/o R₆ es (C₄ a C₂₄)-terciario-alquilo y/o arilo, preferiblemente (C₅ a C₁₈)-terciario-alquilo y/o arilo, más preferiblemente (C₆ a C₁₂)-terciario-alquilo y/o arilo, en donde el átomo de C terciario es adyacente al átomo de Si. Sin tener la intención de ser limitante de estos grupos, ejemplos de tales sustituyentes pueden comprender por ejemplo, ter-butil, ter-pentil, ter-hexil, ter-heptil, ter-octil, ter-nonil, ter-decil, ter-undecil, terdodecil, texil (1,1,2-trimetil-propil), 1,1,2-trimetil-butil, 1,1,2-trimetil-pentil, 1,1,2-trimetil-hexil, 1,1,2,2 tetrametil-propil, 1,1,2,2-tetrametil-butil. En una modalidad preferida, el sustituyente es ter-pentil o más alto, en una modalidad más preferida el sustituyente es ter-hexil o más alto. Ejemplos más preferidos comprenden por ejemplo 1,1 dimetil-etil, 1,1-dimetil-propil, 1,1-dimetil-butil, 1,1-dimetil-pentil, 1,1-dimetil-hexil, 1,1,2-trimetil-propil, 1,1,2-trimetilbutil, 1,1,2-trimetil-pentil, 1,1,2-trimetil-hexil, 1,1,2,2-tetrametil-propil, 1,1,2,2-tetrametil-butil. En otra modalidad R₄, R₅ y/o R₆ comprenden un heteroátomo.

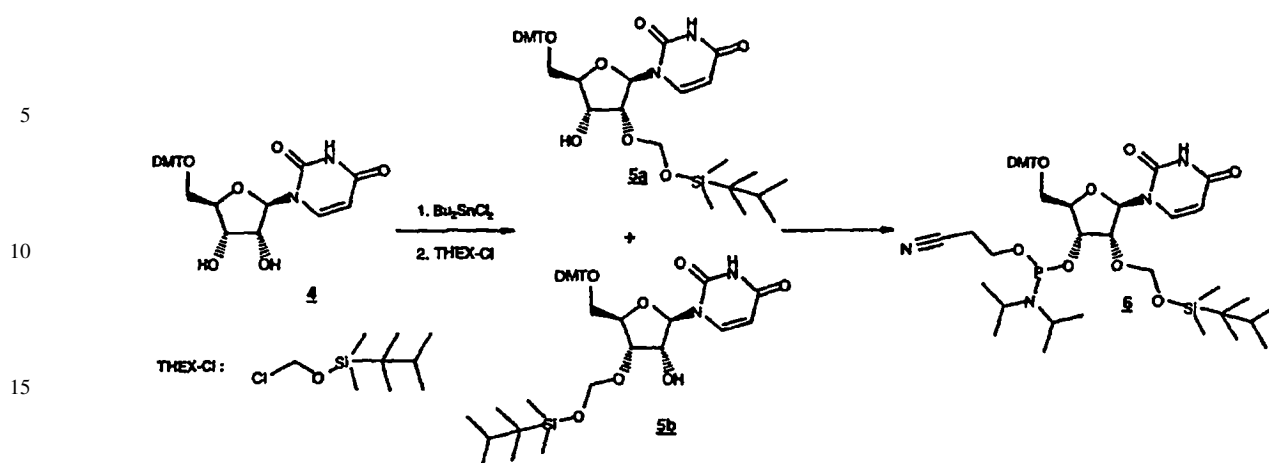
El sustituyente(s) que no comprende un átomo de C terciario puede tener idénticos o diferentes sustituyentes. Estos sustituyentes son preferiblemente sustituyentes alquilo- o arilo-, o sustituyentes alquilo-arilo-. Preferidos son los sustituyentes que comprenden desde 1 a 12 átomos de C, preferiblemente desde 1 a 8 átomos de C, más preferiblemente desde 1 a 4 átomos de C. Sin tener la intención de ser limitante a estos grupos, ejemplos se tales sustituyentes pueden comprender por ejemplo metil, etil, propil, butil, pentil, hexil, i-propil, sec-butil, isobutil, sec-pentil.

En otra modalidad, R₄, R₅ y/o R₆ comprenden un heteroátomo sustituido similar por ejemplo silicio, germanio, estaño, plomo, nitrógeno, oxígeno, azufre tal como por ejemplo puede estar representado por un heteroátomo "cuatrovalente" por la fórmula:



en donde X es Si o Ge, Sn o Pb y en donde R', R'' y R''' se definen en cuanto a la fórmula 2, y R₄ y R₆ se definen como arriba. Cualquiera de los sustituyentes R₄, R₅ o R₆ puede comprender el heteroátomo cercano al átomo de Si, se prefiere solo uno como se ilustra en la fórmula 3. Para heteroátomos "bivalentes" como el oxígeno, o para heteroátomos trivalentes como el nitrógeno la fórmula 3 puede adaptarse consecuentemente como una persona de habilidad en el oficio lo reconocería fácilmente. En una modalidad preferida de la presente invención, X es oxígeno.

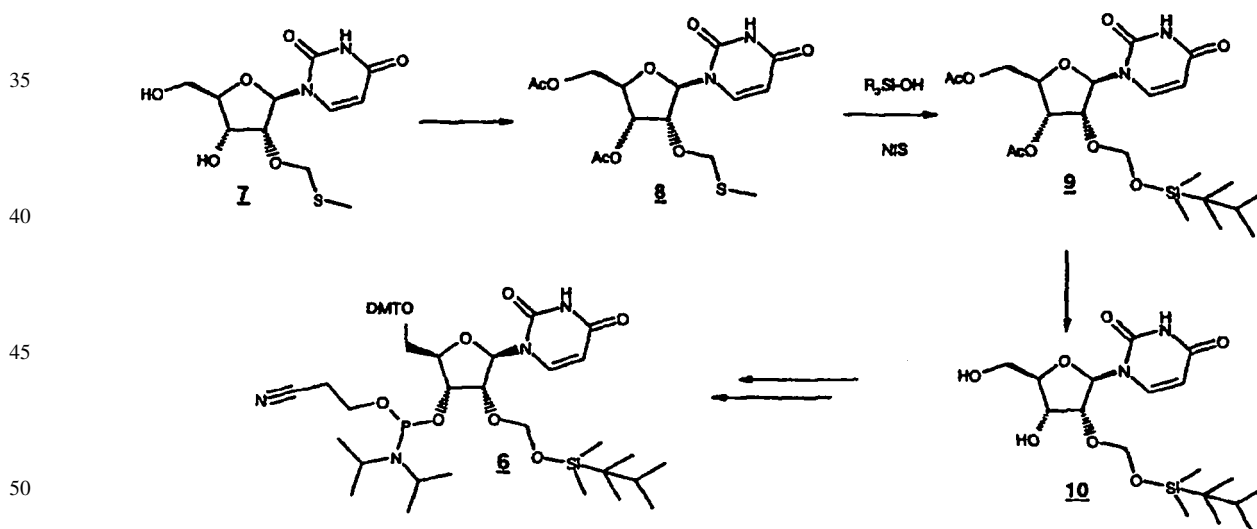
El compuesto se puede preparar por métodos conocidos en el oficio tal como por medio de la ruta de organometálicos. Esta ruta se describe por ejemplo en WO99/09044 (6). La reacción 4 → 5a/5b → 6 muestra un ejemplo de la preparación de un compuesto de la presente invención por medio de la ruta de organometálicos. Brevemente, un ribonucleósido protegido en el 5'-O se hace reaccionar con por ejemplo clorometil[dimetil-(1,1,2-trimetilpropil)silil] éter (o THEX-Cl) en la presencia de una sal organometálica apropiada, tal como por ejemplo dibutilindocloruro o dibutiltinóxido. El THEX-Cl por si mismo se prepara de una manera similar al TOM-Cl de acuerdo con un procedimiento publicado (7). Sin embargo, TOM-Cl diferente, la preparación del THEX-Cl no requiere una etapa de destilación final del reactivo previo a la reacción con el ribonucleósido que representa una simplificación significativa. En la reacción del THEX-Cl con un ribonucleósido 5'-O-protégido se obtiene una mezcla de ribonucleósidos 2'- y 3'-protegidos, de donde el ribonucleósido 2'-sustituido se purifica mediante por ejemplo métodos cromatográficos. En una etapa subsiguiente el grupo 3'-OH del compuesto purificado 5a se convierte en la fosforamida 6 de acuerdo con los métodos conocidos en el oficio (Sinha, N.D. *et al.*, Tetrahedron Lett. 1983, 24, 5843; Sinha, N.D. *et al.*, Ácido nucleico Res. 1984, 12, 4539). Este método requiere el uso de sililoximetil éteres sustituidos en donde los sustituyentes contienen grupos alquilo, arilo, o ariloalquilo y que pueden estar cíclicamente conectados. En una modalidad adicional, este método es aplicable a los sililoximetiléteres en donde al menos uno de los sustituyentes contiene al menos un heteroátomo sustituido como por ejemplo silicio, germanio, estaño, plomo, nitrógeno, oxígeno, azufre



20 La reacción puede realizarse en solución o sobre fase sólida o mediante el uso de reactivos soporte de polímero. El solvente puede ser un solvente hidrocarburo, solvente etéreo, solvente nitrilo, solvente clorinado, solvente heterocíclico, solventes sulfoxido, etc... Ejemplos específicos de solventes apropiados incluyen piridina, N, N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfoxido (DMSO), acetonitrilo, dicloroetano y cloruro de metileno. Preferiblemente, se utiliza dicloroetano.

25 A pesar de que la reacción puede llevarse a cabo a temperatura ambiente, también puede realizarse a un rango de temperatura de 0 a 150°C preferiblemente a 10 a 100°C.

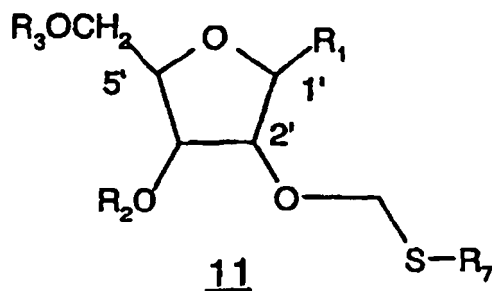
30 En un aspecto adicional de la presente invención, los compuestos de la invención se prepararon por un método nuevo y superior como se ilustra por la reacción 7 → 8 → 9 → 10 → 6.



55 Este método permite la introducción selectiva de los grupos protectores 2'-OH a través de, primero la introducción un grupo 2'-O-alkilotiometil, arilotiometil, alquiloarilotiometil o ariloalquilotiometil. Esto evita la etapa no selectiva descrita en la ruta de organometálicos. Este nuevo método es generalmente aplicable para la introducción de derivados oximetil selectivamente sobre el grupo 2'-OH de ribonucleósidos y no es restringido a la introducción de los grupos protectores como se describe arriba. Los métodos para la preparación de ribonucleótidos protegidos corrientemente conocidos en el oficio, tal como la ruta de organometálicos, no son 2'-3' selectivos para la introducción del grupo protector. Este método permite la introducción selectiva del grupo metilotiometil en la posición 2' y por esa razón evita una última etapa no selectiva en el esquema de síntesis.

65

En esta nueva ruta un 2'-O-alquiltiometil-ribonucleósido como puede ser representado por la fórmula



en donde R₇ es alquilo o arilo o una combinación de alquilo y arilo, se hace reaccionar con un silanol de la fórmula general HOSiR₄R₅R₆. En una modalidad preferida R₇ es un (C₁ a C₂₀)-, más preferido es (C₁ a C₁₀)- alquilo y/o arilo. En otra modalidad preferida R₇ es por ejemplo metil, etil, propil, butil, pentil, hexil, iso-propil, sec-butil, iso-butil, sec-pentil. Los sustituyentes R₄, R₅ y R₆ del silanol son idénticos o diferentes sustituyentes alquilo o arilo o un combinación de alquilo y arilo, o heteroátomos sustituidos y que también pueden estar cíclicamente conectados entre sí. En una modalidad preferida los tres sustituyentes juntos comprenden entre 3 y 30 átomos de carbono cada uno.

En otra modalidad preferida, el compuesto 11 se hace reaccionar con un silanol de la fórmula general HOSiR₄R₅R₆ con los sustituyentes R₄, R₅, R₆ como se definieron arriba, bajo condiciones apropiadas conocidas en el oficio. Estos comprenden un reactivo de activación electrofílica o un reactivo de combinación tal como, pero no limita a, por ejemplo N-halosuccinimidas y una cantidad catalítica de un ácido. La reacción puede ser llevada a cabo en solución o sobre fase sólida o por el uso de reactivos soporte de los polímeros. El solvente puede ser un solvente hidrocarburo, solvente etéreo, solvente nitrilo, solvente clorinado, solvente heterocíclico, solventes sulfoxido, etc... Ejemplos específicos de solventes apropiados incluyen piridina, N, N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfoxido (DMSO), acetonitrilo, dicloroetano y cloruro de metileno. Preferiblemente, se utiliza el diclorometano. A pesar de que la reacción puede ser llevada a cabo a temperatura ambiente, esta también se puede realizar a una temperatura de -78°C a 100°C preferiblemente de 0 a 50°C.

El alquiltiometil-sustituyente en el grupo 2'-OH comprende preferiblemente un grupo (C₁ a C₁₂)-alquilo y/o arilo, preferiblemente un grupo (C₁ a C₆)-alquilo y/o arilo. Ejemplos de sustituyentes preferidos comprenden metiltiometil, etiltiometil, propiltiometil, isopropiltiometil o butiltiometil.

Los siguientes Ejemplos ilustran la presente invención, sin de alguna manera limitar el alcance de la misma.

Ejemplos

1. Preparación de bloques de construcción THEX vía ruta organometálica

El esquema 1 representa el esquema sintético para la introducción del grupo protector THEX sobre Uridina 5'-O-DMTr y la subsiguiente fosfitilación.

Preparación de cloruro de (1,1,2-trimetil-propil)-dimetilsililoximetil (THEX-Cl)

Una suspensión de 11.1 ml (0.15 mol) etanolil y 4.5 g (0.15 mol) para-formaldehido se trato con dos gotas de NaOMe/MeOH (30%) y se agitó 1 h a 40°C. Después se enfrió, se adicionaron 150 ml de CH₂Cl₂ y 22.66 g (0.333 mol) de imidazol. Después de 10 minutos, se adicionaron 32.66 g (0.167 mol) de cloruro (1,1,2-trimetil-propil)-dimetilsilil gota a gota. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente por 24 horas y se diluyó con 300 ml de n-hexano. Después se adicionan 200 ml de una solución 2 M de NaH₂PO₄, se agitó (15 minutos) y se separaron las fases, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo se disolvió en 100 ml de CH₂Cl₂, se trató gota a gota con 12.3 ml (20.4 g, 0.152 mol) cloruro de sulfuril en 50 ml de CH₂Cl₂. Después de 1 hora, la mezcla se evaporó. El producto se obtuvo como cera (31.5 g). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.5 (s, 6H, SiMe₂); 0.65 (12H, CH₃); 1.40 (sept, 1H, CH); 5.43 (s, 2H, CH₂).

Preparación de 1-[5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-(((1,1,2-trimetil-propil)-dimetilsilil)]-oximetil-beta-D-ribofuranosilil-uracil (5a)

Una solución de 9.5 g (17.4 mmol) 5'-O-dimetoxitritilado uridina (1) en 200 ml 1,2-dicloroetano se trató con 11.23 g (87 mmol) base de Huenig y luego con 5.81 g (19.2 mmol) de dibutilindocloruro. Después de 30 minutos, la mezcla se calentó a 80°C, se trató con 4.2 g (22.6 mmol) cloruro de (1,1,2-trimetil-propil)-dimetilsililoximetil (THEX-Cl) en 50 ml de dicloroetano y se agitó dos horas a 80°C. Después se enfrió, la mezcla se diluyó con 400 ml de CH₂Cl₂ y se adicionaron 350 ml de solución acuosa de NaHCO₃ saturado. Después de agitar por 30 minutos, las capas se separaron

ES 2 266 886 T3

y la capa orgánica se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía sobre silica gel, utilizando acetato de etilo/hexano (3:1) que contiene 0.1% de N-metilmorfolina. El producto fue obtenido como espuma sólida (4.52 g).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.1 (s, 6H, CH₃); 0.6-0.8 (s y d, 12H, CH₃); 1.45 (m, 1H, CH); 3.15 (d, 2H, CH₂); 3.64 (s, 6H, OCH₃); 3.85 (q, 2H, CH₂); 4.05 (m, 1H, CH); 4.15 (m, 1H, CH); 4.80 (q, 2H, CH₂); 5.12 (d, 1H, OH); 5.30 (q, 1H, CH); 5.78 (d, 1H, CH); 6.8-5.3 (m, 13H); 7.6 (d, 1H).

Preparación de 1-[5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-(((1,1,2-trimetil-propil)-dimetilsilil)-oximetil-beta-D-ribofuranosil]-uracil-3'-(2-cianoetil-diisopropil)fosforamidita (6)

10

Una solución de 4.0 g (5.56 mmol) uridina protegida (2), 1.14 g (6.68 mmol) diisopropilaminotetrazolida y 2.01 g (6.68 mmol) bis(N, N-diisopropilamino)-2-cianoetoxi fosfina en 150 ml de CH₂Cl₂ se agitó 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 100 ml de CH₂Cl₂ y se lavó dos veces con 50 ml de solución acuosa de NaHCO₃ saturado. La fase orgánica secada (Na₂SO₄) se evaporó y el residuo se sometió a cromatografía de columna (acetato de etilo/ hexano 3:2 con adicional 0.1% N-metilmorfolina). El producto fue obtenido como una espuma sólida (4.12 g).

15

³¹P-NMR (400 MHz, CDCl₃): 151.183 (s) y 151.537 (s).

20 *2. Preparación de bloques de construcción THEX vía ruta 2'-O-metiltiometil 3',5'-O-Diacetil-2'-O-metiltiometil-uridina (8)*

Una solución de 4.53 g (14.8 mmol) de 2'-O-metiltiometil uridina 7 (8) en 50 ml piridina se trató con 3.04 g (29.7 mmol) de Ac₂O. Después de 24 de agitación, la solución se evaporó. El residuo se disolvió en 40 ml EtOAc, se lavo con agua y se secó con Na₂SO₄. Después de la evaporación, fue obtenido el compuesto de título puro (5.05 g).

25

3',5'-O-Diacetil-2-O-(((1,1,2-trimetil-propil)-dimetilsilil)-oximetil)-uridina (9)

Se adicionaron 0.33 g (1.47 mmol) de N-iodosuccinimida en 3 ml de THF a una solución de 0.5 g (1.287 mmol) 8, 0.978 g (6.1 mmol) (1,1,2-trimetil-propil)-dimetil silanol, 10 ml CH₂Cl₂ y 1 gota de MeOSO₃H. Después de agitar por 2, se adicionaron 2 ml NaHSO₃ (37%), Luego 100 ml de CH₂Cl₂. La capa orgánica se separó y se secó con Na₂SO₄. Después de la filtración, la solución se evaporó: 552 mg de compuesto de título puro.

30

2'-O-(((1,1,2-trimetil-propil)-dimetilsilil)-oximetil)-uridina (10)

35

Una solución de 187 mg (0.37 mmol) 9, 20 ml MeOH y 0.135 ml (0.74 mmol) NaOMe/MeOH (30%) se agitó 30min. a 0°C. Después de la evaporación, el residuo se filtro a través de una pequeña columna de silica gel (EtOAc/MeOH 4:1): 140 mg 10 como polvo.

40 *3. Procedimiento para la incorporación de 6 dentro de oligodeoxinucleótido por química de fosforamidita y rápida desprotección del mismo*

La síntesis de oligonucleótidos se desarrollo típicamente sobre un sintetizador de ADN automatizado ABI394 (Applied Biosystems). ADN Fosforamiditas, fosforamidita Uridina protegida THEX (6) o fosforamidita Uridina protegida TOM (Xeragon, Inc.) se disolvieron en acetonitrilo seco a una concentración del 5% w/v; el acoplamiento se hizo mediante la activación de fosforamiditas utilizando una solución de benzimidazolo triflato 0.2 M (9) en acetonitrilo. Los tiempos de acoplamiento fueron entre 1-5 minutos. Una primera cubierta se hizo utilizando reactivos de cubierta estándar. La oxidación se hizo utilizando una solución de yoduro 0.1 M en THF/agua/piridina (1:1:1). Una segunda cubierta se desarrollo después de la oxidación. La detritilación antes del próximo acoplamiento se efectuó con ácido dicloroacético al 2% en dicloroetano.

50

Sobre la terminación de la elongación de la cadena de oligonucleótido, el soporte sólido se transfirió a un tubo Eppendorf.

55 Cuando se preparó con fosforamidita Uridina protegida THEX (6), los oligonucleótidos se dividieron del soporte y se desprotegió como sigue:

1. 32% aq. Amoníaco/EtOH 3:1 (250 µl para una escala de 0.2 µmole), temperatura ambiente, 2 h liofilización a sequedad.

60

2. 1 M de fluoruro de tetrabutilamonio en THF (250 µl para una escala de 0.2 µmole), 30 min. a temperatura ambiente.

3. 1 M Tris.HCl, pH=7.4 (250 µl para una escala de 0.2 µmole).

65

Cuando se preparó con fosforamidita Uridina protegida TOM, los oligonucleótidos se dividieron del soporte y se desprotegió como sigue:

ES 2 266 886 T3

1. 32% aq. Amoníaco/EtOH 3:1 (250 μ l para una escala de 0.2 μ mole), temperatura ambiente, 2 h liofilización a sequedad.
2. 1 M fluoruro de tetrabutilamonio en THF (250 μ l para una escala de 0.2 μ mole), 6 h min a temperatura ambiente.
3. 1 M Tris.HCl, pH=7.4 (250 μ l para una escala de 0.2 μ mole).

Soluciones crudas resultantes se analizaron por Electroforesis Capilar en Gel.

Los resultados se resumieron en la tabla 1

#	Secuencia	TOM (% pureza)	THEX (% pureza)
<u>11</u>	TTT TTU TTT TTT TTT	85	79
<u>12</u>	TTT TTU UUU TTT TTT	67	72

Como se muestra en la tabla 1, y la figuras 1-4, la calidad del material crudo obtenido con fosforamidita Uridina protegida THEX 6 y fosforamidita Uridina protegida TOM son muy similares.

El uso de la estrategia del grupo protector 2'-O-THEX permitió la reducción de la desprotección de 2' desde 6 h a 35°C (como se reporta en la ref. 6) en 30 min a temperatura ambiente.

Referencias

1. De **Mesmaeker**, A., **Haener**, R., **Martin**, P., **Moser**, H.E. *Acc. Chem. Res.* 28 (1995), 366 and **Bennett**, C. **Frank**, **Cowsert**, **Lex M.** *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1, (1999), 359.

2. **Elbashir**, Sayda M.; **Harborth**, Jens; **Lendeckel**, Winfried; **Yalcin**, Abdullah; **Weber**, Klaus; **Tuschl**, Thomas. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* (London, United Kingdom) (2001), 411 (6836), 494-498.

3. **Usman**, N.; **Ogilvie**, K. K.; **Jiang**, M. Y.; **Cedergren**, R. J. The automated chemical synthesis of long oligonucleotides using 2'-O-silylated ribonucleoside 3'-O-phosphoramidites on a controlled-pore glass support: synthesis of a 43-nucleotide sequence similar to the 3'-half molecule of an *Escherichia coli* formylmethionine tRNA. *J. Am. Chem. Soc.* (1987), 109 (25), 7845-54.

4. **Morgan**, Michael A.; **Kazakov**, Sergei A.; **Hecht**, Sidney M. Phosphoryl migration during the chemical synthesis of RNA. *Nucleic Acids Research* (1995), 23 (19), 3949-53.

5. **Welz**, Rudiger; **Muller**, Sabine. 5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis. *Tetrahedron Letters* (2002), 43 (5), 795-797

6. **Pitsch**, Stefan; **Weiss**, Patrick A.; **Jenny**, Luzi; **Stutz**, Alfred; **Wu**, Xiaolin. Reliable chemical synthesis of oligonucleotides (RNA) with 2'-O-[(triisopropylsilyloxy)methyl (2'-O-tom)-protected phosphoramidites. *Helvetica Chimica Acta* (2001), 84 (12), 3773-3795.

7. **Gundersen**, Lise Lotte; **Benneche**, Tore; **Undheim**, Kjell. Chloromethoxysilanes as protecting reagents for sterically hindered alcohols. *Acta Chem. Scand.* (1989), 43(7), 706-9.

8. *Russian J. Bioorg. Chem.* 2000, 26, 327-333.

9. **Hayakawa**, Yoshihiro; **Kataoka**, Masanori; **Noyori**, Ryoji. Benzimidazolium Triflate as an Efficient Promoter for Nucleotide Synthesis via the Phosphoramidite Method. *Journal of Organic Chemistry* (1996), 61 (23), 7996-7997.

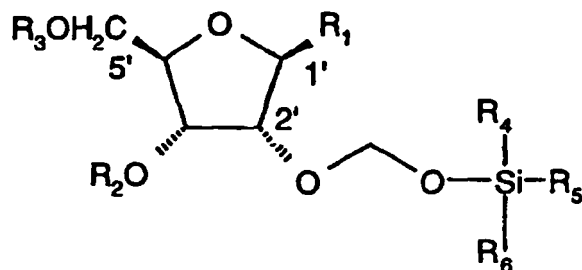
REIVINDICACIONES

1. Un derivado de ribonucleósido de la fórmula

5

10

15



en donde

20

R₁ es una base de la familia de purina- o pirimidina- o un derivado de una familia base o un derivado de una base o cualquier otro residuo que sirve como un sustituto de una nucleobase,

R₂ es un protón o un derivado sustituido de ácido fosfónico,

25

R₃ es un protón o un grupo protector para el átomo de oxígeno en la posición 5',

R₄, R₅ y R₆ son independientemente un grupo alquilo o arilo o una combinación de alquilo y arilo o heteroátomo, R₄, R₅ o R₆ puede también estar conectados cíclicamente entre sí;

30

y

en donde al menos uno de los sustituyentes R₄, R₅ o R₆ comprende un átomo de C terciario o un heteroátomo cercano al átomo de Si.

35

2. Un derivado de ribonucleósido de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el sustituyente que comprende el átomo de C terciario cercano al átomo de Si contiene desde 4 a 24 átomos de C.

40

3. Un derivado de ribonucleósido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde el sustituyente que comprende el átomo de C terciario cercano al átomo de Si es un alquilo-sustituyente seleccionado del grupo que consiste de ter-butil, ter-pentil, ter-hexil, ter-heptil, ter-octil, ter-nonil, ter-decil, ter-undecil, ter-dodecil.

45

4. Un derivado de ribonucleósido de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3 en donde el sustituyente que comprende el átomo de C terciario cercano al átomo de Si es seleccionado del grupo de 1,1-dimetiletil, 1,1-dimetil-propil, 1,1-dimetil-butil, 1,1-dimetil-pentil, 1,1-dimetil-hexil, 1,1,2-trimetil-propil, 1,1,2-trimetil-butil, 1,1,2-trimetil-pentil, 1,1,2-trimetil-hexil, 1,1,2,2-tetrametil-propil, 1,1,2,2-tetrametil-butil.

5. Un derivado de ribonucleósido de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el sustituyente cercano al átomo de Si contiene un heteroátomo sustituido.

50

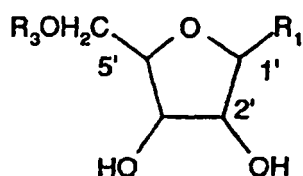
6. Un derivado de ribonucleósido de acuerdo con la reivindicación 5 en donde el sustituyente cercano al átomo de Si contiene un heteroátomo bivalente sustituido.

7. Un derivado de ribonucleósido de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el heteroátomo es oxígeno.

55

8. Un método para la preparación de un derivado de ribonucleósido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la reacción de un nucleósido con la fórmula:

60



65

ES 2 266 886 T3

donde R_1 y R_3 son como se definieron en la reivindicación 1, con un derivado de siloximetil de la fórmula



10 en donde Y es un grupo marginal apropiado

y en donde R_4 , R_5 y R_6 son independientemente un grupo alquilo o arilo o una combinación de alquilo y arilo o un heteroátomo, R_4 , R_5 o R_6 también pueden estar conectados cíclicamente entre sí.

15 9. El método de la reivindicación 8 en donde Y es un halógeno.

10. El método de la reivindicación 8 o 9 en donde R_4 , R_5 y R_6 juntos contienen entre 3 y 30 átomos de carbono.

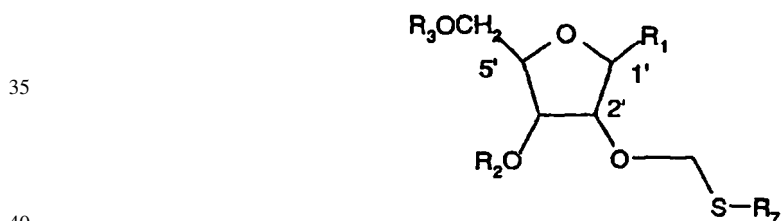
20 11. El método de las reivindicaciones 8 o 9 en donde R_4 , R_5 o R_6 contienen al menos un heteroátomo sustituido cercano al átomo de Si.

12. El método de la reivindicación 11 en donde el heteroátomo es un átomo bivalente.

13. El método de la reivindicación 12 en donde el heteroátomo es un oxígeno.

25 14. El método de la reivindicación 11, 12 o 13 en donde el derivado de ribonucleósido es adicionalmente sustituido sobre el oxígeno en la posición 3'- con un grupo que comprende de un derivado de ácido fosfónico.

30 15. Un método para la preparación de un derivado de ribonucleósido, que comprende la reacción de un derivado de ribonucleósido con la fórmula



Bajo una activación electrofílica con un compuesto de fórmula:



50 en donde R_1 se define como en la reivindicación 1 y R_7 es un grupo alquilo- o arilo-, o un grupo alquilo-arilo-,

en donde R_2 es un grupo protector,

55 en donde R_3 es un grupo protector,

en donde R_4 , R_5 y R_6 son grupos alquilo o arilo idénticos o diferentes o una combinación de sustituyentes alquilo y arilo, que adicionalmente pueden estar sustituidos con heteroátomos y que también pueden estar conectados cíclicamente entre sí.

60 16. El método de la reivindicación 15 en donde R_4 , R_5 y R_6 son definidos según las reivindicaciones 1 a 7.

17. El método de la reivindicación 15 o 16 en donde el derivado de ribonucleósido es adicionalmente sustituido sobre el oxígeno en la posición 3'- con un grupo que comprende un derivado de ácido fosfónico.

65