



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 368 300**

② Número de solicitud: 201030611

⑤ Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **27.04.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.11.2011

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50 %)
C/ Serrano 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Barcelona (Titular al 20 %) y
CIBER-BBN (Titular al 30 %)

⑱ Inventor/es: **Eritja Casadellá, Ramón;**
Ocampo, Sandra Milena;
Perales Losa, José Carlos;
Grijalvo Torrijo, Santiago y
Aviño Andrés, Ana

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Derivados lipofílicos de ácidos nucleicos.**

㉑ Resumen:

Derivados lipofílicos de ácidos nucleicos.

En esta invención se describen nuevos derivados del pARNi. El pARNi modificado según la invención mejora su entrada en las células y su estabilidad a la degradación por nucleasas, aumentando la capacidad inhibitoria de los pARNi. Estos nuevos compuestos contienen lípidos unidos a una molécula puente presente en el extremo terminal del dúplex de pARNi mediante enlaces tipo éter. También se describe la síntesis de dichos compuestos.

ES 2 368 300 A1

DESCRIPCIÓN

Derivados lipofílicos de ácidos nucleicos.

5 La presente invención se refiere a un compuesto de pARNi y uno o varios lípidos y sus procesos de síntesis. Además también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, así como sus usos en medicina. Por lo tanto la presente invención pertenece al campo de la técnica de la biotecnología.

10 Estado de la técnica anterior

El ARN de interferencia (ARNi) es un importante mecanismo de regulación génica que puede ser utilizado para el silenciamiento específico de genes. El proceso es iniciado por ARNs de doble cadena que se denominan pARNi, pequeños ARN de interferencia (en inglés *small interfering RNAs*, siRNAs). Los pARNi, complementarios a un ARN mensajero determinado, se unen a un complejo proteico conocido como RISC. El complejo formado por la unión de la cadena antisentido o guía con RISC cataliza la degradación eficiente de un ARN mensajero específico, provocando un descenso de la proteína Diana. Durante los últimos años, se han realizado numerosos estudios con el fin de utilizar este fenómeno de regulación génica natural como base para una nueva terapia encaminada hacia la reducción específica de una proteína determinada previamente. Así, dicha terapia podría ser utilizada para el tratamiento de enfermedades en las que se conoce que son causadas por la sobreexpresión de genes tales como el cáncer o enfermedades inflamatorias [D. Brumcot y col. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nature Chemical Biology* 2 (2006), páginas 711-719; A. de Fougères y col. RNA interference *in vivo*: toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics *Methods in Enzymology* 392 (2005), páginas 278-296; C. Chakraborty Potentiality of small interfering RNAs (siRNA) as recent therapeutic targets for gene-silencing. *Current Drug Targets* 8 (2007) páginas. 25 469-482]. Para que este mecanismo de regulación se pueda convertir en un tratamiento efectivo es necesario que los pARNi produzcan un efecto inhibitorio prolongado, se puedan distribuir eficazmente en el organismo y se puedan dirigir con eficiencia hacia el órgano o tejido o grupo celular dañado.

En el estado de la técnica se han realizado diversas aproximaciones para mejorar la entrada del pARNi en el interior de la célula. Por ejemplo Wolfrum, *et al.* (*Nature Biotechnology* 25 number 10, October 2007) describe conjugados de oligonucleótidos con cadenas lipídicas para mejorar el delivery de siRNAs. La técnica utiliza para la mejora de la entrada celular es la introducción de una molécula de colesterol a través de un enlace amida. Ueno, *et al.* (*Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16 (16), 2008, Pp 7698-7704) al igual que Wolfrum, describe conjugados de oligonucleótidos con cadenas lipídicas para mejorar el delivery de pARNi. Aunque los conjugados descritos por Ueno contienen en el nexo de unión glicerol, la cadena lipídica no está unida a este por medio de un enlace tipo éter, sino que se utiliza un enlace de tipo carbamato. Algunos de los problemas que presentan los derivados descritos por Ueno están relacionados con la introducción de la modificación en la cadena guía, ya que estos cambios en los pARNi reducen significativamente la capacidad silenciadora de los pARNi. Además los derivados descritos por Ueno no fueron capaces de traspasar la membrana celular sin agente de transfección.

40

Descripción de la invención

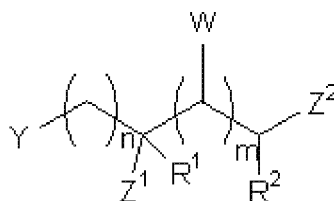
En esta invención se describen nuevos derivados del pARNi. Las modificaciones propuestas se pueden introducir tanto en el extremo 3' como en el extremo 5', ya sea de la cadena guía o acompañante de un dúplex de pARNi. El pARNi modificado según la invención mejora su entrada en las células y su estabilidad a la degradación por nucleasas, aumentando la capacidad inhibitoria de los pARNi. Por lo tanto en la presente invención se describen nuevos compuestos de pARNi que facilitan la administración celular y son más estables a las nucleasas, lo que les hace más eficaces en la inhibición de la expresión génica, como por ejemplo en la inhibición del gen de necrosis tumoral alfa de ratón implicado varias enfermedades inflamatorias tales como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y cáncer. Estos nuevos compuestos contienen lípidos unidos a una molécula puente presente en el extremo terminal del dúplex de pARNi mediante enlaces tipo éter. También se describe la síntesis de dichos compuestos.

La presencia de los grupos lipídicos unidos mediante enlaces de tipo éter en cualquiera de los extremos terminales, tanto de la cadena guía o como en la acompañante, mejora la estabilidad termodinámica de los dúplex resultantes. Estos dúplex de pARNi unidos covalentemente a grupos alifáticos en la posición terminal en 3' pueden ser transfectados a células humanas y los compuestos entran eficientemente en las células donde desencadenan el mecanismo de ARN de interferencia de forma semejante a los dúplex de pARNi sin modificar induciendo la inhibición específica del gen cuya secuencia es complementaria a la secuencia de los pARNi. Además los pARNi modificados tienen una estabilidad a las nucleasas presentes en el suero mucho más elevada que los pARNi sin modificar por lo que los pARNi descritos en esta invención pueden mantener el silenciamiento génico durante más tiempo que los pARNi sin modificar.

65

ES 2 368 300 A1

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención un compuesto de pARNi y un lípido unidos covalentemente entre si representados por la siguiente fórmula (I):



Fórmula (I)

donde:

Y es un dúplex de pARNi unido mediante un enlace tipo fosfato;

W es grupo opcional, y es uno, o varios, sustituyentes que puede haber en cada unidad de metileno y se selecciona, o seleccionan independientemente, entre H, C₁-C₃ alquilo o Z³;

Z¹, Z² y Z³ se seleccionan independientemente entre H, C₁-C₆ alquilo, -NR₃R₄ y -O-R₅;

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H y C₁-C₆-alquilo;

R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente entre H, un lípido, C₁-C₆ alquilo;

n es un número entero que se selecciona entre 1, 2, 3, 4 y 5;

m es un número entero que se selecciona entre 0, 1, 2, 3 y 4;

con la condición de que al menos Z¹, Z² y/o Z³ es -O-lípido.

Los compuestos de pARNi que contienen grupos alifáticos y aromáticos en la posición terminal en 3' pueden ser sintetizados con buenos rendimientos. Por tanto, un segundo aspecto de la presente invención es un proceso para la síntesis en fase sólida de los compuestos según se definen el primer aspecto o en cualquiera de sus realizaciones particulares, caracterizado porque comprende las siguientes etapas [M. H. Caruthers y col. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. Methods in Enzymology 154 (1987) 287-313]:

i) preparar un derivado del lípido que contenga un grupo que puede generar un grupo fosfato,

ii) sintetizar una de las cadenas de pARNi utilizando el procedimiento de síntesis en fase sólida,

iii) unir el derivado del lípido a la cadena de pARNi mediante un enlace fosfato,

iv) romper el enlace entre el soporte sólido y el producto y eliminar los grupos protectores obteniéndose una de las cadenas del pARNi y

v) mezclar cantidades equivalentes de las cadenas guía y acompañante para generar el pARNi.

Otro proceso para la síntesis en fase sólida de los compuestos comprende las siguientes etapas:

i) unir el lípido y el puente, es decir la molécula que finalmente quedará intercalada entre el pARNi y el lípido, para formar al menos un enlace éter tipo -O-lípido,

ii) unir el compuesto obtenido en el paso (i) a un soporte sólido

iii) ensamblar de manera secuencial una de las cadenas de pARNi y al compuesto puente-O-lípido sobre el soporte,

iv) romper el enlace entre el soporte sólido y el producto y eliminar los grupos protectores obteniéndose una de las cadenas del pARNi,

v) mezclar cantidades equivalentes de las cadenas guía y acompañante para generar el dúplex de pARNi.

Un tercer aspecto son las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de pARNi de la presente invención y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 El último aspecto es el uso de las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la preparación de un medicamento.

Descripción detallada de la invención

10 Los compuestos de la invención presentan al menos un lípido unido mediante un enlace tipo éter. Ejemplos de lípidos útiles para la presente invención, tanto para los que están unidos mediante enlace tipo éter como para los que no, son C₈-C₂₀ alquilo, con o sin insaturaciones, ácidos grasos, acilglicérido, cérido, fosfolípidos, fosfoglicéridos, fosfoesfingolípidos, glucolípidos, cerebrósidos, gangliósidos, terpenoides, esteroides, eicosanoides, prostaglandinas o vitaminas A, D, E y K. Entre estos lípidos los preferidos son los seleccionados entre C₈-C₂₀ alquilo, ácidos grasos, fosfolípidos, fosfoglicéridos, fosfoesfingolípidos, y glucolípidos. Los lípidos de la presente invención deben de tener al
15 menos un grupo capaz de ser convertido en un enlace tipo éter. Este grupo puede hallarse de forma natural en el lípido, como por ejemplo la presencia de un grupo alcohol, o puede haberse introducido en el lípido mediante reacciones químicas pertinentes y conocidas en la técnica.

20 Por lípidos C₈-C₂₀ alquilo se entiende cadenas lipídicas que comprenden entre 8 y 20 átomos de carbono. Estas pueden ser cadena lineal o ramificada y pueden tener insaturaciones, ya sean en forma de dobles enlace o de triple enlace y en los que puede haber funciones hidroxilo, epóxidos o anillos carbocíclicos. Ejemplo de estos lípidos son octilo, decilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, octadecilo y bombicol.

25 Por ácidos grasos se entiende ácidos alcanóicos de cadena lineal o ramificada que pueden llevar enlaces dobles o triples y en los que puede haber funciones hidroxilo, epóxidos o anillos carbocíclicos. Ejemplos de ácidos grasos son el ácido octanoico, el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido oleico, el ácido linoleico, el ácido araquidónico, el ácido crepenínico y el ácido aleurítico.

30 Por acilglicérido se entiende un grupo de moléculas que están formadas por glicerina y uno o varios ácidos grasos que forman enlaces ésteres con los grupos alcohol de la glicerina. Ejemplos son los monoglicéridos, los diglicéridos y los triglicéridos.

35 Por cérido se entiende por un grupo de moléculas que son ésteres de los ácidos grasos con alcoholes de peso molecular elevado. Ejemplos son la cera de las abejas, la cera de la piel y etc.

40 Por fosfolípidos se entiende un grupo de moléculas que están formados por un lípido que contiene un grupo fosfato. Los más abundantes son los fosfoglicéridos y los fosfoesfingolípidos. Por fosfoglicéridos se entiende un grupo de moléculas que están formados por glicerina esterificada por uno o dos ácidos grasos y que contiene un grupo fosfato en una de las posiciones de la glicerina. Algunos ejemplos son la fosfatidilcolina o lecitina, la fosfatidiletanolamina o cefalina, la fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidildiglicerol y etc. Por fosfoesfingolípidos se entiende un grupo de moléculas que están formados por esfingosina y que contiene un grupo fosfato. Algunos ejemplos son esfingomielin, ceramidafosforiletanolamina o esfingosina-1-fosfato.

45 Por glucolípidos se entiende un grupo de moléculas que están formados por un lípido que contiene al menos un carbohidrato. Los más abundantes son los glucoesfingolípidos que están formados por una ceramida (ácido graso + esfingosina) y un carbohidrato de cadena corta. Estos se pueden clasificar en cerebrósidos, globósidos y gangliósidos. Por cerebrósidos se entiende por glucoesfingolípidos que contienen un único carbohidrato unido por una unión beta-glicosídica. Ejemplos son los galactocerebrosidos que contienen galactosa como por ejemplo la frenosina, o los glucocerebrosidos del tejido nervioso.

50 Por gangliósidos se entiende un grupo de esfingolípidos que contienen oligosacáridos complejos. Algunos ejemplos son el ácido N-acetil neuramínico o ácido siálico o los gangliósidos presentes en la materia gris del cerebro.

55 Por terpenoides se entiende un grupo de moléculas formadas por diversas unidades de isopreno. La mayoría son hidrocarburos insaturados de fórmula (C₅H₈)_n que pueden contener grupos alcohol y cetonas. Si contienen dos moléculas de isopreno se denominan monoterpenos, si contienen tres moléculas de isopreno se llaman sesquiterpenos, a los de C₂₀, diterpenos, a los C₂₅ sesterterpenos, a los C₃₀ triterpenos y así sucesivamente. Algunos ejemplos son el mirceno, limoneno, pineno, geraniol, mentol, alcanfor, farnesol, manool, eudesmol, guayol, ácido abscísico o el ácido giberélico.

60 Por esteroides se entiende de una familia de moléculas derivadas del ciclopentanoperhidrofenantreno que suele a tener una cadena ramificada de 8 átomos de carbono en una de las posiciones del anillo de ciclopentano. Algunos ejemplos son el colesterol, ergosterol, estigmasterol, ergocalciferol, precalciferol, ecdisona, ácido cólico, pregnalona, progesterona, cortisona o testosterona.

65 Por eicosanoides se entiende por un grupo de moléculas originadas por la oxigenación de los ácidos grasos de 20 átomos de carbono. Algunos ejemplos son el ácido araquidónico, las prostaciclina, las prostaglandinas, los tromboxanos, los leucotrienos o ciertos hidroxiácidos.

ES 2 368 300 A1

Por prostaglandinas se entiende un grupo de sustancias de unos 20 átomos de carbono presentes en una gran variedad de tejidos animales que poseen un ciclopentano con dos cadenas alifáticas lineales que pueden contener diversos grupos hidroxilo, cetona, carboxilos y dobles enlaces. Algunos ejemplos son la prostaglandina E o sus derivados.

- 5 En una realización preferida Z_2 es -O-lípido. Mientras que en otra realización es Z_1 es -O-lípido. En otra realización tanto Z_1 como Z_2 son independientemente grupos -O-lípido.

Se suelen preferir puentes relativamente cortos, es decir que n sea 1, 2 ó 3, y más preferiblemente que n sea 1. También se prefiere que m sea 0, 1 ó 2, y más preferiblemente que sea 0. Evidentemente en caso de que m sea superior a 1 puede haber diferentes grupos W. Estos grupos W no tienen porque ser todos idénticos sino que pueden ser seleccionados de manera independiente de entre los diversos significados de W especificados anteriormente.

En una realización preferida R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre H y C_1 - C_3 -alquilo, preferiblemente entre H y metilo.

15 Preferiblemente las derivatizaciones se introducen en la posición 3' terminal del dúplex de pARNi.

En una realización preferida la molécula puente que finalmente en el compuesto de fórmula (I) quedará introducida entre el lípido, o lípidos, e Y, provienen de la introducción, entre el enlace fosfato y el grupo lípido, de una molécula de treoninol, glicerol, 2-amino-1,3-propandiol, 2-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,2-propandiol, hidroxiprolinol, serinol, o cualquier otro aminoalquidol. Preferiblemente el puente proviene de glicerol.

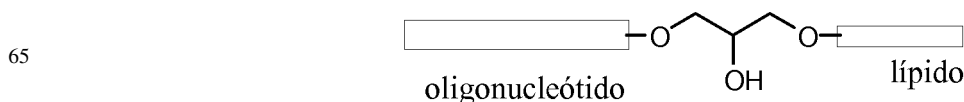
La longitud de la cadena de pARNi (Y) de los compuestos de la invención es normalmente de entre 15 y 40 nucleótidos por cadena, más preferiblemente entre 15 y 40, y todavía más preferiblemente entre 19 y 25 nucleótidos por cadena.

Adicionalmente, el dúplex de pARNi puede comprender modificaciones, como por ejemplo sustituciones seleccionadas entre 2'-O-metil-ribonucleótido o 2'-desoxirribonucleótido o 2'-metoxietil-ribonucleótido o 2'-fluoro-desoxirribonucleótido, o 2'-fluoro-arabinonucleótido, nucleósidos de conformación restringida (como los conocidos en inglés con las siglas LNA o HNA), ARN con enlaces fosforotioato, o residuos abásicos o ribitoles o nucleósidos que contienen bases modificadas tales como 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, 4-alquilcitosina, 5-alquiluracilo, 5-halogenocitosina, 5-halogenouracilo, u otras pirimidinas modificadas, 7-deazaadenina, 7-deazaguanina, hipoxantina u otras purinas modificadas.

El dúplex de pARNi (Y) puede inhibir y/o silenciar, siendo esta inhibición/silenciamiento total o parcialmente respecto de un control, la expresión de diversos genes de interés farmacológico como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGF R1/2), factor supresor de colonias de granulocitos (GM-CSF-1) y de macrófagos (M-CSF-1), angiopoietina (ANGPT), apolipoproteína (ApoB), neovascularización vascular (CNV), carboxiquinasa fosfoenol piruvato (PEPCK), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP2), receptor de N-metil-D aspartato (NMDA), citoquina derivadas de los keratocitos (KC), receptor opio de delta (DOR), receptor del dominio de Discoidina (DDR1), gen de la fosfoproteína PIV (PIV-P), oxigenasa hemo (HMOX1), caveloína, transportador de dopamina, proteína fluorescente verde y/o proteína del sarcoma de Swing (EWS-FL/1). Los genes preferidos para silenciar/inhibir son el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGF R1/2), factor supresor de colonias de granulocitos (GM-CSF-1) y de macrófagos (M-CSF-1). $TNF\alpha$ es un mediador importante de la apoptosis tanto en inflamación como en la respuesta inmunitaria. Además, la sobreexpresión de $TNF\alpha$ está confirmada en el desencadenamiento de la patogénesis de muchas enfermedades humanas. Por todo ello la inhibición de esta citoquina es relevante desde el punto de vista biomédico. PEPCK es una proteína importante en el proceso de gluconeogénesis y se encuentra sobreexpresada en la diabetes. Es la responsable de un aumento en la producción de glucosa hepática en pacientes diabéticos y en modelos animales.

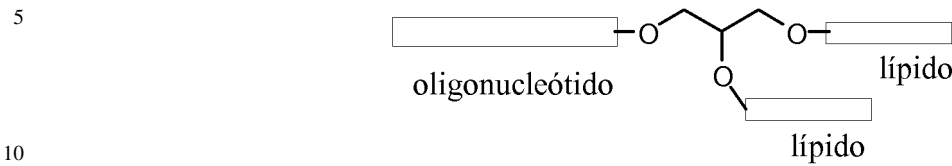
Secuencias específicas de pARNi útiles para la presente invención son la secuencia 5' GAGGCUGAGACAUAGG CAC-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 1) o 5'-GUGCCUAUGUCUCAGCCUC-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 2). La secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia guía o antisentido de un fragmento del ARN de $TNF\alpha$ de *Mus musculus* en cuyo extremo 3' se han adicionado 2 timinas. La secuencia SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia acompañante o sentido complementaria a SEQ ID NO: 1 (exceptuando los dos nucleótidos timina del extremo 3') en la que también se adicionan dos timinas en su extremo 3'.

En una realización preferida, en el que el puente proviene de glicerol y Z^2 es -O-lípido, los compuestos de la presente invención presentan la siguiente fórmula:

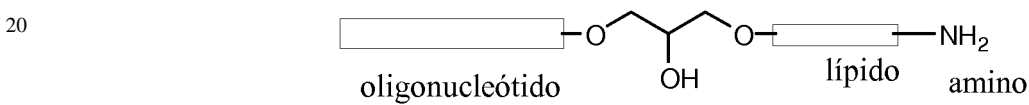


ES 2 368 300 A1

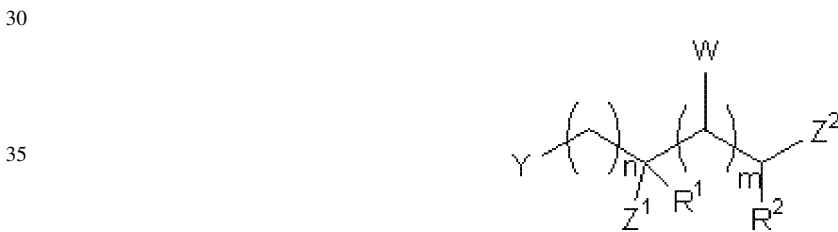
O también pueden incluir dos lípidos



15 Además, los lípidos de la presente invención pueden incorporar derivatizaciones adicionales, como por ejemplo la introducción de grupos amino. Estas derivatizaciones son útiles, porque permiten la introducción de grupos o funcionalidades adicionales sobre el lípido.



La presente invención no sólo se limita a los compuestos de pARNi que comprenden dúplex de pARNi, sino también se refiere a los compuestos de cadena sencilla, es decir compuestos de fórmula (II):



Fórmula (II)

45 donde:

Y es una cadena sencilla de pARNi;

50 W es grupo opcional, y es uno, o varios, sustituyentes que puede haber en cada unidad de metileno y se selecciona, o seleccionan independientemente, entre H, C₁-C₃ alquilo o Z³;

Z¹, Z² y Z³ se seleccionan independientemente entre H, C₁-C₆ alquilo, -NR₃R₄ y -O-R₅;

55 R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H y C₁-C₆-alquilo;

R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente entre H, un lípido, C₁-C₆ alquilo;

n es un número entero que se selecciona entre 1, 2, 3, 4 y 5;

60 m es un número entero que se selecciona entre 0, 1, 2, 3 y 4;

con la condición de que al menos Z¹, Z² y/o Z³ es -O-lípido.

65 Dicha cadena sencilla puede ser, o bien una secuencia de la cadena guía del ARN, o bien una secuencia de la cadena acompañante del ARN.

ES 2 368 300 A1

Un primer proceso para la síntesis de los compuestos de pARNi se basa en un proceso de síntesis en fase sólida caracterizado porque comprende al menos las siguientes etapas:

- 5 i) unir el lípido y el puente para formar al menos un enlace éter tipo -O-lípido,
- ii) unir el compuesto obtenido en el paso (i) a un soporte sólido,
- iii) ensamblar de manera secuencial una de las cadenas de pARNi y al compuesto puente-O-lípido sobre el soporte,
- 10 iv) romper el enlace entre el soporte sólido y el producto y eliminar los grupos protectores obteniéndose una de las cadenas del pARNi y
- v) mezclar cantidades equivalentes de las cadenas guía y acompañante para generar el dúplex de pARNi.

15 El soporte sólido utilizado en el proceso de síntesis se puede elegir entre vidrio, gel de sílice, vidrio poroso, óxido de silicio, poliestireno, polietilenglicol, poliestireno-polietilenglicol, poliamida, acrilamida, cloruro de polivinilo, teflón, derivados de teflón, papel y celulosa.

20 En una realización particular el lípido es unido a un soporte sólido y al menos una de las cadenas del pARNi es sintetizada utilizando el procedimiento de síntesis en fase sólida utilizando el soporte sólido funcionalizado con el lípido.

25 En otra realización el lípido es unido a un soporte sólido y al menos una de las cadenas del pARNi es sintetizada por adición sucesiva de derivados de los nucleósidos que constituyen la secuencia de la cadena incluyendo los fosforamiditos, los H-fosfonatos, los fosfatos diéster y los fosfatos monoéster. En una realización más preferida, en el proceso, el lípido es unido a un soporte sólido y al menos una de las cadenas del pARNi es sintetizada por adición sucesiva de los fosforamiditos de los nucleósidos que constituyen la secuencia de la cadena.

30 En el ejemplo 1 de la presente invención se describe la introducción de lípidos con enlace tipo éter en el extremo 3' de la secuencia de pARNi.

Un segundo proceso para la síntesis de los compuestos de pARNi se basa en un proceso de síntesis en fase sólida caracterizado porque comprende al menos las siguientes etapas:

- 35 i) preparar un derivado del lípido que contenga un grupo que puede generar un grupo fosfato.
- ii) ensamblar de manera secuencial una de las cadenas de pARNi utilizando el procedimiento de síntesis en fase sólida.
- 40 iii) unir el derivado del lípido a la cadena de pARNi mediante un enlace fosfato.
- iv) romper el enlace entre el soporte sólido y el producto y eliminar los grupos protectores obteniéndose una de las cadenas del pARNi.
- 45 v) mezclar cantidades equivalentes de las cadenas guía y acompañante para generar el pARNi.

50 El soporte sólido utilizado en el proceso de síntesis se puede elegir entre vidrio, gel de sílice, vidrio poroso, o cualquier superficie de óxido de silicio, poliestireno, polietilenglicol, poliestireno-polietilenglicol, acrilamida u otras poliamidas, cloruro de polivinilo, teflón y sus derivados, papel y celulosa. Los soportes óxidos preferidos se selecciona entre vidrio, gel de sílice, vidrio poroso, óxido de silicio, poliestireno, polietilenglicol, poliestireno-polietilenglicol, poliamida, acrilamida, cloruro de polivinilo, teflón, papel y celulosa.

55 En otra realización particular al menos una de las cadenas del pARNi se sintetiza por adición sucesiva de derivados de los nucleósidos que constituyen la secuencia de la cadena incluyendo los fosforamiditos, los H-fosfonatos, los fosfatos diéster y los fosfatos monoéster y a continuación se añade el lípido utilizando los mismos derivados (fosforamiditos, los H-fosfonatos, los fosfatos diéster y los fosfatos monoéster). En una realización más preferida, el proceso se caracteriza porque al menos una de las cadenas del pARNi se sintetiza por adición sucesiva de derivados fosforamiditos de los nucleósidos y a continuación se añade el lípido utilizando también un fosforamidito del lípido.

60 En el ejemplo 2 de la presente invención se describe la introducción de modificaciones en el extremo 5' de la secuencia de pARNi.

65 Como se ha comentado anteriormente los lípidos presentes en los compuestos de la presente invención son susceptibles de incorporar grupos adicionales, como por ejemplo el amino, para así hacer posible derivatizaciones adicionales. En el ejemplo 3 de la presente invención se describe de manera particular posibles procesos para la incorporación de dichos grupos amino.

Las composiciones farmacéuticas del tercer aspecto de la invención comprenden al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los excipientes incluyen cualquier material inerte o no activo usado en la preparación de una forma de dosificación farmacéutica. Por ejemplo, los excipientes de comprimido incluyen, pero no se limitan a: fosfato de calcio, celulosa, almidón o lactosa. Las formas de dosificación líquidas también incluyen líquidos orales por ejemplo en forma licores o suspensiones, así como disoluciones inyectables. Se puede formular la composición farmacéutica para la administración transdérmica en forma de parche. Todas las composiciones anteriormente descritas pueden contener opcionalmente uno o más de cada uno de los siguientes excipientes: vehículos, diluyentes, colorantes, agentes aromatizantes, lubricantes, agentes solubilizantes, desintegrantes, ligantes y conservantes.

Un tipo de particular de excipientes que puede comprender cualquier composición farmacéutica de la invención son los agentes de transfección. Éstos se pueden adicionar a la composición farmacéutica para mejorar aun si cabe las propiedades de ésta, o para vectorizarla. Los agentes de transfección preferidos se seleccionan entre uno o mezclas de los siguientes compuestos lipofectina, liptofectamina, oligofectamina, effectene, cellfectina, DOTAP, DOPE, fugene, polietilenglicol, colesterol, polietilenimida (PEI), Jet-polietilenimida, péptidos de penetración celular, péptidos troyanos, péptido TAT, penetratina, oligoarginina, poli-lisina, glicoproteína del virus de la rabia, nanopartículas de oro, dendrímeros, nanotubos de carbono, lípidos catiónicos y liposomas.

Los compuestos de pARNi y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden tener varios usos médicos, pero los preferidos son para el tratamiento del cáncer, inflamación, colitis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y/o artritis reumatoides. En general, las compuestos/composiciones de la presente invención son útiles para la preparación de medicamentos para el silenciamiento génico.

La composición farmacéutica preferida para la presente invención se presenta en una forma adaptada a la administración oral o parenteral, preferiblemente parenteral.

La administración de los compuestos de esta invención se puede realizar a través de cualquier procedimiento que libere el compuesto, preferentemente al tejido deseado. Estos procedimientos incluyen las vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intramedular, intraduodenal, etc. Preferiblemente la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse localmente mediante inyección en una zona cercana a la región de interés (intramuscularmente, subcutáneamente, intradérmicamente), inyección en una zona cercana a la región de interés o inyección intravenosa.

Con el propósito de la administración parenteral, se pueden usar así como soluciones acuosas estériles. Si es necesario, tales soluciones acuosas pueden tamponarse de forma adecuada, y el diluyente líquido se convirtió primero en isotónico con el suficiente suero salino o glucosa. Estas soluciones acuosas son especialmente adecuadas para propósitos de inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, todos los medios acuosos estériles empleados se pueden obtener con facilidad mediante técnicas estándar bien conocidas por aquéllos expertos en la técnica.

Definiciones

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría de ellas presentes en los seres vivos, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno, que tienen como característica principal el ser hidrofóbicas o insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como por ejemplo, el benceno y el cloroformo. La mayoría de los lípidos no pueden ser utilizados directamente para la unión covalente con un pequeño ARN interferente. Para ello, los lípidos de la presente invención deben de tener al menos un grupo hidroxilo para poder formar el enlace éter. Este grupo hidroxilo se puede encontrar en el lípido, o se puede introducir por las técnicas conocidas en la técnica, como por ejemplo la reducción de grupos carboxílicos.

Los pequeños ARN interferentes, o pARNi, (en inglés “siRNA”) son pequeños fragmentos de ARN de doble cadena de origen sintético o natural complementarios a la secuencia de los genes que se utilizan para la inhibición específica de los genes de los que son complementarios. Los pARNi están formados por dos cadenas de ARN que se denominan cadena guía (en inglés “guide strand” o “antisense strand”) y cadena acompañante (en inglés “passenger strand” o “sense strand”). La cadena guía del pARNi se une a un complejo de proteínas denominado complejo silenciador del ARN de inducción (en inglés “RNA induced silencing complex”, abreviado como “RISC”) y el complejo resultante es el responsable de la degradación celular del ARN mensajero complementario a la cadena guía. Para la unión de la cadena guía al complejo RISC es necesario administrar el ARN de doble cadena o pARNi ya que la cadena guía por si sola no puede unirse al complejo RISC.

El término soporte sólido se refiere a un polímero orgánico o inorgánico que se utiliza para facilitar la síntesis de oligonucleótidos, péptidos u otro compuesto orgánico por el procedimiento de síntesis en fase sólida. En este procedimiento uno de los reactivos se une covalentemente al soporte sólido y los otros reactivos se añaden secuencialmente. Los productos de la reacción se unen al reactivo fijado en el soporte facilitando el aislamiento por filtración del producto. Los materiales que normalmente se utilizan como soportes para la síntesis en fase sólida son vidrio, gel de sílice, poliestireno, polietilenglicol, poliamidas y celulosa.

Por el término “expresión génica” se entiende por la producción celular de una proteína determinada codificada por el gen correspondiente. De forma general el gen que se encuentra en los cromosomas presentes en el núcleo de las células se transcribe generando una molécula de ARN mensajero que se libera en el citoplasma. Allí la secuencia del ARN mensajero dirige la síntesis de la proteína. El resultado de este proceso, que se conoce como expresión génica, es la síntesis de una proteína cuya secuencia esta codificada por el gen correspondiente.

Descripción de las figuras

Figura 1 describe la eficiencia de silenciamiento de los pARNi modificados con lípidos en la cadena acompañante utilizando el protocolo A (con agente de transfección). Células HeLa fueron cotransfectadas con 250 ng de plásmido pCam TNF- α usando lipofectamina como vector de transfección, una hora después se transfectaron 50 nM de cada uno de los pARNi usando Oligofectamina. Después de 48 horas se midieron los niveles de TNF- α por ELISA. Los datos representan las medias \pm ES, n=3 y son comparados con una secuencia aleatoria. ***p<0,001. Test ANOVA. s.m es el pARNi constituido por las dos cadenas sin modificar (guía, 49/acompañante, 50); Chol, es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en 3' con colesterol (51) y una cadena guía sin modificar (49); 106 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en 3' con lípido C14 (41) y una cadena guía sin modificar (49); 107 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en 3' por un lípido C18 (42) y la cadena guía sin modificar (49); 110 es el pARNi constituido por una cadena acompañante 3'-modificada en 3' con un lípido C14 y que contiene diversas modificaciones de tipo 2'-O-metilo (43) y la cadena guía sin modificar (49); 111 es el pARNi constituido por una cadena acompañante con una modificación del lípido C14N en el extremo 5' (44) y una cadena guía sin modificar (49); 114 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada con el lípido C28 en el extremo 5' (45) y una cadena guía sin modificar (49); Scr es el pARNi constituido por una secuencia aleatoria sin modificar (guía 52, acompañante 53).

Figura 2 describe la eficiencia de silenciamiento de los pARNi modificados con lípidos en la cadena acompañante utilizando el protocolo B (sin agente de transfección). Células HeLa fueron cotransfectadas con el plásmido pCam TNF- α como en el caso anterior. Una hora después se agregó 100 nM de cada pARNi directamente sobre las células sin usar ningún reactivo de transfección. Después de 48 horas se midieron los niveles de proteína por ELISA. Los datos representan las medias \pm ES, n=3 y son comparados con una secuencia aleatoria. *p<0,05, test ANOVA. s.m es el pARNi constituido por las dos cadenas sin modificar (guía, 49/acompañante, 50); Chol, es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en 3' con colesterol (51) y una cadena guía sin modificar (49); 106 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en 3' con lípido C14 (41) y una cadena guía sin modificar (49); 107 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en 3' por un lípido C18 (42) y la cadena guía sin modificar (49); 110 es el pARNi constituido por una cadena acompañante 3'-modificada en 3' con un lípido C14 y que contiene diversas modificaciones de tipo 2'-O-metilo (43) y la cadena guía sin modificar (49); 111 es el pARNi constituido por una cadena acompañante con una modificación del lípido C14N en el extremo 5' (44) y una cadena guía sin modificar (49); 114 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada con el lípido C28 en el extremo 5' (45) y una cadena guía sin modificar (49); Scr es el pARNi constituido por una secuencia aleatoria sin modificar (guía 52, acompañante 53).

Figura 3 describe la eficiencia de silenciamiento de los pARNi modificados con lípidos en la cadena guía. Células HeLa fueron cotransfectadas con 250 ng de plásmido pCam TNF- α usando lipofectamina como vector de transfección, una hora después se transfectaron 50 nM de cada uno de los pARNi usando Oligofectamina. Después de 48 horas se midieron los niveles de TNF- α por ELISA. Los datos representan las medias \pm ES, n=3 y son comparados con una secuencia aleatoria. ***p<0,001. Test ANOVA. s.m es el pARNi constituido por las dos cadenas sin modificar (guía, 49/acompañante, 50); 108 es el pARNi constituido por una cadena guía modificada en el extremo 3' por el lípido C14 (39) y la cadena acompañante sin modificar (50); 109 es el pARNi constituido por una cadena guía modificada en el extremo 3' con el lípido C18 (40) y la cadena acompañante sin modificar (50); Scr es el pARNi constituido por una secuencia aleatoria sin modificar (guía 52, acompañante 53).

Figura 4 describe la eficiencia de silenciamiento de los pARNi modificados con lípidos en la cadena guía. Células HeLa fueron cotransfectadas con 250 ng de plásmido pCam TNF- α usando lipofectamina como vector de transfección, una hora después se transfectaron 100 nM de cada uno de los pARNi directamente sobre las células. Después de 48 horas se midieron los niveles de TNF- α por ELISA. Los datos representan las medias \pm ES, n=3 y son comparados con una secuencia aleatoria. ***p<0,001, **p<0,01. Test ANOVA. s.m es el pARNi constituido por las dos cadenas sin modificar (guía, 49/acompañante, 50); 108 es el pARNi constituido por una cadena guía modificada en el extremo 3' por el lípido C14 (39) y la cadena acompañante sin modificar (50); 109 es el pARNi constituido por una cadena guía modificada en el extremo 3' con el lípido C18 (40) y la cadena acompañante sin modificar (50); Scr es el pARNi constituido por una secuencia aleatoria sin modificar (guía 52, acompañante 53).

Figura 5 describe la eficiencia de silenciamiento de los pARNi modificados con lípidos con grupos amino en la cadena acompañante usando el protocolo A (con agente de transfección). Células HeLa fueron cotransfectadas con 250 ng de plásmido pCam TNF- α usando lipofectamina como vector de transfección, una hora después se transfectaron 50 nM de cada uno de los pARNi usando Oligofectamina. Después de 48 horas se midieron los niveles de TNF- α por ELISA. Los datos representan las medias \pm ES, n=3 y son comparados con una secuencia aleatoria. ***p<0,001. Test ANOVA. s.m es el pARNi constituido por las dos cadenas sin modificar (guía, 49/acompañante, 50); 126 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en el extremo 3' con el lípido NH2 C12 (46) y la cadena guía sin

modificar (49); 127 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en el extremo 3' con el lípido NH₂ triazol C12 (47) y la cadena guía sin modificar (49); 128 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en el extremo 3' con el lípido NH₂ C4 triazol C12 (48) y la cadena guía sin modificar (49); Scr es el pARNi constituido por una secuencia aleatoria sin modificar (guía 52, acompañante 53).

5
 10
 15
 Figura 6 describe la eficiencia de silenciación de los pARNi modificados con lípidos con grupos amino en la cadena acompañante usando el protocolo B (sin agente de transfección). Células HeLa fueron cotransfectadas con 250 ng de plásmido pCam TNF- α usando lipofectamina como vector de transfección, una hora después se transfectaron 100 nM de cada uno de los pARNi directamente sobre las células. Después de 48 horas se midieron los niveles de TNF- α por ELISA. Los datos representan las medias \pm ES, n=3 y son comparados con una secuencia aleatoria. ***p<0,001, **p<0,01. Test ANOVA. s.m es el pARNi constituido por las dos cadenas sin modificar (guía, 49/acompañante, 50); 126 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en el extremo 3' con el lípido NH₂ C12 (46) y la cadena guía sin modificar (49); 127 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en el extremo 3' con el lípido NH₂ triazol C12 (47) y la cadena guía sin modificar (49); 128 es el pARNi constituido por una cadena acompañante modificada en el extremo 3' con el lípido NH₂ C4 triazol C12 (48) y la cadena guía sin modificar (49); Scr es el pARNi constituido por una secuencia aleatoria sin modificar (guía 52, acompañante 53).

20
 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25 Ejemplos

30
 35
 Todas las reacciones se han llevado a cabo bajo atmósfera positiva de argón y en disolventes anhidros. Los reactivos obtenidos de fuentes comerciales y los disolventes anhidros se utilizaron directamente sin purificación adicional. Algunos disolventes se destilaron antes del uso y se secaron utilizando métodos convencionales. La homogeneidad de los productos obtenidos se confirmó por TLC y se obtuvieron los datos espectroscópicos esperados para cada uno de los compuestos sintetizados. Los desplazamientos químicos se describen en partes por millón (ppm) en relación al singulete del CHCl₃ a $\delta = 7,24$ ppm para los espectros de NMR de protón y en la señal central del triplete del CDCl₃ a $\delta = 77,0$ ppm para los espectros de NMR-¹³C. Los espectros de IR se midieron en forma de film en un espectrómetro BOMEM MB-120. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en cromatofolios de gel de sílice (Alugram Sil G/UV). Los espectros de MALDI se obtuvieron en un espectrómetro de masas Fisons VG Tofspec y un Fisons VG Plattform II. Los oligonucleótidos se prepararon en un sintetizador automático Applied Biosystems modelo 3400.

40 Ejemplo 1

Introducción de lípidos con enlace tipo éter en el extremo 3' de la secuencia de pARNi

45
 50
 55
 El esquema 1 se detalla el proceso. La reacción de alquilación entre el producto inicial 1 y el bromuro de alquilo 2a o el mesilato 2b, preparado siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía (Marcel Y.L. Holman R.T. (1968) Synthesis of ¹⁴C-labelled polyunsaturated fatty acids Chemical Physics of Lipids Vol. 2, pp 173-182; Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K., Maclachlan, I. (2005) Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. Journal of Controlled Release Vol. 107, pp 276-287) se realizó a reflujo de tolueno y rindió los productos de alquilación correspondientes 3a y 3b en buenos rendimientos (78%). La hidrólisis del acetónido con pTsOH en metanol dio los dioles correspondientes 4a y 4b en buen rendimiento. A continuación, la protección selectiva de los alcoholes primarios se llevó a cabo por reacción con cloruro de monometoxitritilo (MMTrCl) y N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) en piridina. El análogo del lípido protegido con el grupo dimetoxitritilo se sintetizó de forma similar pero usando cloruro de dimetoxitritilo (DMTrCl). Los alcoholes protegidos con el grupo MMTr 5a y 5b se purificaron por cromatografía de columna con buenos rendimientos (80% para 5a y 67% para 5b). La funcionalización del soporte sólido de tipo vidrio de poro controlado (CPG) se llevó a cabo siguiendo los protocolos habituales obteniéndose los soportes sólidos funcionalizados con los lípidos correspondientes 7a (C₁₄) y 7b (C₁₈).

60

65

ES 2 368 300 A1

Esquema 1

Síntesis de soportes de vidrio de poro controlado (CPG)

5

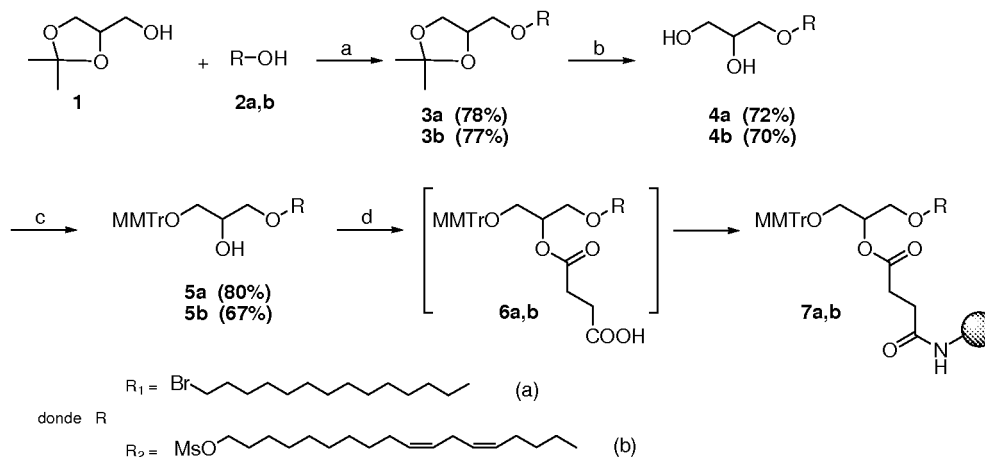
10

15

20

25

30



Reactivos y Condiciones: a. NaH (60%), Tolueno, reflujo, 20 h.; b. pTsOH, MeOH, r.t., 20 h.; c. MMTTr-Cl, DMAP, Py, 40 °C, 20 h; d. i) anhídrido succínico, DMAP, DCM, r.t., 20 h; ii) CPG, DMAP, DTB, TPP

Ejemplo 2

Introducción de modificaciones en el extremo 5' de la secuencia de pARNi

35

La ruta sintética utilizada en la síntesis de los liposforamiditos 11 y 18 se describe en los esquemas 2-4. La reacción de alquilación entre el alcohol 8 y el correspondiente bromuro de alquilo se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (Marcel Y.L. Holman R.T. (1968) Synthesis of 14C-labelled polyunsaturated fatty acids Chemical Physics of Lipids Vol. 2, pp 173-182). La desprotección del grupo alilo se llevó a cabo utilizando tetraquis-trifenilfosfina y ácido N,N-dimetilbarbitúrico como catalizadores. El correspondiente alcohol 10 se caracterizó por ¹H-RMN. A continuación se sintetizó el fosforamidito 11 (C₂₈) utilizando los protocolos habituales. El producto resultante se utilizó directamente en la síntesis de oligonucleótidos.

40

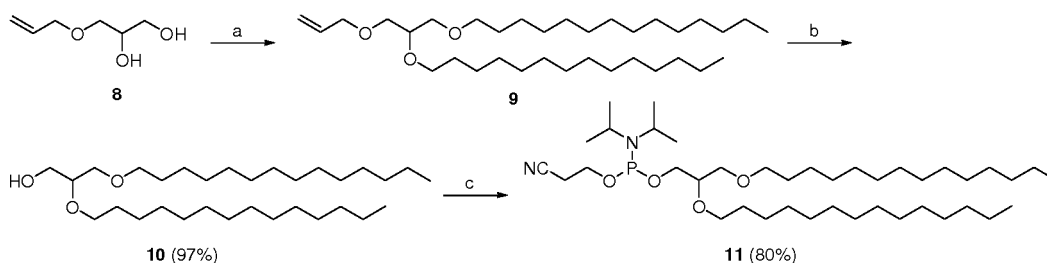
Esquema 2

Síntesis del fosforamidito 11 (C₂₈) utilizado en la síntesis de oligonucleótidos que contienen un lípido en el extremo 5'

50

55

60



Reactivos y Condiciones: a. referencia 1b; b. Pd[(PPh₃)₄], N, N-DMB, THF, 90 °C, 20 h; c. NC(CH₂)₂OP(iPr₂N)Cl, DIPEA CH₂Cl₂, 0°C - 25 °C; 2 h

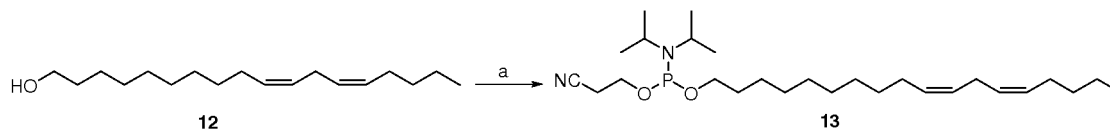
65

Los materiales de partida para la síntesis de los compuestos de la invención o son ya comerciales o se pueden obtener por los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo el fosforamidito 13 (C₁₈) se sintetizó partiendo del alcohol 12 que se obtuvo de fuentes comerciales.

ES 2 368 300 A1

Esquema 3

Síntesis del fosforamidito 13 (C18) utilizado en la síntesis de oligonucleótidos que contienen un lípido en el extremo 5'

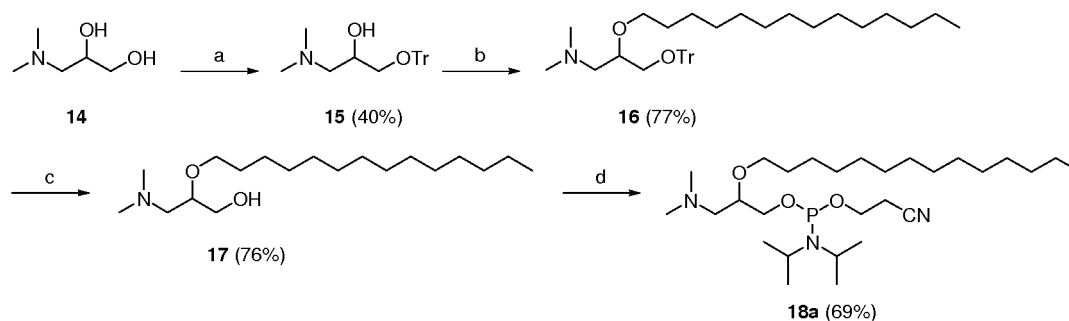


Reactivos y Condiciones: a. $\text{NC}(\text{CH}_2)_2\text{OP}(\text{iPr}_2\text{N})\text{Cl}$, DIPEA, CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$; 2 h

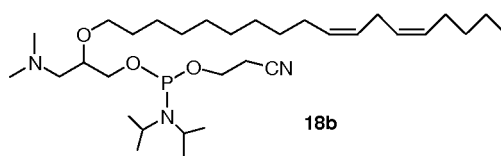
El compuesto 16 se sintetizó con buenos rendimientos siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía (Moss R.A., Jiang W. (1995) Cis/trans isomerization in azobenzene-chain liposomes. *Langmuir* vol.11, pp 4217-4221). La desprotección del grupo tritilo se realizó con una solución de ácido trifluoroacético al 20%, obteniéndose el producto deseado 17 (76%). El fosforamidito 18a (C₁₄N) se sintetizó utilizando protocolos habituales. De forma similar se preparó el fosforamidito 18b (C₁₈N).

Esquema 4

Síntesis de los fosforamiditos 18a (C14N) y 18b (C18N) utilizado en la síntesis de oligonucleótidos que contienen un lípido en el extremo 5'



Reactivos y Condiciones: a. Tr-Cl, DMAP, ACN, r.t., 20 h; b. NaH, THF, reflujo, 40 h; c. DCM/TFA 20%, r.t., 2h; d. $\text{NC}(\text{CH}_2)_2\text{OP}(\text{iPr}_2\text{N})\text{Cl}$, DIPEA, CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$; 2 h



Ejemplo 3

Procedimientos para la incorporación de grupos amino a la secuencia de pARNi

La síntesis de derivados lipídicos y derivados de tipo triazol se muestra en los esquemas 5 y 6, respectivamente. La reacción de alquilación entre el solquetal 19 y el correspondiente 1,2-dibromododecano 20 en DMF utilizando hidruro sódico (60%) como base rindió el producto de alquilación 21. Por otra parte también se realizó la reacción de alquilación de 19 con estannato de di-n-butilo en presencia de 2,0 equivalentes de fluoruro de cesio en DMF, obteniéndose 21 después de purificar por cromatografía en columna de sílica gel (Gonçalves AG, Noseda MD, Duarte MER, Grindley TB (2007) Semisynthesis of long-chain alkyl ether derivatives of sulfonated oligosaccharides via dibutylstannylene acetal intermediates. *J. Org. Chem.* Vol. 72, pp9896-9904).

El desplazamiento nucleofílico del grupo bromuro con azida sódica en DMF rindió la correspondiente azida 22 con excelentes rendimientos. A continuación la reacción de reducción de Staudinger seguido de la introducción del correspondiente grupo protector en el grupo amino dio el compuesto N-prottegido 23 con buenos rendimientos que se purificó por cromatografía de gel de sílice.

ES 2 368 300 A1

La hidrólisis del acetónido y eliminación del grupo Boc se llevó a cabo simultáneamente utilizando un tratamiento con una solución de ácido trifluoroacético en diclorometano obteniéndose el producto deseado en forma de trifluoroacetato. Este compuesto se trató con trifluoroacetato de etilo, obteniéndose el compuesto deseado 24. La reacción de este compuesto con el cloruro de dimetoxitritilo (DMTr) se llevó a cabo en piridina utilizando DMAP como catalizador obteniéndose el producto 25 en un rendimiento del 58%.

Esquema 5

Síntesis del derivado protegido con el grupo DMT 25

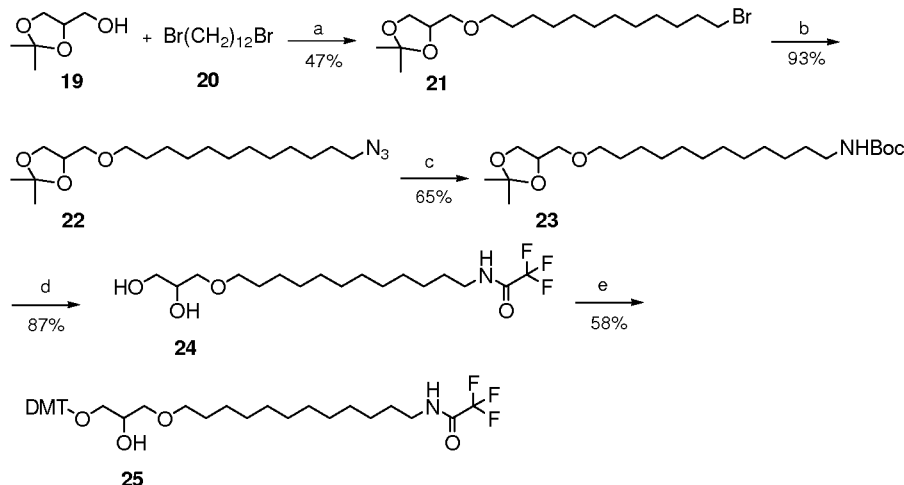
10

15

20

25

30



Reactivos y Condiciones: a. i. di-n-butilestano oxido, MeOH, reflujo, 3h; ii. CsF, **2**, DMF, 60°C; b. NaN_3 , DMF, 70 °C, 48h; c. i. PPh_3 , THF, H_2O , r.t., 20 h; ii. Boc_2O , TEA, DCM, r.t.; d. i. DCM/TFA 10%, 10 min, r.t.; ii. ETFA, TEA, DCM, 0°C, 1h; e. DMTr, DMAP, Py, 40 °C, overnight

35

Ya que uno de los intermedios de esta síntesis es la azida **22**, se consideró la posibilidad de explorar la utilización de la reacción de cicloadiición 1,3-dipolar para generar nuevos lípidos de cabeza polar. Recientemente se ha descrito la síntesis de una serie de oligonucleótidos que contienen lípidos preparados a través de una reacción de cicloadiición 1,3-dipolar que mejoran la entrada celular y que facilitan el direccionamiento intracelular (Godeau G, Staedel C, Barthélemy P (2008) Lipid-conjugated oligonucleotides via “click chemistry” efficiently inhibit hepatitis C virus translation. *J. Med. Chem.* Vol. 51 pp 4374-4376)). La azida **22** se hizo reaccionar con los alquinos comerciales **26-28** utilizando las condiciones habituales de la química de tipo “click” (Rostovtsev VV, Green GL, Fokin VV, Sharpless KB (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* Vol. 41, pp 2596-2599). Se obtuvieron los productos esperados **29a-b** y **32** que se aislaron en forma de un solo regioisómero por cromatografía de gel de sílice (Tabla 1).

40

45

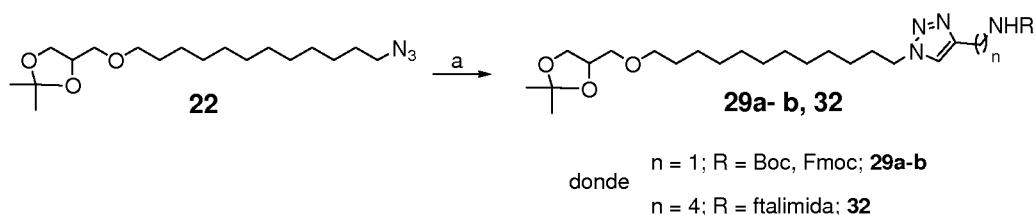
Esquema 6

Síntesis de los derivados con grupos triazol

50

55

60

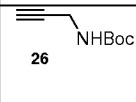
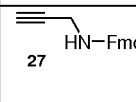
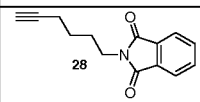


Reactivos y Condiciones. a. 10% ascorbato sódico, 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

65

TABLA 1

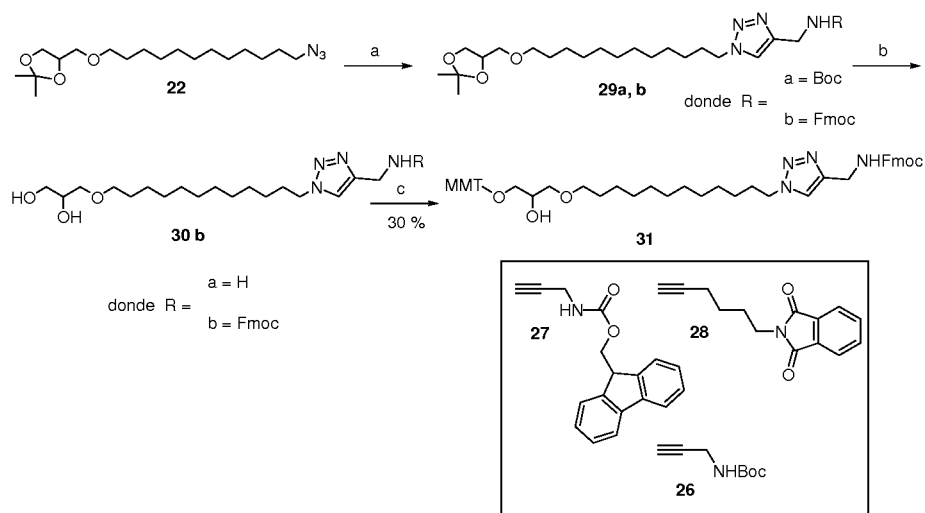
Reacción de cicloadición entre el compuesto 22 y los alquinos 26-28

	Alquino	Rendimiento (%)
1		69
2		58
3		89

La utilización de un medio ácido suave para la desprotección del acetónido rindió el diol correspondiente 30b con buen rendimiento. La protección del grupo hidroxilo con el grupo monometoxitritilo (MMTr) se llevó a cabo con el compuesto 30b siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía obteniéndose el alcohol protegido correspondiente 31.

Esquema 7

Síntesis del derivado lipídico protegido con el grupo MMTr 31



Reactivos y Condiciones: a. **26** or **27**, 10% ascorbato sódico, 1% CuSO₄·5H₂O, ^tBuOH:H₂O (1:1), r.t., 20 h;
b. DCM/TFA 3%, r.t., 1h para **29b**; c. MMTr, DMAP, Py, 40 °C, 40 h

Finalmente la síntesis del derivado lipídico 35 se detalla en el esquema 8. Después de realizar la cicloadición 1,3-dipolar entre la azida 22 y el alquino 28 se realizó la hidrólisis del acetónido con ácido p-toluensulfónico (pTsOH) generando el producto 33 con excelentes rendimientos que fue purificado por cromatografía en gel de sílice. La hidrólisis básica rindió la amina correspondiente que se hizo reaccionar con trifluoroacetato de etilo. El producto obtenido se utilizó directamente sin purificar en la siguiente reacción en la que el grupo alcohol primario se protegió con el grupo DMTr obteniéndose el compuesto 35.

ES 2 368 300 A1

Esquema 8

Síntesis del derivado lipídico protegido con el grupo DMTr 35

5

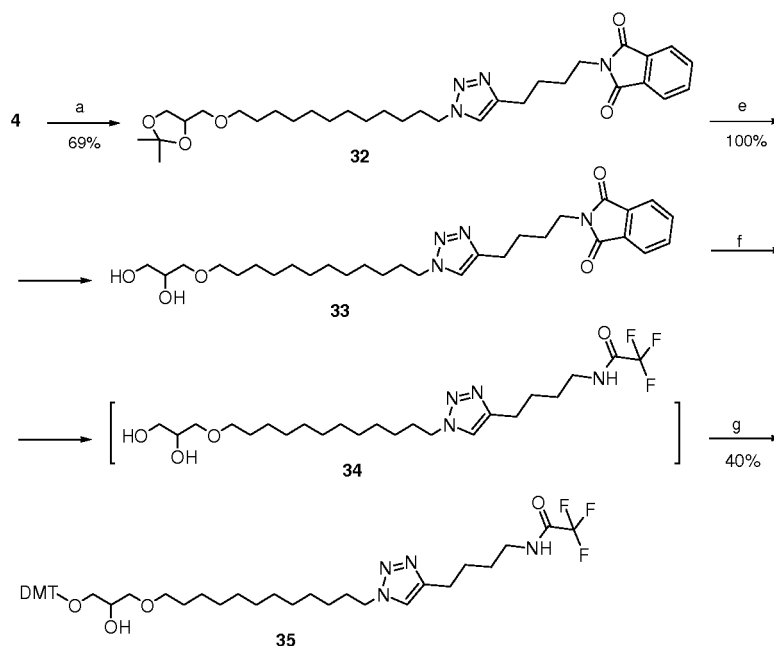
10

15

20

25

30



Reactivos y Condiciones: a. **28**, 10% ascorbato sódico, 1% CuSO₄·5H₂O, ¹BuOH:H₂O (1:1), r.t., 20 h; e. *p*TsOH, MeOH, r.t., 3h; f. i. MeNH₂, EtOH, 40 °C, 20 h; ii. ETFA, DCM, TEA, 0°C, 1h; g. DMTr, DMAP, Py, 40 °C, 20 h

35

40

Los compuestos 25, 31 y 35 se utilizaron para la funcionalización de soportes sólidos de vidrio de poro controlado (CPG) utilizando uniones de tipo succinilo tal como se ha descrito en la bibliografía (Gupta KC, Kumar P, Bhatia D, Sharma AK (1995) A rapid method for the functionalization of polymer supports for solid phase oligonucleotide synthesis. *Nucleosides, Nucleotides* vol. 14, pp 829-832). Para lograr este objetivo, los derivados DMTr y MMTr descritos anteriormente se hicieron reaccionar con anhídrido succínico, seguido del acoplamiento de los hemisuccinatos correspondientes con CPG funcionalizado con grupos amino obteniéndose los soportes de vidrio debidamente funcionalizados con los lípidos 36-38 (Esquema 9).

Esquema 9

Síntesis de los soportes de vidrio de poro controlado (CPG) funcionalizados con lípidos 36-38

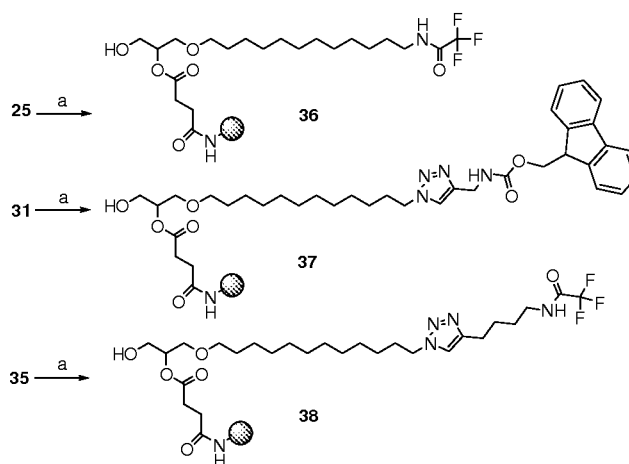
45

50

55

60

65



Reactivos y Condiciones: a. i. DMAP, anhídrido succínico, DCM, r.t., 20 h; ii. funcionalización vidrio (CPG)

ES 2 368 300 A1

A continuación se describe la síntesis de oligoribonucleótidos funcionalizados con lípidos para su utilización en experimentos de ARN de interferencia. Se ha escogido como gen diana el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Esta proteína es uno de los mediadores más importantes del proceso de apoptosis así como está implicada en los procesos de inflamación e inmunidad. Además, se ha demostrado la implicación de la sobreexpresión de TNF- α en varias enfermedades humanas y por ello la inhibición de esta proteína es relevante desde el punto de vista médico. Se escogieron las siguientes secuencias: 1) antisentido anti-TNF α : SEQ ID NO: 1 y sentido anti-TNF α : SEQ ID NO: 2. La secuencia del ARN-pARNi dúplex anti-TNF α sin modificar ha sido descrita en la bibliografía y tiene actividad inhibidora del mRNA de TNF α de ratón [D.R. Sorensen y col. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNA in adult mice. *Journal of Molecular Biology* 327 (2003) páginas 761-766].

Se han preparado siete oligoribonucleótidos con lípidos derivados de cadena C₁₄ o C₁₈: dos cadenas guía con derivados C₁₄ (39) y C₁₈ (40) en el extremo 3' y cinco cadenas acompañante con los mismos lípidos (Tabla 2). Oligonucleótidos con la secuencia de la cadena acompañante 41 y 42 con derivados C₁₄ y C₁₈ en el extremo 3'. Oligonucleótidos 44 y 45 contienen los derivados C₁₄N y C₂₈ en el extremo 5' (Tabla 2) y se sintetizaron utilizando los fosforamiditos 18a-b. El oligonucleótido con la secuencia de la cadena acompañante 43 tiene el derivado C₁₄ en el extremo 3' además de varias unidades de 2'-O-metil-ARN a lo largo de su secuencia sin las dos timidinas finales. Las unidades de tipo 2'-O-metil-ARN se han utilizado en la bibliografía con el fin de proteger las cadenas de ARN de la degradación de nucleasas. La posición de las unidades 2'-O-metil-ARN (mC= 2'-O-metil-C y mU= 2'-O-metil-U) en el oligonucleótido 43 es 5'-GUGC(mC)UAUG(mU)(mC)U(mC)AG(mC)C(mU)C-3' (SEQ ID NO: 5)-C₁₄ lípido.

El ensamblaje de las secuencias de ARN se realizó en un sintetizador de ADN. Los monómeros de ARN tenían el grupo t-butildimetilsil (TBDMS) para la protección del hidroxilo en 2'. Los rendimientos de acoplamiento de los monómeros fueron alrededor del 97-98% por etapa. El último DMTr se eliminó al finalizar el ensamblaje de la secuencia ya que se detectó la eliminación parcial durante el tratamiento de fluoruro. La desprotección final de los oligonucleótidos se realizó mediante dos tratamientos consecutivos: I) amoniaco acuoso concentrado-etanol 3: 1 a 55°C, y II) trietilamina tris(hidrofluoruro) de trietilamina en N-metilpirrolidona a 65°C. La purificación por HPLC rindió un producto mayoritario con el peso molecular esperado (Tabla 2).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 368 300 A1

TABLA 2

Datos de espectrometría de masas y temperaturas de fusión (T_m, °C) de los oligonucleótidos de ARN funcionalizados con lípidos

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Tipo	número	Reactivo utilizado	T _m (°C)	Peso Mol. (experimental)	Peso Mol. (calculado)
guía C14 3'-modificado	39	7a	83,9	7123	7125
guía C18 3'-modificado	40	7b	83,7	7176	7174
acompañante C14 3'-modificado	41	7a	83,9	6909	6913
acompañante C18 3'-modificado	42	7b	83,6	6964	6960
acompañante C14 3'- 2'-Me-modificado	43	7a	86,9	7013	7011
acompañante C14N 5'-modificado	44	18a	84,3	6934	6930
acompañante C28 5'-modificado	45	11	83,9	7112	7115

55

¹Experimentos llevados a cabo en una solución acuosa que contiene 100 mM acetato potásico, 2 mM acetato magnésico, y 30 mM HEPES-KOH a pH 7,4. La temperatura de fusión del dúplex sin modificación en estas condiciones es 83,5 °C.

60

65

A continuación se determinó el efecto de los lípidos en la estabilidad del dúplex de pARNi (Tabla 2). La estabilidad térmica de los dúplex modificados y sin modificar se midió en una solución 100 mM acetato potásico, 2 mM acetato magnésico, y 30 mM HEPES-KOH a pH 7,4. Las temperaturas de fusión (T_m) de los duplexes funcionalizados con lípidos fueron similares a las del dúplex sin modificar (T_m) dúplex modificados 83,6-84,3°C, dúplex sin modificar 83,5) excepto para el dúplex que contiene el oligonucleótido 43 que registró una T_m de 86,9. El incremento en la T_m es debido a las propiedades estabilizadoras de dúplex de las unidades de 2'-O-metil-ARN.

ES 2 368 300 A1

La secuencia anti-TNF α acompañante SEQ ID NO: 2 fue ensamblada en soportes CPG 36-38 obteniéndose oligoribonucleótidos con las moléculas amino lipídicas en el extremo 3' (46-48, Tabla 3).

TABLA 3

Caracterización de espectrometría de masas de los derivados de ARN que contienen moléculas lipídicas polares

Tipo	número	Reactivo utilizado	P.M. (exp.)	P.M. (calcd)
acompañante NH ₂ C ₁₂ 3'- modificado	46	36	7095	7096
acompañante NH ₂ triazol C ₁₂ 3'-modificado	47	37	7192	7192
acompañante NH ₂ C ₄ triazol C ₁₂ 3'- modificado	48	38	7232	7234

A continuación se determinó el poder inhibitorio del gen de factor de necrosis tumoral de los pARNi descritos en esta invención. Las cadenas acompañante y guía diseñadas para la inhibición de la expresión de TNF- α previamente descritas [D.R. Sorensen y col. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNA in adult mice. *Journal of Molecular Biology* 327 (2003) páginas 761-766] se hibridaron y se evaluó la capacidad de inhibición de los duplexes resultantes.

TABLA 4

Oligonucleótidos de ARN utilizados como controles

Código ARN	Tipo
49	guía sin modificar (SEQ ID NO:1)
50	acompañante sin modificar (SEQ ID NO:2)
51	acompañante 3'-modificado colesterol (SEQ ID NO:2-cho)
52	Secuencia aleatoria guía sin modificar (SEQ ID NO:3)
53	Secuencia aleatoria acompañante sin modificar (SEQ ID NO:4)

ES 2 368 300 A1

TABLA 5

ARN duplexes en los que se ha evaluado el efecto inhibitorio de la expresión del gen de TNF- α

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Código pARNi	Oligonucleótidos que forman el dúplex
108	guía C14 3'-modificado (39) / acompañante sin modificar (50)
109	guía C18 3'-modificado (40) / acompañante sin modificar (50)
106	acompañante C14 3'-modificado (41) / guía sin modificar (49)
107	acompañante C18 3'-modificado (42) / guía sin modificar (49)
110	acompañante C14 3'-modificado 2'-OMe (43)/ guía sin modificar (49)
111	Acompañante C14N 5'-modificado (44) / guía sin modificar (49)
114	Acompañante C28 5'-modificado (45) / guía sin modificar (49)
126	acompañante NH2 C12 3'-modificado (46) / guía sin modificar (49)
127	acompañante NH2 triazol C12 3'-modificado (47) / guía sin modificar (49)
128	acompañante NH2 C4 triazol C12 3'-modificado (48) / guía sin modificar (49)
s.m.	guía sin modificar (49) / acompañante sin modificar (50)
chol	Acompañante 3'-modificado con colesterol (51) / guía sin modificar (49)
scr	Secuencia aleatoria guía sin modificar (52) / aleatoria acompañante sin modificar (53)

50

En primer lugar se evaluaron las propiedades inhibitorias de los pARNi en células HeLa. Estas células no expresan el TNF- α de ratón por lo que se transfectaron las células con un plásmido que contiene el gen del TNF- α . Se estudiaron dos protocolos diferentes:

55

A) En primer lugar, las células HeLa se transfectaron con 250 ng del plásmido que expresa TNF- α de ratón (pCam TNF- α) utilizando lipofectina y 1 h más tarde se transfectaron con el pARNi dúplex (50 nM) utilizando oligofectamina. Al cabo de 48 h se determinó la cantidad de TNF- α producida por las células mediante un ensayo de ELISA.

60

B) Las células HeLa se transfectaron con 250 ng del plásmido que expresa TNF- α de ratón (pCam TNF- α) utilizando lipofectina tal como se ha descrito en el protocolo A. Al cabo de 1 h las células se trataron con el dúplex pARNi (100 nM) sin utilizar ningún reactivo de transfección. Después de 48 h se analizó la cantidad de TNF- α producida por la célula mediante un ensayo de ELISA.

65

Primero se analizaron los pARNis conjugados con lípidos C₁₄, C₁₈ y C₂₈ en la cadena sentido. En la figura 1 se muestra la cantidad TNF- α producida al cabo de 48 h de la adición de los dúplex de pARNi utilizando el protocolo A (utilizando lipofectina/oligofectamina). En la figura 2 se muestra el resultado utilizando el protocolo B (sin agente de transfección). Tanto los pARNi modificados como el dúplex sin modificar diseñados contra TNF- α produjeron una inhibición de la producción de TNF- α del 80-90% comparado con un dúplex de pARNi control de secuencia aleatoria (protocolo A). Este resultado indica que la introducción de moléculas lipídicas en el extremo 3' y 5' de las cadenas

sentido o antisentido de un dúplex no afecta a las propiedades inhibitorias del dúplex de pARNi resultante en células HeLa. La eliminación del agente de transfección (protocolo B) disminuyó la inhibición de TNF- α probablemente debido a la dificultad de atravesar la membrana celular de los pARNi sin agente de transfección. Sin embargo, cuatro pARNis modificados (107, 110, 111 y 114) son capaces de inducir el silenciamiento génico en ausencia de agente de transfección, probablemente debido a las características hidrofóbicas de las modificaciones incorporadas en los pARNi.

Después se evaluaron las modificaciones realizadas en la cadena antisentido del dúplex del pARNi anti TNF- α y se observó que cuando eran transfectados en presencia de un agente de transfección como oligofectamina, eran tan eficientes en el silenciamiento de la proteína (Figura 3), como las mismas realizadas en la cadena sentido, indicando esto que la modificación en la cadena antisentido no impide que sea tomada por el RISC para desempeñar su función de unirse al ARNm correspondiente para inhibir la producción de la proteína.

Cuando estos pARNis modificados en la cadena antisentido, son transfectados directamente sobre las células sin usar ningún tipo de agente de transfección, la inhibición desaparece (Figura 4).

Finalmente se evaluaron los lípidos con grupos polares, aminos y triazolaminos en la cadena alquílica de 12 carbonos, en el extremo 3' de la cadena sentido del pARNi anti TNF- α . Se transfectaron células HeLa con oligofectamina y sin oligofectamina y se encontró que en el primer caso, los pARNis inhiben un 65% aproximadamente la producción de la proteína TNF- α comparados con un pARNi control (scr) (Figura 5). Mientras que cuando se adicionaron las moléculas de pARNi directamente sobre las células sin ningún reactivo de transfección, se observó una pérdida casi total de la capacidad de silenciamiento de los pARNis (Figura 6).

En conclusión, se ha demostrado que los ARN que contienen grupos lipídicos en los extremos 3' o 5' pueden ser sintetizados de forma eficiente utilizando los reactivos desarrollados en esta invención. La presencia de los lípidos no inhibe la capacidad de unirse a su cadena complementaria, sino todo lo contrario en la mayoría de los casos tiene un efecto estabilizador del dúplex. Los dúplex de pARNi con lípidos unidos de forma covalente pueden ser administrados de forma eficiente a células humanas utilizando agentes de transfección y son compatibles con el mecanismo de ARN de interferencia provocando la inhibición específica de la expresión génica. Además algunos de los dúplex de pARNi descritos en esta invención son capaces de entrar en el interior celular sin necesidad de agente de transfección.

Ejemplo 4

35 *Procedimientos utilizados en diferentes reacciones de la presente invención*

4.1. *Procedimiento general utilizado en las reacciones de alquilación*

Solquetal 1 (100 mg, 0,757 mmol) e hidruro sódico al 60% (NaH, 60,4 mg, 1,51 mmol, 2,0 eq) se agitaron en tolueno (3,0 mL) y en atmósfera de argón durante 20 minutos. El bromuro de alquilo correspondiente 2a (420 mg, 1,51 mmol, 2,0 eq) o en su caso el mesílate correspondiente 2b (520 mg, 1,51 mmol) se disolvieron en tolueno (2,0 mL) y la solución se añadió gota a gota. La mezcla de reacción se calentó a reflujo bajo atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con más tolueno (10 mL) y la mezcla resultante se enfrió en un baño de hielo mientras se destruye el hidruro por adición cuidadosa de agua fría. La mezcla se lavó con agua (5,0 mL) y solución saturada de NaCl (5,0 mL), utilizando etanol para ayudar a la separación de las fases si es necesario. La fase orgánica se secó con sulfato sódico y se evaporó. El crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (ciclohexano (Ch): acetato de etilo (AcOEt) 0% a 3%).

50 *2,2-dimetil-4-(tetradeciloximetil)-1,3-dioxolano, 3a*

Rendimiento: 78%; IR (film) 2925, 2854, 1462, 1379, 1370, 1117,4 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4,26 (q, J = 6,0 Hz, 1H), 4,05 (dd, J = 8,2 Hz, 6,4 Hz; 1H), 3,73 (dd, J = 8,2 Hz, 6,4 Hz; 1H), 3,51 (m, 2H), 3,43 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,42 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,25 (m, 20H), 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 109,6, 74,9, 72,1, 72,0, 67,1, 32,1, 30,0, 29,9, 29,8, 29,8, 29,8, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 26,9, 26,2, 25,6, 22,9, 14,3; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{Na O}_3$ ($\text{M}^+ + 23$), 351,2870, experimental m/z 351,2862; calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{Na O}_6$ ($2\text{M}^+ + 23$), 679,5847, experimental m/z 679,5835.

60 *2,2-dimetil-4-(((10Z,13Z)-octadeca-10,13-dieniloxi)metil)-1,3-dioxolano, 3b*

Rendimiento: 77%; IR (film) 3008, 2986, 2926, 2856, 1457, 1379, 1369, 1214, 1120, 847 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,34 (m, 4H), 4,25 (q, J = 5,8 Hz, 1H), 4,04 (dd, J = 14,6 Hz, 8,2 Hz, 1H), 3,71 (dd, J = 14,6 Hz, 8,2 Hz, 1H), 3,45 (m, 4H), 2,76 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 2,00 (m, 4H), 1,56 (m, 2H), 1,41 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,29 (m, 20H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 132,1, 128,9, 110,0, 72,7, 72,1, 70,5, 64,5, 32,1, 30,0, 29,9, 29,8, 29,8, 29,8, 29,6, 29,5, 26,3, 22,9, 14,3; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{Na O}_3$ ($\text{M}^+ + 23$), 403,3183, experimental m/z 403,3176.

ES 2 368 300 A1

Procedimiento general utilizado en las reacciones de desprotección

Una solución del dioxolano 3a (1,0 eq) o 3b (1,0 eq) y ácido p-toluensulfónico monohidrato (0,5 eq) en metanol (5,0 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice eluída con diclorometano (DCM): metanol (MeOH) 0% al 2%.

3-(tetradeciloxi)propan-1,2-diol, 4a

Rendimiento: 72%; IR (film) 2980, 2850, 2390, 2387 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3,87 (m, 1H), 3,74 (dd, $J = 11,4$ Hz, 3,9 Hz, 1H), 3,67 (dd, $J = 11,4$ Hz, 5,0 Hz, 1H), 3,54 (m, 2H), 3,48 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,27 (m, 20H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 72,8, 72,0, 70,5, 64,5, 32,1, 30,0, 29,9, 29,8, 29,8, 29,8, 29,6, 29,5, 26,3, 22,9, 14,3; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{36}$ Na O_3 ($M^+ + 23$), 311,2557, experimental m/z 311,2555.

3-((10Z,13Z)-octadeca-10,13-dieniloxi)propan-1,2-diol, 4b

Rendimiento: 70%; IR (film) 3105, 2990, 2365, 1530, 1329 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,33 (m, 4H), 3,83 (m, 1H), 3,64 (m, 2H), 3,47 (m, 4H), 2,74 (m, 2H), 2,01 (m, 4H), 1,55 (m, 2H), 1,27 (m, 18H), 0,86 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 130,4, 130,3, 130,2, 130,2, 128,2, 128,1, 128,1, 128,0, 72,6, 72,5, 72,0, 72,0, 70,8, 70,7, 64,4, 64,3, 31,8, 31,7, 29,9, 29,8, 29,7, 29,7, 29,7, 29,6, 29,6, 29,5, 29,5, 29,4, 29,4, 29,4, 27,4, 26,3, 26,2, 25,8, 25,8, 22,8, 22,7, 14,3; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{40}$ Na O_3 ($M^+ + 23$), 363,2698, encontrado m/z 363,2697.

4.2. Procedimiento general utilizado para la protección con el grupo MMTr

Los dioles 4a o 4b (1,0 eq) se co-evaporaron con piridina y se disolvieron en piridina anhidra (2 mL). N,N-Dimetilpiridina (DMAP) (0,1 eq) y cloruro de monometoxitritilo ((MeO)TrCl) (1,5 eq) se añadieron a temperatura ambiente y la mezcla se agita a 40°C durante 16 horas. La reacción se paró por adición de MeOH (5 mL), la mezcla se concentra al vacío y el residuo se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (DCM:MeOH:TEA 98:1:1).

1-((4-metoxifenil)difenilmetoxi)-3-(tetradeciloxi)propan-2-ol, 5a

Rendimiento: 80%; IR (film) 3200, 1630, 1521, 1232, 990 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,37 (m, 2H), 7,23 (m, 5H), 7,19 (m, 5H), 6,77 (m, 1H), 6,74 (m, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,46 (dd, $J = 9,7$ Hz, 4,2 Hz, 1H), 3,39 (dd, $J = 9,7$ Hz, 6,4 Hz, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,11 (m, 2H), 2,34 (ancho d, 1H), 1,47 (m, 2H), 1,19 (m, 22H), 0,81 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 158,9, 158,7, 150,0, 147,3, 144,6, 135,7, 130,5, 129,4, 128,7, 128,6, 128,1, 128,0, 128,0, 127,3, 127,1, 123,9, 113,4, 113,3, 86,5, 81,9, 72,2, 71,8, 70,1, 64,7, 55,4, 55,4, 32,1, 30,0, 29,9, 29,8, 29,8, 29,8, 29,7, 29,5, 26,3, 22,9, 14,3; HR ESI MS: m/z calculado for $\text{C}_{38}\text{H}_{54}$ Na O_5 ($M^+ + 23$), 613,7623, experimental m/z 613,7622.

1-((4-metoxifenil)difenilmetoxi)-3-((10Z,13Z)-octadeca-10,13-ieniloxi)propan-2-ol, 5b

Rendimiento: 67%; IR (film) 3300, 2980, 2732, 1600, 1475, 1200, 995 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,57 (m, 1H), 7,36 (m, 2H), 7,20 (m, 7H), 7,10 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,75 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 5,29 (m, 4H), 3,87 (m, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,45 (dd, $J = 9,7$ Hz, 4,2 Hz, 1H), 3,37 (m, 1H), 3,10 (m, 2H), 3,01 (m, 2H), 2,69 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,42 (ancho d, 1H), 1,96 (m, 2H), 1,46 (m, 2H), 1,20 (m, 18H), 0,80 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 158,8, 149,9, 147,4, 144,6, 139,5, 136,1, 130,5, 129,4, 128,6, 128,1, 128,0, 128,0, 127,3, 127,1, 123,9, 113,4, 86,5, 81,9, 72,3, 71,8, 70,1, 64,7, 55,4, 31,7, 29,9, 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 27,5, 27,4, 26,3, 25,8, 22,8, 14,3; HR ESI MS: m/z calculado for $\text{C}_{42}\text{H}_{58}$ Na O_5 ($M^+ + 23$), 665,8249, experimental m/z 665,8250.

2,3-bis(tetradeciloxi)propan-1-ol, 10

Una mezcla del alcohol 9 (100 mg, 0,191 mmol), ácido N,N-dimetilbarbitúrico (80 mg, 0,514 mmol, 2,7 eq) y catalizador (12,3 mg, 0,011 mmol, 0,05 eq) se disolvieron en tetrahidrofurano (THF) anhidro (2,5 mL) y la mezcla se calentó 90°C en un tubo sellado durante 16 horas. El disolvente se evaporó y el residuo fue purificado por cromatografía de columna en gel de sílice (DCM:MeOH 0% to 1%) obteniéndose un sólido blanco. Rendimiento: 97%; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3,72 (m, 1H), 3,61 (m, 2H), 3,50 (m, 2H), 3,30 (m, 2H), 2,91 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 1,54 (m, 8H), 1,26 (m, 12H), 0,88 (t, $J = 6,88$ Hz, 6H).

ES 2 368 300 A1

N,N-dimetil-2-(tetradeciloxi)-3-(tritoloxi)propan-1-amina, 16

El alcohol 15 (300 mg, 0,830 mmol) y 60% NaH (133 mg, 3,32, 4,0 eq) se suspendieron en THF anhidro (4,5 mL) y la mezcla se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadió en bromuro de alquilo (575 mg, 2,1 mmol, 2,0 eq) gota a gota. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añade agua (1,5 mL) lentamente y con cuidado. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en diclorometano (10 mL). La solución se lavó con agua (2 x 20 mL) y solución de NaCl (2x 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato sódico y el disolvente se evaporó. El crudo se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (Ch:TEA 99:1 → Ch:AcOEt:TEA 98:1:1). Rendimiento: 77%; IR (film) 3059, 2924, 2853, 2818, 2766, 1490, 1449, 1074, 909 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,39 (m, 4H), 7,19 (m, 11H), 3,45 (m, 1H), 3,38 (m, 2H), 3,08 (m, 2H), 2,31 (s, 6H), 1,49 (m, 2H), 1,18 (m, 22H), 0,81 (t, J = 6,6 Hz, 3H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 144,4, 128,9, 127,9, 127,1, 86,7, 77,9, 70,7, 70,6, 64,9, 61,7, 60,2, 46,5, 45,7, 32,1, 30,4, 30,0, 29,9, 29,8, 29,6, 26,4, 22,9, 14,4; HR ESI MS: m/z calculado for C₃₈H₅₆ NO₂ (M⁺ + H), 558,4306, encontrado m/z 558,4298.

15 *3*-(dimetilamino)-2-(tetradeciloxi)propan-1-ol, 17

El alcohol 16 (358 mg, 0,642 mmol) se disolvió en una mezcla del 20% de ácido trifluoroacético (TFA) en DCM (2:8). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La capa orgánica se llevó a pH básico por adición de una solución de NaOH 1M y se extrajo dos veces con DCM (20 mL). La capa orgánica se secó con sulfato sódico y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (DCM:MeOH:TEA 90:9:1). Rendimiento: 76%; IR (film) 3110, 2960, 2874, 1530, 1470, 1065, 864 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,79 (dd, J = 10,9 Hz, 4,1 Hz, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,48 (m, 5H), 2,60 (m, 2H), 2,32 (s, 6H), 1,54 (m, 2H), 1,25 (m, 20H), 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 75,3, 70,1, 65,6, 62,9, 46,5, 32,1, 30,3, 29,9, 29,8, 29,8, 29,8, 29,8, 29,6, 29,5, 26,3, 22,9, 14,3; HR ESI MS: m/z calculado for C₁₉H₄₁NO₂ (M⁺ + H), 316,2143, experimental m/z 316,2142.

30 4.3. Procedimiento general utilizado en la síntesis de los lipo-fosforamiditos 11, 13 y 18

A una solución formada por el alcohol 10, en DCM (2,0 mL), se añadió N,N-diisopropiletilamina (2,0 eq) gota a gota y a temperatura ambiente. A continuación la solución se enfrió a 0°C y se añadió β-cianoetil-N, N-diisopropilaminoclorofosfina (1,0 eq). La mezcla resultante se sacó del baño de hielo y se permitió que alcanzara la temperatura ambiente para ser agitada durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con más DCM (10 mL) y se lavó con 10 mL de 0,5M bicarbonato sódico enfriado. La capa orgánica se secó con sulfato sódico anhidro y se evaporó obteniéndose un aceite incoloro. Se utilizó una bomba de vacío para eliminar las últimas trazas de disolvente y N,N-diisopropiletilamina. El crudo se utilizó directamente sin más purificación.

40 *2,3*-bis(tetradeciloxi)propil 2-cianoetil diisopropilfosforamidito, 11

Rendimiento: 80%; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4,12 (m, 2H), 3,79 (m, 1H), 3,47 (m, 8H), 3,26 (m, 1H), 2,69 (m, 2H), 2,56 (m, 2H), 1,48 (m, 4H), 1,18 (m, 44H), 1,12 (d, J = 6,7 Hz, 6H), 1,10 (d, J = 6,7 Hz, 6H), 0,81 (t, J = 6,6 Hz, 6H); ³¹P-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 150,1.

45 *2*-cianoetil (10Z,13Z)-octadeca-10,13-dienil diisopropilfosforamidito, 13

Rendimiento: 100%; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5,38 (m, 4H), 3,83 (m, 2H), 3,60 (m, 4H), 2,80 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,63 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,08 (m, 4H), 1,62 (m, 2H), 1,36 (m, 18H), 0,84 (t, J = 6,8 Hz, 3H); ³¹P-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 149,8.

55 *2*-cianoetil 3-(dimetilamino)-2-(tetradeciloxi)propil diisopropilfosforamidito, 18

Rendimiento: 69%; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,18 (m, 2H), 3,88 (m, 1H), 3,56 (m, 6H), 2,76 (m, 2H), 2,63 (m, 2H), 2,26 (s, 6H), 1,56 (m, 2H), 1,25 (m, 22H), 1,19 (m, 12H), 0,88 (t, J = 6,5 Hz, 3H); ³¹P-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 150,1.

60 *4*-((12-bromododeciloxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano, 21

El alcohol 19 (200 mg, 1,51 mmol) se hizo reaccionar con el óxido de dibutilestaño (751 mg, 3,02 mmol; 2,0 eq) en metanol seco (10 mL) a reflujo durante 3h. A continuación se eliminó el metanol y se eliminaron las trazas de agua por destilación azeotrópica con tolueno. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se añadieron 1,12-dibromododecano (991 mg, 3,02 mmol; 2,0 eq), fluoruro de cesio (458 mg, 3,02 mmol; 2,0 eq) y DMF anhidra (10 mL). La mezcla de reacción se mantuvo 16 h a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (Ch:AcOEt 1% to 4%). Rendimiento: 47%; IR (film) 2989, 2931, 2858,

ES 2 368 300 A1

1455, 1367, 1255, 1212, 1115, 1054, 845 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4,24 (q, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,03 (dd, $J = 14,6$ Hz, 8,2 Hz; 1H), 3,71 (dd, $J = 8,2$ Hz, 14,6 Hz; 1H), 3,49 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,38 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 1,83 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,40 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 1,25 (m, 16H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 109,9, 75,4, 72,5, 72,4, 67,5, 34,6, 33,4, 30,2, 30,1, 30,1, 30,0, 30,0, 29,4, 28,8, 27,4, 26,6, 26,0; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{BrO}_3 \text{ Na}$ ($\text{M} + \text{Na}$), 401,1661; experimental, m/z 401,1662; calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{70}\text{O}_6\text{NaBr}_2$ ($2\text{M} + \text{Na}$), 779,3427; experimental, 779,3431.

4-((12-azidododecilo)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano, 22

El compuesto 21 (100 mg, 0,264 mmol) se disolvió en 5 mL de DMF anhidra. A la solución se añadió NaN_3 (103 mg, 1,58 mmol; 6,0 eq) y la mezcla se agitó y se calentó a 70°C durante 48 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió agua cuidadosamente. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (Ch:AcOEt 1% a 3%). Rendimiento: 93%; IR (film) 2935, 2858, 2363, 2344, 2093, 1251, 1077 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4,26 (q, $J = 6,1$ Hz, 1H), 4,06 (dd, $J = 14,6$ Hz, 8,23 Hz; 1H), 3,72 (dd, $J = 8,22$ Hz, 14,6 Hz; 1H), 3,51 (m, 2H), 3,43 (m, 2H), 3,25 (t, $J = 6,97$ Hz, 2H), 1,59 (m, 6H), 1,42 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,27 (m, 14H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 109,3, 74,7, 71,8, 71,7, 66,9, 51,4, 29,5, 29,4, 29,4, 29,4, 29,4, 29,1, 28,7, 26,7, 26,6, 26,0, 25,3; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3$ (M^+), 342,2755; experimental, m/z 342,2751; calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3\text{K}$ ($\text{M} + \text{K}$), 380,2312; experimental, 380,2310.

tert-butil 12-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)dodecilcarbamato, 23

Se mezclaron la azida 22 (85 mg, 0,249 mmol) junto con PPh_3 (131 mg, 0,498 mmol; 2,0 eq) en 3 mL de tetrahidrofurano (THF) anhidro. La reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación se añadió agua (500 μL) gota a gota. La mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó y el crudo se secó, rindiendo la amina correspondiente. Esta amina se disolvió en 2,0 mL de DCM; y se añadió trietilamina (TEA) (69 μL , 0,498 mmol; 2,0 eq) gota a gota junto con Boc_2O (82 mg, 0,373 mmol; 1,5 eq). La mezcla de reacción se agitó 5 h a temperatura ambiente. La capa orgánica se extrajo con más DCM (5 mL) y se lavó con agua (3 x 10 mL). La capa orgánica se secó con sulfato sódico anhidro. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (Ch:AcOEt 4% to 9%). Rendimiento: 65%; IR (film) 3020, 2935, 2850, 1699, 1506, 1371, 1216, 1166, 1046 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4,49 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 4,04 (dd, $J = 14,6$ Hz, 8,2 Hz; 1H), 3,72 (dd, $J = 14,6$ Hz, 8,2 Hz; 1H), 3,50 (m, 2H), 3,42 (m, 2H), 3,08 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,41 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,24 (m, 18H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 110,0, 75,4, 72,5, 72,4, 67,6, 30,7, 30,2, 30,1, 29,9, 29,1, 27,4, 27,4, 26,7, 26,1; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NO}_5$ ($\text{M}^+ + 1$), 416,3370; experimental, m/z 416,3370.

N-(12-(2,3-dihidroxi)propoxi)dodecil)-2,2,2-trifluoroacetamida, 24

El compuesto 23 (60,0 mg, 0,161 mmol) se disolvió en una mezcla de DCM/TFA 10% (5 mL) a temperatura ambiente durante 20 minutos. El disolvente se evaporó obteniéndose el correspondiente trifluoroacetato en forma de sal. Este producto se disolvió en DCM anhidro (5,0 mL) y se añadió TEA gota a gota (45 μL , 0,322 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió trifluoroacetato de etilo (22,0 μL , 0,177 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, extrayendo la capa orgánica con más DCM (3 x 10 mL), que se lavó posteriormente con agua (3 x 10 mL). La capa orgánica se secó con sulfato sódico anhidro. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (DCM:MeOH 2%). Rendimiento: 87%; IR (film) 3333, 2924, 2854, 1694, 1552, 1471, 1185 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6,42 (s ancho, 1H), 3,05 (m, 1H), 3,72 (dd, $J = 11,4$ Hz, 3,8 Hz; 1H), 3,65 (dd, $J = 11,4$ Hz, 5,2 Hz; 1H), 3,51 (m, 2H), 3,49 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 1,57 (m, 2H), 1,26 (m, 20H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 73,2, 72,5, 71,0, 64,9, 40,6, 30,2, 30,1, 30,1, 30,1, 30,0, 29,7, 29,6, 27,3, 26,7; $^{19}\text{F-NMR}$ δ -76,3 (referencia CFCl_3); HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{NO}_4$ ($\text{M}^+ + 23$), 394,2175; experimental, m/z 342,2176.

N-(12-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-2-hidroxi)propoxi)dodecil)-2,2,2-trifluoroacetamida, 25

El compuesto 24 (52 mg, 0,140 mmol) se hizo reaccionar con cloruro de dimetoxitritilo (DMTrCl) (48 mg, 0,141 mmol; 1,2 eq) y DMAP (8 mg, 0,07 mmol; 0,5 eq) en 1,5 mL de piridina anhidra. La reacción se calentó a 40°C y se mantuvo agitando toda la noche. A continuación, se añadió metanol (0,5 mL) y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (Hex/AcOEt 15%). Rendimiento: 58%; IR (film) 3276, 3072, 2927, 2851, 1716, 1673, 1607, 1502, 1462, 1390, 1248, 1176, 1038 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,67 (m, 4H), 7,40 (m, 2H), 7,28 (m, 3H), 7,01 (broad s, 1H), 6,81 (d, $J = 8,9$ Hz, 4H), 3,92 (m, 1H), 3,76 (s, 6H), 3,74 (m, 1H), 3,51 (m, 2H), 3,43 (m, 2H), 3,35 (m, 1H), 3,17 (m, 2H), 2,41 (broad d, 1H), 1,85 (m, 2H), 1,57 (m, 9H), 1,25 (m, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 162,7, 158,6, 149,9, 145,0, 136,3, 136,2, 130,2, 128,3, 127,9, 126,9, 123,9, 113,2, 86,2, 72,3, 71,8, 70,1, 64,7, 55,4, 55,3, 55,3, 50,8, 40,2, 36,6, 31,6, 29,9, 29,8, 29,7, 29,7, 29,6, 29,6, 29,6, 29,3, 29,1, 26,8, 26,2; $^{19}\text{F-NMR}$ δ -74,3 (referencia CFCl_3); HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{F}_3\text{NO}_6$ ($\text{M}^+ + 23$), 696,3482; experimental, m/z 696,3490.

ES 2 368 300 A1

4.4. Procedimiento general utilizado en las reacciones de tipo click (29a-b y 32)

En una mezcla (1:1) de agua y tert-butil alcohol (1,0 mL) se añadieron la azida 22 (1,0 eq) y los alquinos (26-28) (1,0 eq). A la mezcla se añadió gota a gota ascorbato sódico (10%) y sulfato de cobre (II) pentahidratado (1%). La mezcla heterogénea se agitó vigorosamente durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y la capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice.

tert-butil (1-(12-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)dodecil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilcarbamato, 29a

Rendimiento: 69%; IR (film) 2929, 2861, 1713, 1500, 1458, 1369, 1250, 1169, 1050, 752 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,43 (s, 1H), 5,09 (s ancho, 1H), 4,32 (d, J = 5,9 Hz; 2H), 4,24 (t, J = 7,2 Hz; 2H), 4,19 (m, 1H), 3,98 (dd, J = 14,6 Hz, 8,2 Hz; 1H), 3,65 (dd, J = 14,6 Hz, 8,2 Hz; 1H), 3,44 (m, 2H), 3,38 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,35 (s, 3H), 1,29 (s, 3H), 1,21 (m, 16H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 156,0, 122,4, 109,5, 79,5, 74,9, 72,1, 72,0, 67,1, 50,6, 36,4, 36,3, 30,4, 29,7, 29,7, 29,7, 29,6, 29,6, 29,5, 29,1, 28,5, 26,9, 26,6, 26,2, 25,6; ; HR ESI MS: m/z calculado para C₂₆H₄₈N₄O₅ (M⁺+1), 497,3697; experimental, m/z 497,3698; calculado para C₂₆H₄₈N₄O₅ Na (M⁺+23), 519,3516; experimental, m/z 519,3517.

(9H-fluoren-9-il)metil (1-(12-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)dodecil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilcarbamato, 29b

Rendimiento: 58%; IR (film) 2930, 2858, 1721, 1523, 1448, 1370, 1250, 1120, 1049, 758, 738 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (d, J = 7,5 Hz; 2H), 7,57 (d, J = 7,5 Hz; 2H), 7,47 (s, 1H), 7,38 (t, J = 7,3 Hz; 2H), 7,29 (t, J = 7,4 Hz; 2H), 5,48 (d ancho, 1H), 4,46 (d, J = 6,0 Hz; 2H), 4,40 (d, J = 7,0 Hz; 2H), 4,31 (t, J = 7,2 Hz; 1H), 4,25 (t, J = 6,0 Hz; 2H), 4,22 (m, 2H), 4,05 (dd, J = 14,6 Hz, 8,2 Hz; 1H), 3,72 (dd, J = 14,6 Hz, 8,2 Hz; 1H), 3,50 (m, 2H), 3,42 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,41 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,27 (m, 16H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 156,3, 143,8, 141,2, 127,6, 127,0, 125,0, 119,9, 109,3, 74,7, 71,9, 71,8, 66,9, 50,3, 47,2, 36,5, 30,2, 29,5, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 28,9, 26,7, 26,4, 26,0, 25,4; HR ESI MS: m/z calculado para C₃₆H₅₀N₄O₅ (M⁺+1), 619,3853; experimental, m/z 619,3858; calculado para C₃₆H₅₀N₄O₅ Na (M⁺+23), 641,3673; experimental, m/z 641,3675.

2-(4-(1-(12-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)dodecil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)butil)isoindolin-1,3-diona, 32

Rendimiento: 89%; IR (film) 2919, 2854, 2363, 2342, 1710, 1053 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,81 (m, 2H), 7,69 (m, 2H), 7,27 (s, 1H), 4,27 (t, J = 7,24 Hz; 2H), 4,22 (m, 1H), 4,04 (dd, J = 14,6 Hz, 8,2 Hz; 1H), 3,69 (m, 3H), 3,49 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 2,74 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,72 (m, 4H), 1,54 (m, 2H), 1,40 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 1,26 (m, 16H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 168,6, 134,1, 132,3, 123,3, 109,5, 74,9, 72,1, 72,0, 67,1, 50,4, 37,8, 30,5, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,2, 28,2, 26,9, 26,8, 26,7, 26,2, 25,6, 25,3; HR ESI MS: m/z calculado para C₃₂H₄₈N₄O₅ (M⁺+1), 569,3697; experimental, m/z 569,3697 calculado para C₃₂H₄₈N₄O₅ Na (M⁺+23), 591,3516; experimental, m/z 591,3516.

(9H-Fluoren-9-il)metil (1-(12-(2,3-dihidroxi)propoxi)dodecil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilcarbamato, 30b

Se disolvió el compuesto 29b (48 mg; 0,078 mmol) en una mezcla de CH₂Cl₂/TFA 3% (2,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El disolvente se evaporó a sequedad, lavándose tres veces con más CH₂Cl₂. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH 2%). Rendimiento: 72%; IR (film) 3329, 2926, 2858, 1715, 1522, 1441, 1256, 1127, 1043, cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (d, J = 7,5 Hz; 2H), 7,58 (d, J = 7,3 Hz; 2H), 7,38 (t, J = 7,3 Hz; 2H), 7,28 (m, 3H), 5,83 (s ancho, 1H), 5,31 (s, 2H), 4,64-4,13 (m, 5H), 3,76 (m, 4H), 3,47 (m, 4H), 1,89 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,26 (m, 16H); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 156,4, 143,6, 141,1, 127,5, 126,8, 124,9, 119,8, 72,3, 71,6, 70,3, 70,2, 66,7, 64,0, 53,2, 50,6, 47,0, 29,9, 29,5, 29,3, 29,2, 29,2, 29,2, 29,2, 29,1, 28,7, 26,3, 25,8; HR ESI MS: m/z calculado para C₃₃H₄₇N₄O₅ (M⁺+1), 579,3540; experimental, m/z 579,3539 calculado para C₃₃H₄₆N₄O₅ Na (M⁺+23), 601,3360; experimental, m/z 601,3358.

(9H-Fluoren-9-il)metil (1-(12-(2-hidroxi-3-((4-metoxifenil)difenilmetoxi)propoxi) dodecil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilcarbamato, 31

Se disolvió el compuesto 30b (32 mg; 0,055 mmol) con DMAP (3 mg; 0,0275 mmol; 0,5 eq) y cloruro de monometoxitritilo (MMTrCl) (26 mg, 0,083 mmol; 1,5 eq) en piridina (1,5 mL). La reacción se calentó a 40°C y se agitó durante toda la noche. Se añadió metanol (1,0 mL) y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (CH₂Cl₂:MeOH 1%). Rendimiento: 45%; IR (film) 3064, 2930, 2855, 1726, 1607, 1505, 1449, 1252, 1074, 755 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,69 (d, J = 7,5 Hz; 1H), 7,50 (d, J = 7,5 Hz; 1H), 7,35 (m, 4H), 7,21 (m, 4H), 7,13 (m, 1H), 6,73 (d, J = 8,9 Hz; 1H), 5,37 (m, 1H), 4,38 (dd, J = 22,9 Hz, 5,8 Hz; 4H), 4,18 (m, 4H), 3,87 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,45 (m, 2H), 3,38 (m, 2H), 3,10 (m, 2H), 2,48 (c, J = 7,2 Hz; 2H), 1,80 (m, 2H),

ES 2 368 300 A1

1,46 (m, 2H), 1,18 (m, 16H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 158,8, 156,6, 144,6, 144,0, 141,5, 135,7, 130,5, 128,7, 128,6, 128,0, 127,9, 127,2, 127,1, 125,2, 122,2, 120,0, 113,3, 86,5, 72,3, 71,8, 70,0, 67,0, 64,7, 55,4, 50,6, 47,4, 46,4, 36,7, 30,4, 29,8, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,2, 26,7, 26,7, 26,3; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{53}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_6$ ($\text{M}^+ + 23$), 873,4558; experimental, m/z 873,4555 calculado para $\text{C}_{106}\text{H}_{124}\text{N}_8\text{O}_{12}$ Na ($2\text{M}^+ + 23$), 1723,9230; experimental, m/z 1723,9234.

2-(4-(1-(12-(2,3-dihidroxi)propoxi)dodecil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)butil)isoindolin-1,3-diona, 33

Se hizo reaccionar el compuesto 32 (30 mg, 0,052 mmol; 1,0 eq) con pTsOH (5 mg, 0,026 mmol; 0,5 eq) en metanol (1,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El metanol se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (CH_2Cl_2 :MeOH 2%). Rendimiento: 100%; IR (film) 3349, 2924, 2850, 1684, 1517, 1251, 1170, 1123, 1046 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,82 (m, 2H), 7,69 (m, 2H), 7,28 (s, 1H), 4,27 (t, $J = 7,2$ Hz; 2H), 3,85 (m, 1H), 3,69 (m, 3H), 3,63 (m, 1H), 3,49 (m, 2H), 3,44 (m, 2H), 2,74 (m, 2H), 2,53 (broad d, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,72 (m, 4H), 1,55 (m, 2H), 1,23 (m, 18H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 168,6, 134,1, 132,3, 123,4, 72,7, 72,0, 70,6, 64,4, 50,4, 37,8, 30,5, 29,7, 29,6, 29,6, 29,6, 29,5, 29,5, 29,1, 28,2, 26,8, 26,6, 26,2, 25,3; HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_5$ ($\text{M}^+ + 1$), 529,3384; experimental, m/z 529,3384; calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_5$ Na ($\text{M}^+ + 23$), 551,3190; experimental, m/z 551,3200.

N-(4-(1-(12-(3-(bis(4-metoxifenil)fenil)metoxi)-2-hidroxi)propoxi)dodecil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)butil)-2,2,2-trifluoroacetamida, 35

Se disolvió el compuesto 33 (30 mg, 0,060 mmol) en una mezcla de DCM/TFA 3% y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en DCM anhidro (1,5 mL). Se añadió TEA (38 μL) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió 0°C y se añadió EFTA (8,0 μL) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 0°C . La capa orgánica se lavó con agua y solución acuosa de NaCl (3 x 10 mL) y secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad. El producto obtenido se utilizó en el siguiente paso sin más purificación. El producto obtenido se hizo reaccionar con MMTCl (27,8 mg, 0,09 mmol; 1,5 eq) en presencia de DMAP (4,0 mg, 0,03 mmol; 0,5 eq) en 1,0 mL de piridina. La mezcla de reacción se calentó a 40°C y se agitó durante toda la noche. Se detuvo la reacción por adición de metanol (1,0 mL) y el disolvente se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (DCM/MeOH/TEA 98:1:1). Rendimiento: 39%; IR (film) 3065, 2935, 2860, 1715, 1650, 1593, 1454, 1230, cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,41 (m, 2H), 7,31 (m, 4H), 7,26 (m, 4H), 6,82 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H), 4,29 (t, $J = 7,2$ Hz; 2H), 3,94 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,51 (m, 2H), 3,42 (m, 4H), 3,17 (m, 2H), 2,99 (m, 3H), 2,74 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,67 (m, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,28 (m, 16H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 158,6, 150,0, 147,4, 145,0, 136,2, 130,2, 128,3, 128,0, 126,9, 124,0, 120,9, 113,2, 86,2, 72,3, 71,8, 70,1, 64,6, 55,4, 50,4, 39,8, 30,5, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,2, 28,1, 26,7, 26,4, 26,3, 24,9; $^{19}\text{F-NMR}$ δ -73,5 (referencia CFCl_3); HR ESI MS: m/z calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_6$ ($\text{M}^+ + 1$), 796,4434; experimental, m/z 796,44353 calculado para $\text{C}_{44}\text{N}_{59}\text{N}_4\text{O}_6$ ($\text{M}^+ + 23$), 819,3745; experimental, m/z 819,3742.

Procedimiento general usado para la funcionalización de los soportes poliméricos, 7a y 7b, 36, 37, 38

Se hicieron reaccionar los alcoholes 5a-b, 26, 31 y 35 con anhídrido succínico (1,5 eq) en presencia de DMAP (1,5 eq) en DCM anhidro (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (5 mL) y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa 0,1M Na_2HPO_4 . La capa orgánica se seco con sulfato sódico y el disolvente se evaporó a sequedad. Los productos obtenidos (hemisuccinatos) se utilizaron directamente sin más purificación.

Se disolvió 2,2-Ditio-bis-(5-nitropiridina) (DTB, 0,1 mmol) en 400 μL of acetonitrilo y la solución se mezcló con una solución que contenía el hemisuccinato (0,1 mmol) y DMAP (0,1 mmol) en acetonitrilo (500 μL). Finalmente se añadió una solución de trifenilfosfina (TPP) (0,1) disuelta en acetonitrilo (200 μL), todo ello a temperatura ambiente.

La mezcla se agitó con el vórtex durante unos segundos y se añadió a una jeringa que contenía el soporte polimérico de vidrio de poro controlado (LCAA-CPG) (500 mg, 0,05 mmol de grupos amino) y se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de metanol (500 μL). El soporte polimérico se lavó con metanol (3 x 10 mL), acetonitrilo (3 x 10 mL) y dietil éter (3 x 10 mL). El soporte se secó al vacío y se bloquearon los grupos amino residuales por acetilación con una mezcla de anhídrido acético/piridina/tetrahidrofurano (500 μL) y 1-metilimidazol en tetrahidrofurano (500 μL). Al cabo de 30 minutos, el soporte polimérico se lavó con metanol (3 x 10 mL), acetonitrilo (3 x 10 mL) y dietil éter (3 x 10 mL). El soporte resultante se secó primero al aire y después aplicando vacío. El soporte polimérico se almacenó a 4°C . El grado de funcionalización de los soportes se determinó por eliminación de los grupos DMTr o MMTr en una pequeña alícuota y leyendo la absorbancia del catión DMTr a 500 nm o la del catión MMTr a 475 nm desprendidos de los soportes durante la eliminación. El grado de funcionalización de los soportes preparados estuvo entre 15-35 nmol/g.

ES 2 368 300 A1

4.5. Síntesis de oligonucleótidos

Los oligoribonucleótidos se prepararon utilizando un sintetizador de la casa comercial Applied Biosystems modelo 3400 utilizando fosforamiditos de 2-cianoetilo y los protectores de tipo tert-butildimetilsilil (TBDMS) para la protección del grupo hidroxilo en la posición 2'. Se utilizaron las siguientes soluciones: 0,4 M 1H-tetrazol en ACN (catalizador); 3% ácido tricloroacético en DCM (destritilación), anhídrido acético/piridina/tetrahidrofurano (1: 1: 8) (capping A), 10% N-metilimidazol en tetrahidrofurano (capping B), 0,01 M iodo en tetrahidrofurano/piridina/agua (7: 2: 1) (oxidación). En las secuencias de ARN, se eliminó el último DMT ya que el grupo DMT no es totalmente estable al tratamiento de fluoruro. El rendimiento medio por etapa de adición de un nucleótidos fue alrededor del 97-98% para los monómeros de ARN. Los soportes poliméricos obtenidos se trataron con una solución concentrada de amoniaco-etanol (3:1) durante 1 h a 55°C. Los soportes se lavaron con etanol y las soluciones resultantes se combinaron y se evaporaron a sequedad. Los productos resultantes se trataron con 0,15 mL de trietilaminatris(hidrofluoruro)/trietilamina/N-metilpirrolidona (4:3:6) durante 2,5 h a 65°C con el fin de eliminar los grupos TBDMS. Las reacciones se detuvieron por adición de 0,3 mL of isopropoxitrimetilsilano y 0,75 mL de éter. Las mezclas resultantes se agitaron y se enfriaron a 4°C. Se formó un precipitado que fue centrifugado a 7000 rpm durante 5 min a 4°C. Los precipitados se lavaron con éter y se centrifugaron de nuevo. Los residuos se disolvieron en agua y los conjugados se purificaron por HPLC. Columna: Nucleosil 120-10 C18 (250x4 mm); se utilizó un gradiente lineal de 20 min desde 0% a 50% B; con un flujo de 3 mL/min. Las composición de las soluciones utilizadas en el HPLC fueron: solución A: 5% acetonitrilo (ACN) en 100 mM acetato de trietilamonio (pH 6,5) y solución B: 70% ACN en 100 mM acetato de trietilamonio pH 6,5. Los productos purificados se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. La homogeneidad de los conjugados purificados se determinó por HPLC analítica y electroforesis en geles de poli(acrilamida) y todos presentaron una pureza superior al 90%.

El análisis de la pureza por HPLC analítico se realiza utilizando una columna XBridge™ OST C18 (Waters), 2,5 µm, 4,6 x 50 mm utilizando un gradiente lineal de 10 min desde 0% al 35% B, flow con un flujo de 1 mL/min. Las soluciones A y B son iguales a las descritas anteriormente.

Las electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes se llevaron a cabo en un aparato Hoefer Scientific SE-600. Los geles (8 M urea, 20%, con una relación de acrilamida/bisacrilamida 19:1), tenían unas dimensiones de 14 x 16 x 0,1 cm y se aplicó un voltaje de 400 V durante 5 h. Se cargaron tres microgramos de ARN por bolsillo. El gel se tiñó con Stains-all (Sigma).

Los espectros de MALDI-TOF se realizaron en un espectrómetro de masas Perseptive Voyager DETMRP, equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm utilizando un pulso de 3ns. La matriz utilizada contenía 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP, 10 mg/mL en ACN/agua 1:1) y citrato amónico (50 mg/mL en agua).

Oligoribonucleótidos

Las siguientes secuencias de ARN se obtuvieron de Fuentes comerciales (Sigma-Prologo, Dharmacon): cadena sentido o acompañante control negativo (scr) 5'-CAGUCGCGUUUGCGACUGG-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 3), cadena antisentido o guía control negativo (scr) 5'-CCAGUCGCAAACGCGACUG-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 4), cadena antisentido o guía anti-TNF-α: SEQ ID NO: 1 y cadena sentido o acompañante anti-TNF-α: SEQ ID NO: 2. Los monómeros de tipo ARN se detallan en letras mayúsculas, la abreviación dT corresponde timidina. La cadena acompañante anti-TNF-α con colesterol en el extremo 3' (SEQ ID NO: 2-colesterol) se preparó a partir del soporte sólido comercial que lleva el nombre de colesterol-tetraetilenglicol (TEG)-3'-CPG (Glen Research). Las secuencias de siARN anti-TNF-α habían sido descritas pARNi en la bibliografía para inhibir el mARN de TNF-α de ratón [D.R. Sorensen y col. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNA in adult mice. Journal of Molecular Biology 327 (2003) páginas 761-766].

4.6. Cultivos celulares, transfección y ensayos celulares

Células HeLa se cultivaron en condiciones habituales: 37°C, 5% CO₂, medio de Dulbecco Eagle modificado, 10% suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, suplementado con penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml). Todos los experimentos se hicieron a una confluencia del 40-60%. Las células HeLa se transfectaron con 250 ng del plásmido que expresa el gen de TNF-α de ratón utilizando lipofectina (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

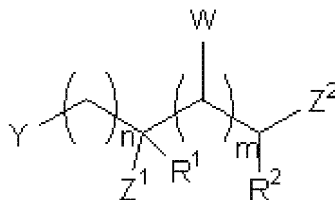
Protocolo A: Al cabo de una hora después de la transfección, las células HeLa que expresan m-TNF-α se transfectaron con 50nM de pARNi (SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 1, [D.R. Sorensen y col. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNA in adult mice. Journal of Molecular Biology 327 (2003) páginas 761-766] diseñado para inhibir TNF-α, utilizando oligofectamina (Invitrogen). La concentración de TNF-α en los sobrenadantes del cultivo celular se determinó utilizando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Bender MedSystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Protocolo B: Al cabo de una hora de la transfección con el plásmido, las células se trataron con pARNi dúplex (100 nM) sin la utilización de ningún agente de transfección. Al cabo de 48 h la cantidad de TNF-α producida por la células se analizó por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

ES 2 368 300 A1

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de pARNi y un lípido unidos covalentemente entre si representados por la siguiente fórmula (I):



Fórmula (I)

donde:

Y es un dúplex de pARNi unido mediante un enlace tipo fosfato;

W es grupo opcional, y es uno, o varios, sustituyentes que puede haber en cada unidad de metileno y se selecciona, o seleccionan independientemente, entre H, C₁-C₃ alquilo o Z³;

Z¹, Z² y Z³ se seleccionan independientemente entre H, C₁-C₆ alquilo, -NR₃R₄ y -O-R₅;

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H y C₁-C₆-alquilo;

R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente entre H, un lípido, C₁-C₆ alquilo;

n es un número entero que se selecciona entre 1, 2, 3, 4 y 5;

m es un número entero que se selecciona entre 0, 1, 2, 3 y 4;

con la condición de que al menos Z¹, Z² y/o Z³ es -O-lípido.

2. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque la cadena lipídica es un C₈-C₂₀ alquilo, ácidos grasos, acilglicérido, cérido, fosfolípidos, fosfoglicéridos, fosfoesfingolípidos, glucolípidos, cerebrósidos, gangliósidos, terpenoides, esteroides, eicosanoides o vitaminas A, D, E y K.

3. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el lípido se selecciona entre C₈-C₂₀ alquilo, ácidos grasos, fosfolípidos, fosfoglicéridos, fosfoesfingolípidos y glucolípidos.

4. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque Z₂ es -O-lípido.

5. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque Z₁ es -O-lípido.

6. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque Z₁ y Z₂ son independientemente -O-lípido.

7. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque n es 1, 2 ó 3, preferiblemente 1.

8. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque m es un número entero que se selecciona entre 0, 1 y 2, preferiblemente m es 0.

9. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre H y C₁-C₃ alquilo, preferiblemente R₁ y R₂ son H.

10. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la derivatización está introducida en la posición 3' del dúplex de pARNi.

ES 2 368 300 A1

11. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el puente presente en el compuesto de fórmula (I) entre el lípido, o lípidos, e Y proviene de una molécula de treoninol, glicerol, 2-amino-1,3-propandiol, 2-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,2-propandiol, hidroxiprolinol o serinol, preferiblemente proviene de glicerol.

12. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el dúplex de siARN (Y) tiene entre 15 y 40 nucleótidos por cadena.

13. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el dúplex de pARNi (Y) tiene entre 19 y 25 nucleótidos por cadena.

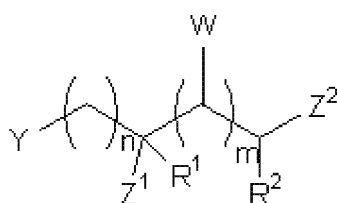
14. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la cadena de pARNi comprende al menos una sustitución seleccionada entre 2'-O-metilo-ribonucleótido, 2'-desoxirribonucleótido, 2'-metoxietil-ribonucleótido, 2'-fluoro-desoxirribonucleótido, 2'-fluoro-arabinonucleótido, ARN con enlaces fosforotioato, residuos abásicos, ribitales, 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, 4-alquiniilcitosina, 5-alquiniiluracilo, 5-halogenocitosina, 5-halogenouracilo, 7-deazaadenina, 7-deazaguanina o hipoxantina.

15. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dicho pARNi (Y) inhibe/silencia, total o parcialmente, la expresión de al menos uno de los siguientes genes: factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGF R1/2), factor supresor de colonias de granulocitos (GM-CSF-1) y de macrófagos (M-CSF-1), angiopoietina (ANGPT), apolipoproteína (ApoB), neovascularización vascular (CNV), carboxiquinasa fosfoenol piruvato (PEPCK), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP2), receptor de N-metil-D aspartato (NMDA), citoquina derivadas de los keratocitos (KC), receptor opio de delta (DOR), receptor del dominio de discoidina (DDR1), gen de la fosfoproteína PIV (PIV-P), oxigenasa hemo (HMOX1), caveloina, transportador de dopamina, proteína fluorescente verde y proteína del sarcoma de Swing (EWS-FL/1).

16. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque dicho pARNi (Y) inhibe/silencia, total o parcialmente, la expresión de al menos uno de los siguientes genes factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGF R1/2), factor supresor de colonias de granulocitos (GM-CSF-1) y de macrófagos (M-CSF-1).

17. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la secuencia de pARNi es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

18. Un compuesto de pARNi y un lípido unidos covalentemente entre si representados por la siguiente fórmula (II):



Fórmula (II)

donde:

Y es una cadena sencilla de pARNi;

W es grupo opcional, y es uno, o varios, sustituyentes que puede haber en cada unidad de metileno y se selecciona, o seleccionan independientemente, entre H, C₁-C₃ alquilo o Z³;

Z¹, Z² y Z³ se seleccionan independientemente entre H, C₁-C₆ alquilo, -NR₃R₄ y -O-R₅;

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H y C₁-C₆-alquilo;

R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente entre H, un lípido, C₁-C₆ alquilo;

n es un número entero que se selecciona entre 1, 2, 3, 4 y 5;

ES 2 368 300 A1

m es un número entero que se selecciona entre 0, 1, 2, 3 y 4;

con la condición de que al menos Z^1 , Z^2 y/o Z^3 es -O-lípido.

5

19. Un proceso para la síntesis de los compuestos de pARNi según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, basado en el procedimiento de síntesis en fase sólida, **caracterizado** porque comprende al menos las siguientes etapas:

10

i) unir el lípido y el puente para formar al menos un enlace éter tipo -O-lípido,

ii) unir el compuesto obtenido en el paso (i) a un soporte sólido,

15

iii) ensamblar de manera secuencial una de las cadenas de pARNi y al compuesto puente-O-lípido sobre el soporte,

iv) romper el enlace entre el soporte sólido y el producto y eliminar los grupos protectores obteniéndose una de las cadenas del pARNi y

20

v) mezclar cantidades equivalentes de las cadenas guía y acompañante para generar el dúplex de pARNi.

25

20. El proceso según se define en la reivindicación anterior, **caracterizado** porque el soporte sólido se selecciona entre vidrio, gel de sílice, vidrio poroso, óxido de silicio, poliestireno, polietilenglicol, poliestireno-polietilenglicol, poliamida, acrilamida, cloruro de polivinilo, teflón, papel y celulosa.

30

21. El proceso según se define en cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el lípido es unido a un soporte sólido y al menos una de las cadenas del pARNi es sintetizada utilizando el procedimiento de síntesis en fase sólida utilizando el soporte sólido funcionalizado con el lípido.

35

22. El proceso según se definen en cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el lípido es unido a un soporte sólido y al menos una de las cadenas del pARNi es sintetizada por adición sucesiva de derivados de los nucleósidos que constituyen la secuencia de la cadena incluyendo los fosforamiditos, los H-fosfonatos, los fosfatos diéster y los fosfatos monoéster.

40

23. El proceso según se define en cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el lípido es unido a un soporte sólido y al menos una de las cadenas del pARNi es sintetizada por adición sucesiva de los fosforamiditos de los nucleósidos que constituyen la secuencia de la cadena.

45

24. Un proceso para la síntesis de los compuestos de pARNi según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, basado en el procedimiento de síntesis en fase sólida, **caracterizado** porque comprende al menos las siguientes etapas:

50

i) preparar un derivado del lípido que contenga un grupo fosforilante que sirva para generar un grupo fosfato entre el lípido y el pARNi,

ii) sintetizar una de las cadenas de pARNi utilizando el procedimiento de síntesis en fase sólida.

iii) unir el derivado del lípido a la cadena de pARNi mediante un enlace fosfato,

55

iv) romper el enlace entre el soporte sólido y el producto y eliminar los grupos protectores obteniéndose una de las cadenas del pARNi y

v) mezclar cantidades equivalentes de las cadenas guía y acompañante para generar el pARNi.

60

25. Un proceso según se define en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, **caracterizado** porque el soporte sólido se selecciona entre vidrio, gel de sílice, vidrio poroso, o cualquier superficie de óxido de silicio, poliestireno, polietilenglicol, poliestireno-polietilenglicol, acrilamida u otras poliamidas, cloruro de polivinilo, teflón y sus derivados, papel y celulosa.

65

26. Un proceso según se define en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, **caracterizado** porque el soporte sólido se selecciona entre vidrio, gel de sílice, vidrio poroso, óxido de silicio, poliestireno, polietilenglicol, poliestireno-polietilenglicol, poliamida, acrilamida, cloruro de polivinilo, teflón, papel y celulosa.

70

27. El proceso según se define en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, **caracterizado** porque al menos una de las cadenas del pARNi se sintetiza por adición sucesiva de derivados de los nucleósidos que constituyen la secuencia de la cadena incluyendo los fosforamiditos, los H-fosfonatos, los fosfatos diéster y los fosfatos monoéster

ES 2 368 300 A1

y a continuación se añade el lípido utilizando los mismos derivados (fosforamiditos, los H-fosfonatos, los fosfatos diéster y los fosfatos monoéster).

5 28. El proceso según se define en la reivindicación 27, **caracterizado** porque al menos una de las cadenas del pARNi se sintetiza por adición sucesiva de derivados fosforamiditos de los nucleósidos y a continuación se añade el lípido utilizando también un fosforamidito del lípido.

10 29. Una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos de pARNi como se describen en las reivindicaciones 1 a 18 y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 30. La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque además comprende un agente de transfección.

15 31. La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque el agente de transfección se selecciona de la lista que comprende los siguientes compuestos: lipofectina, lipofectamina, oligofectamina, effectene, cellfectina, DOTAP, DOPE, fugene, polietilenglicol, colesterol, polietilenimida (PEI), Jet-polietilenimida, péptidos de penetración celular, péptidos troyanos, péptido TAT, penetratina, oligoarginina, poli-lisina, glicoproteína del virus de la rabia, nanopartículas de oro, dendrímeros, nanotubos de carbono, lípidos catiónicos, liposomas y cualquiera de sus combinaciones.

20 32. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, donde se presenta en una forma adaptada a la administración oral o parenteral, preferiblemente parenteral.

25 33. El uso de los compuestos de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o de las composiciones según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores para la preparación de un medicamento.

34. El uso según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento para el silenciamiento génico.

30 35. El uso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de las siguientes afecciones: cáncer, inflamación, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn o artritis reumatoides.

35

40

45

50

55

60

65

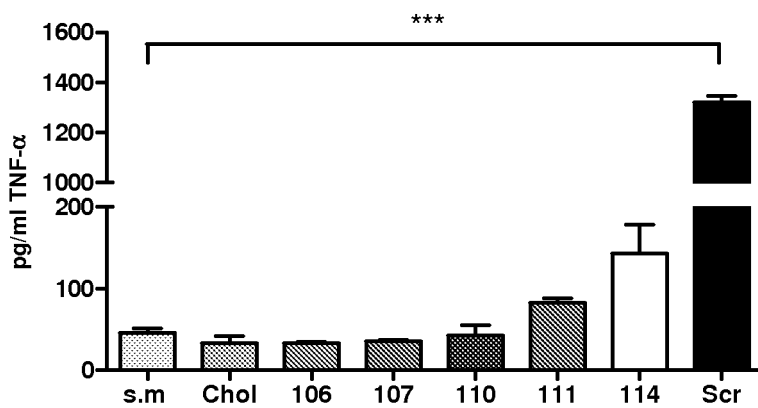


FIG. 1

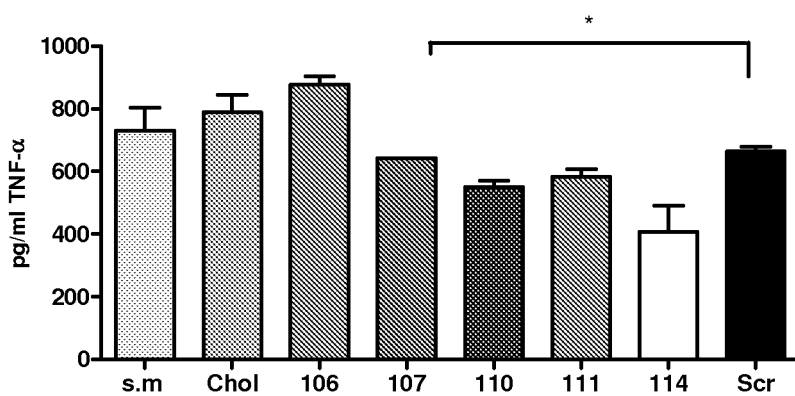


FIG. 2

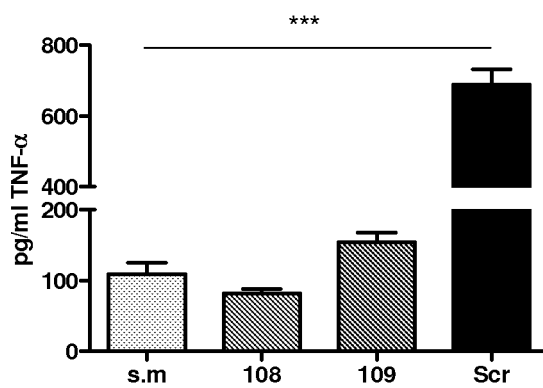


FIG. 3

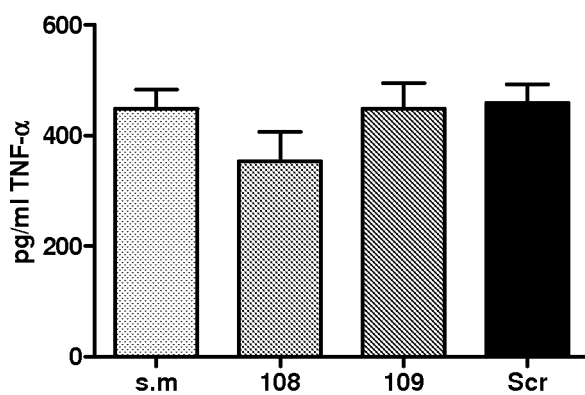


FIG. 4

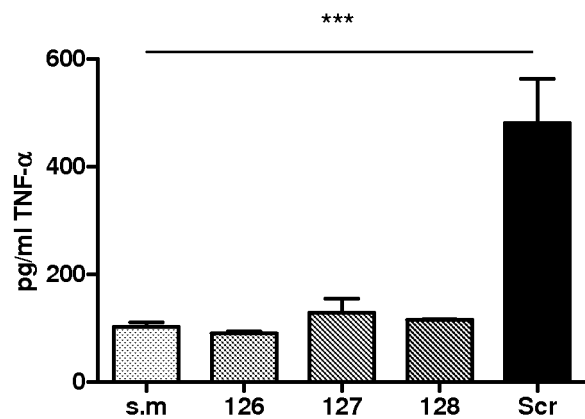


FIG. 5

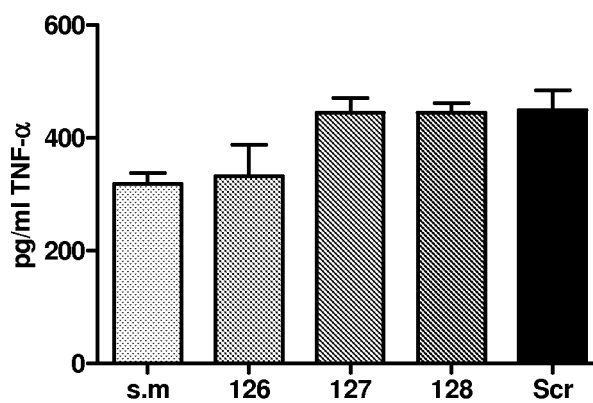


FIG. 6

ES 2 368 300 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Universidad de Barcelona
CIBER-BBN
- <120> Derivados lipofílicos de ácidos nucleicos
- 10 <130> ES1641.437
- <160> 5
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 21
- 20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Fragmento de la secuencia guía o antisentido del ARN de TNF alfa de *Mus musculus* a la que se han adicionado dos timinas en el extremo 3'.
- <400> 1
- 30 gaggcugaga cauaggcact t 21
- <210> 2
- 35 <211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Fragmento de la secuencia acompañante o sentido del ARN de TNF alfa de *Mus musculus* a la que se han adicionado dos timinas en el extremo 3'.
- 45 <400> 2
- gugccuaugu cucagccuct t 21
- 50 <210> 3
<211> 21
<212> DNA
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 60 <223> Fragmento de una secuencia guía o antisentido de ARN de *Euglena gracilis* a la que se han adicionado dos timinas en el extremo 3'.
- <400> 3
- 65 cagucgcguu ugcgacuggt t 21

ES 2 368 300 A1

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de una secuencia acompañante o sentido de ARN de *Euglena gracilis* a la que se han adicionado dos timinas en el extremo 3'.
10

<400> 4
15 ccagucgcaa acgcgacugt t 21

<210> 5
<211> 21
20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Fragmento de la secuencia acompañante o sentido del ARN de TNF alfa de *Mus musculus* a la que se han adicionado dos timinas en el extremo 3' y se han metilado algunos nucleótidos.

<220>
30 <221> misc_RNA
<222> (5)..(5)
<223> El nucleótido definido como "n" corresponde a un nucleótido "cm" de acuerdo con la lista de nucleótidos modificados del cuadro 2 del apéndice 2 de la Norma ST.25
35

<220>
<221> misc_feature
40 <222> (5)..(5)
<223> n es a, c, g, t o u

<220>
45 <221> misc_RNA
<222> (10)..(10)
<223> El nucleótido definido como "n" corresponde a un nucleótido "um" de acuerdo con la lista de nucleótidos modificados del cuadro 2 del apéndice 2 de la Norma ST.25
50

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
55 <223> n es a, c, g, t o u

<220>
<221> misc_RNA
60 <222> (11)..(11)
<223> El nucleótido definido como "n" corresponde a un nucleótido "cm" de acuerdo con la lista de nucleótidos modificados del cuadro 2 del apéndice 2 de la Norma ST.25

65 <220>
<221> misc_RNA

ES 2 368 300 A1

<222> (13)..(13)

<223> El nucleótido definido como “n” corresponde a un nucleótido “cm” de acuerdo con la lista de nucleótidos modificados del cuadro 2 del apéndice 2 de la Norma ST.25

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

10 <223> n es a, c, g, t o u

<220>

<221> misc_RNA

15 <222> (16)..(16)

<223> El nucleótido definido como “n” corresponde a un nucleótido “cm” de acuerdo con la lista de nucleótidos modificados del cuadro 2 del apéndice 2 de la Norma ST.25

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

25 <223> n es a, c, g, t o u

<220>

<221> misc_RNA

30 <222> (18)..(18)

<223> El nucleótido definido como “n” corresponde a un nucleótido “cm” de acuerdo con la lista de nucleótidos modificados del cuadro 2 del apéndice 2 de la Norma ST.25

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n es a, c, g, t o u

40

<400> 5

gugcnuaugn nunagncncct t

45

50

55

60

65

21



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030611

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YOSHIHITO UENO et al. "Synthesis and silencing properties of siRNAs possessing lipophilic groups at their 3'-termini" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol 16, 2008, páginas 7698-7704. Página 7698, columna izquierda; página 7699, columna derecha, apartado 2 y esquema 1; y tabla 1.	1-35
A	CHRISTIAN WOLFRUM et al. "Mechanisms and optimization of <i>in vivo</i> delivery of lipophilic siRNAs" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol 25, no. 10, 2007, páginas 1149-1157. Resumen; página 1149, columna izquierda, segundo párrafo; página 1150, columna izquierda; y figura 1.	1-35
A	US 20070207966 A1 (KIM et al.) 06.09.2007, párrafos [0009],[0010].	1-35
A	JÜRGEN SOUTSCHEK et al. "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs" NATURE, vol 432, 2004, páginas 173-178. Resumen; página 177, columna izquierda, segundo y tercer párrafos.	1-35

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.10.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K48/00 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

C12N15/87 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, XPESP, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.10.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-35	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-35	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	YOSHIHITO UENO et al. "Synthesis and silencing properties of siRNAs possessing lipophilic groups at their 3'-termini" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol 16, 2008, páginas 7698-7704. Página 7698, columna izquierda; página 7699, columna derecha, apartado 2 y esquema 1; y tabla 1.	
D02	CHRISTIAN WOLFRUM et al. "Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol 25, no. 10, 2007, páginas 1149-1157. Resumen; página 1149, columna izquierda, segundo párrafo; página 1150, columna izquierda; y figura 1.	
D03	US 20070207966 A1 (KIM et al.)	06.09.2007
D04	JÜRGEN SOUTSCHEK et al. "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs" NATURE, vol 432, 2004, páginas 173-178. Resumen; página 177, columna izquierda, segundo y tercer párrafos.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente tal y como ha sido redactada hace referencia a un compuesto de pARNi y un lípido unidos covalentemente entre sí por enlace tipo fosfato (tipo éter) (reivindicaciones 1, 4-9, 14). Se reivindica también el tipo de cadena lipídica que se une (reivindicaciones 2,3), así como que la derivatización se encuentra introducida en la posición 3' del dúplex de pARNi (reivindicación 10). El puente de unión presente entre el lípido y la molécula de pARNi proviene, de entre otros compuestos, de glicerol (reivindicación 11); se reivindica también la secuencia de pARNi (reivindicaciones 12, 13 y 17). Dicho pARNi inhibe o silencia total o parcialmente la expresión de al menos un gen (reivindicaciones 15, 16). La cadena de pARNi que se une al compuesto lipídico puede ser una cadena sencilla (reivindicación 18). Y por último se reivindica el procedimiento de síntesis de los compuestos pARNi unidos covalentemente a lípidos (reivindicaciones 19-28), la composición farmacéutica que contiene dichos compuestos (reivindicaciones 29-32) y el uso de ellos (reivindicaciones 33-35).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA. LP ARTS 6 Y 8.

El documento D01 hace referencia a siRNA (short interfering RNAs) conjugados con grupos lipofílicos en el extremo 3', el grupo lipofílico que se encuentra unido al siRNA es, entre otros, el colesterol (véase página 7698, columna izquierda). Estos siRNAs modificados pueden atravesar más fácilmente las membranas plasmáticas de las células in vivo y ser utilizados para el silenciamiento específico de genes (véase página 7699, columna derecha). Además, el puente presente en los siRNA modificados entre el siRNA y el lípido proviene de una molécula de glicerol (véase página 7699, apartado 2). En la presente solicitud de patente se especifica que los grupos lipídicos se encuentran unidos mediante enlaces tipo éter y en dicho documento D01 el enlace utilizado es tipo carbamato (véase página 7699, esquema 1), y por otro lado, las secuencias específicas de siRNA son distintas a las de dicho documento D01 (véase página 7700, tabla 1).

El documento D02 se refiere a que conjugados de siRNAs con lípidos pueden silenciar la expresión de ciertos genes in vivo. Se sintetizaron siRNAs conjugados con ácidos biliares, ácidos grasos de cadena larga, colesterol, entre otros y de cadena corta. La absorción de estos siRNAs conjugados depende de las interacciones con partículas de lipoproteínas (véase resumen). Se estudió el efecto que tenían estos siRNAs en la expresión de la apolipoproteína B (apo B) y se observó que conjugados de ácidos grasos de cadena corta, tales como lauroil (C12), miristoil (C14) y palmitoil (C16) no reducían los niveles de transcripción de apo B (véase página 1150, columna izquierda), mientras que los de cadena larga, entre ellos el colesterol si lo hacían. Por otro lado, las uniones de estos compuestos lipídicos a los siRNAs son de tipo covalente (véase página 1149, columna izquierda, segundo párrafo), pero no son de tipo éter, ni la secuencia de siRNA es la misma que la de la presente solicitud de patente (véase página 1150, figura 1).

El documento D03 describe un método para la introducción de pequeños RNAs de interferencia en la célula. El método comprende poner en contacto la célula con un complejo formado por una mezcla de un pequeño RNA de interferencia y un conjugado que comprende un resto de colesterol unido covalentemente a una oligoarginina. El RNA de interferencia está dirigido al factor de crecimiento endotelial y vascular (véase párrafos [0009] y [0010]).

El documento D04 trata sobre conjugados de siRNAs y colesterol para el silenciamiento de genes implicados en ciertas enfermedades (véase resumen). En dicho estudio se ha mostrado como los compuestos conjugados de siRNAs con colesterol y unidos a apoB presentan actividad biológica, mientras que los compuestos conjugados de apoB-siRNAs no presentan dicha actividad, lo que demuestra la importancia de la molécula de colesterol en estos conjugados de siRNAs (véase página 177, columna izquierda, segundo párrafo). Los siRNAs utilizados en dicho documento son distintos a los de la presente invención (véase página 177, columna izquierda, párrafo segundo).

En ninguno de los documentos citados anteriormente aparece un compuesto de pARNi y un lípido unidos covalentemente de fórmula (I). Ni tampoco existe ninguna evidencia en dichos documentos, solos o en combinación, que dirija al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-35. Por lo que se considera que las reivindicaciones 1-35 de la presente solicitud de patente cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 Y 8 de la LP.