

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 781**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/00** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 09759412 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2297175**

54 Título: **Análogos de CAP de ARNm**

30 Prioridad:

**06.06.2008 PL 38538808**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.10.2013**

73 Titular/es:

**UNIWERSYTET WARSZAWSKI (50.0%)  
Ul. Krakowskie Przedmiescie 26/28  
00-927 Warszawa, PL y  
BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA  
STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND  
MECHANICAL COLLEGE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOWALSKA, JOANNA;  
JEMIELITY, JACEK;  
DARZYNKIEWICZ, EDWARD;  
RHOADS, ROBERT E.;  
LUKASZEWICZ, MACIEJ y  
ZUBEREK, JOANNA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 425 781 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

El desarrollo de esta invención fue subvencionado parcialmente por el gobierno de los Estados Unidos de América bajo el subsidio número R01GM20818 otorgado por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales de los Institutos Nacionales de la Salud (*National Institute of General Medical Sciences of the National Institutes of Health*). El gobierno de los Estados Unidos de América posee determinados derechos sobre esta invención.

El desarrollo de esta invención fue subvencionado parcialmente por el gobierno de Polonia bajo el subsidio número PBZ-MNiSW-07/1/2007 otorgado por el Proyecto Nacional de Apoyo a las Ciencias 2008-2010.

**Campo técnico**

Esta invención se refiere a los nuevos análogos de caperuza de dinucleótidos y sus usos, las moléculas de ARN que contienen estos análogos, el uso de estos análogos en la síntesis de ARN, el uso de estos análogos en la síntesis de péptidos y proteínas, el uso de estos análogos para inhibir la traducción y otros usos.

**Antecedentes**

El ácido ribonucleico (ARN) es un polímero lineal de cadena sencilla de nucleótidos. Cada unidad de nucleótido contiene una base nitrogenada, un azúcar de ribosa y un grupo fosfato. Existen diferentes tipos de moléculas de ARN. Las moléculas de ARN mensajero (ARNm) son aquellas cuya secuencia de nucleótidos determina la composición aminoácida de las proteínas. En eucariotes, los extremos 5' de la mayoría de los ARNm están bloqueados, o "encaperuzados" con un nucleótido modificado de guanina. La caperuza contiene un enlace 5'-5' de trifosfato entre dos nucleósidos y un grupo 7-metilo en un anillo de guanina distal a la cadena polimérica de ARN. Otras formas del ARN también llevan caperuza, por ejemplo, los pequeños ARN nucleares (ARNpn). El uso de caperuzas en el ARN regula las actividades moleculares intracelulares, incluidas la estabilidad del ARN y la eficiencia de la traducción.

La capacidad de sintetizar *in vitro* moléculas de ARN con caperuza es útil porque permite la preparación de moléculas de ARN que funcionarán correctamente en una variedad de aplicaciones biológicas. Estas aplicaciones incluyen tanto aplicaciones en la investigación como en la producción comercial de polipéptidos, por ejemplo la producción de polipéptidos en un sistema acelular de traducción que contiene un aminoácido "no natural" en un lugar específico, o la producción de polipéptidos en células cultivadas que requieren la modificación post-traduccional de la actividad o estabilidad. Debido a que las moléculas con caperuza de ARN son más estables y se enlazan más fácilmente a la maquinaria celular traduccional, la traducción de los ARN con caperuza continúa durante un período considerablemente más largo que en el caso de los ARN sin caperuza, lo que tiene como resultado una producción mayor de proteínas.

El método usado con mayor frecuencia para la preparación *in vitro* de ARN con caperuza es la transcripción de una plantilla de ADN con una polimerasa de ARN bacteriano o bacteriófago en presencia de los cuatro trifosfatos de ribonucleósido y un dinucleótido bloqueado como m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (también conocido como m<sup>7</sup>GpppG). La polimerasa de ARN inicia la transcripción con un ataque nucleofílico por el 3'-OH del grupo Guo de m<sup>7</sup>GpppG sobre el α-fosfato del siguiente trifosfato de nucleósido en la plantilla, produciendo el producto intermedio m<sup>7</sup>GpppGpN. La formación del producto competidor iniciado por GTP pppGpN se suprime al definir el cociente molar entre m<sup>7</sup>GpppG y GTP como de 5 a 10 en la mezcla de reacción de transcripción. Los ARNm con caperuza en 5' producidos con m<sup>7</sup>GpppG pueden adoptar una de las siguientes dos formas: una que contiene el análogo con caperuza incorporado en la orientación correcta hacia el frente [m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')GpNp...] y otra que contiene el análogo en la posición inversa [G(5')ppp(5')m<sup>7</sup>GpNp...]. La maquinaria traduccional de la célula no reconoce a éste último como un ARNm con caperuza y disminuye la eficiencia de traducción de las preparaciones sintéticas de ARNm. Este problema puede evitarse mediante el uso de análogos de caperuza que poseen modificaciones O-metilo o desoxi en la posición C2' ó C3' de m<sup>7</sup>GuO. Véase J. Stepinski *et al.*, "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogues 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG y 7-methyl(3'-deoxy)GpppG", *RNA*, vol. 7, págs. 1.486-1.495 (2001); y J. Jemielity *et al.*, "Novel "anti-reverse" cap analogues with superior translational properties", *RNA*, vol. 9, págs. 1108-1122 (2003). Estos análogos de caperuza se incorporan a los transcritos de ARN exclusivamente en la orientación hacia el frente y por lo tanto se conocen como "análogos de caperuza anti-inversos" (ARCA, por sus siglas en inglés). En un lisado de reticulocito de conejo (LRC), los ARNm con caperuza de ARCA poseen eficiencias traduccionales que son dos veces más altas que las de los transcritos con caperuza de m<sup>7</sup>GpppG (Stepinski *et al.*, 2001). En células mamíferas cultivadas, los ARNm con caperuza de ARCA se traducen entre 2 y 2,5 veces más eficientemente que los que llevan caperuza de m<sup>7</sup>GpppG. Véase E. Grudzien *et al.*, "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs", *J. Biol. Chem.*, vol. 281, págs. 1.857-1.867 (2006).

La cantidad de proteína producida a partir de ARNm sintéticos introducidos a células mamíferas cultivadas está limitada por la degradación natural del ARNm. Una ruta *in vivo* para la degradación del ARNm se inicia con la

eliminación del bloqueo del ARNm. Esta eliminación está catalizada por una pirofosfatasa heterodimérica, que contiene una subunidad reguladora (Dcp1) y una subunidad catalítica (Dcp2). La subunidad catalítica se escinde entre los grupos fosfato  $\alpha$  y  $\beta$  del puente trifosfato.

5 E. Grudzien *et al.* (2006) describieron un análogo de caperuza,  $m_2^{7,3'-O}Gpp_{CH_2}pG$ , en donde el átomo de oxígeno fue reemplazado con un grupo metileno entre los grupos  $\alpha$  y  $\beta$  de fosfato. Los ARNm con caperuza de este análogo fueron resistentes a la hidrólisis con Dcp2 recombinante humano *in vitro*. Cuando se introducen a células cultivadas, los ARNm con caperuza del análogo  $m_2^{7,3'-O}Gpp_{CH_2}pG$  fueron más estables que los que llevan caperuza de  $m_2^{7,3'-O}GpppG$ . Sin embargo, el ARNm con caperuza de  $m_2^{7,3'-O}Gpp_{CH_2}pG$  posee una eficiencia traduccional general más baja, posiblemente debido a que  $m_2^{7,3'-O}Gpp_{CH_2}pG$  tiene una afinidad de enlace más baja por eIF4E que la del  $m_2^{7,3'-O}GpppG$ . El factor de iniciación de la traducción eucariótica eIF4E participa en llevar el ARNm con caperuza al ribosoma para la traducción.

15 J. Kowalska *et al.*, "Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS", *RNA*, vol. 14, págs. 1.119-1.131 (2008), describió las síntesis de tres ARCA en donde uno de los tres átomos de O no enlazantes en la cadena de trifosfato se reemplazó con un átomo de S. Cada uno de estos análogos de fosforotioato (también conocidos como S-ARCA) se sintetizó como una mezcla de diaestereoisómeros que pueden separarse cromatográficamente para producir diaestereoisómeros puros. La afinidad de enlace de los análogos de caperuza de fosforotioato al eIF4E fue igual o, en algunos casos, superior a la del  $m_2^{7,3'-O}GpppG$ .

25 E. Grudzien *et al.*, "Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells", *RNA*, vol. 13, págs. 1.745-1.755 (2007), demostraron que los ARNm bloqueados con S-ARCA modificados en el  $\beta$ -fosfato fueron resistentes a la hidrólisis con Dcp2 recombinante humano *in vitro*. Asimismo, el ARNm bloqueado con un diaestereoisómero  $\beta$  S-ARCA tiene una vida media más larga cuando se introduce a células mamíferas que la del ARNm correspondiente bloqueado con ARCA, y además presenta una mayor eficiencia traduccional en las células. Probablemente, la primera de estas propiedades se debe a la resistencia del  $\beta$  S-ARCA a la hidrólisis por Dcp2, y probablemente la segunda propiedad se debe a la mayor afinidad de  $\beta$ -S-ARCA por eIF4E.

30 Otro uso de los análogos sintéticos de caperuza de ARNm es inhibir la traducción dependiente de la caperuza mediante la competencia con el ARNm con caperuza por enlace a eIF4E. Véase A. Cai *et al.*, "Quantitative assessment of mRNA cap analogues as inhibitors of *in vitro* translation", *Biochemistry*, vol. 38, págs. 8.538-8.547 (1999); y E. Grudzien *et al.*, "Novel cap analogs for *in vitro* synthesis of mRNAs with high translational efficiency", *RNA*, vol. 10, págs. 1.479-1.487 (2004).

35 La capacidad de los análogos de caperuza de inhibir la traducción posee una importancia terapéutica potencial. Muchos tipos de células de cáncer sobreexpresan eIF4E, lo que puede ocasionar una expresión mayor de las proteínas que promueven la oncogénesis y metástasis. Véase A. De Benedetti *et al.*, "eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases", *Oncogene*, vol. 23, págs. 3.189-3.199 (2004). La reducción de la expresión de eIF4E con ARNs, oligonucleótidos anti-sentido, o un represor específico de eIF4E podría inhibir el crecimiento de un tumor y la oncogénesis. Véase J.R. Graff *et al.*, "Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity", *J. Clin. Investigation*, vol. 117, págs. 2.638-2.648 (2007); y T. Herbert, "Rapid induction of apoptosis by peptides that bind initiation factor eIF4E", *Curr. Biol.*, vol. 10, págs. 793-796 (2000). Además, la actividad traduccional de eIF4E puede suprimirse saturando las células con análogos de caperuza competidores traduccionalmente deficientes.

50 Algunos análogos de caperuza sintéticos son inhibidores específicos de la actividad de eIF4E y por lo tanto, son potencialmente útiles como agentes para el tratamiento de oncogénesis y metástasis, inmunosupresión en el trasplante de órganos y otras condiciones médicas. Sin embargo, estos usos potenciales de los análogos de caperuza nunca han sido previamente demostrados *in vivo*, en parte debido a la inestabilidad de los análogos de caperuza en condiciones intracelulares.

55 J. Kowalska *et al.* (2008) demostraron que los  $\gamma$ -S-ARCA son fuertes inhibidores de la traducción en un sistema celular, posiblemente debido a su alta afinidad de enlace con eIF4E. Los análogos  $\gamma$ -modificados son resistentes a la hidrólisis por la enzima humana DcpS, que es una pirofosfatasa secuestrante responsable de la degradación de este tipo de compuesto.

60 Otras modificaciones pueden ayudar a proteger el ARNm con caperuza contra la degradación enzimática. Un ejemplo es una modificación con boranofosfato, en donde uno de los átomos no enlazantes de O se reemplaza con un grupo borano ( $BH_3$ ) (ocasionalmente llamados análogos de  $BH_3$ ). Otro ejemplo es una modificación con fosforoselenoato, en donde uno de los átomos no enlazantes de O se reemplaza con un átomo de selenio (ocasionalmente llamados análogos de Se). Los grupos fosforotioato, boranofosfato y fosforoselenoato reemplazan los átomos de oxígeno y comparten algunas propiedades químicas y bioquímicas. Sin embargo, también existen

diferencias entre estos grupos. Por ejemplo, las longitudes de la cadena P-X difieren (donde X denota S, Se o BH<sub>3</sub>), los radios de Van der Waals de los grupos X difieren, y la afinidad de dichos grupos X por varios cationes divalentes y otros cationes metálicos difiere. Estas propiedades químicas diversas alteran las actividades biológicas de los análogos de caperuza con estos grupos, incluidas sus interacciones con las proteínas de enlace de caperuza y su susceptibilidad a la degradación enzimática.

Los mononucleótidos de boranofosfato y los dinucleótidos de polifosfato boranofosfato fueron revisados por P. Li *et al.*, "Nucleoside and oligonucleoside boranophosphates: chemistry and properties", *Chem. Rev.*, vol. 107, págs. 4.746-4.796 (2007).

Los análogos del dinucleósido de polifosfato boranofosfato se describen en la solicitud de patente publicada US2006/0287271, al igual que su uso contra enfermedades moduladas por los receptores P2Y, por ejemplo la diabetes tipo 2 y el cáncer.

Los análogos de nucleótidos de boranofosfato presentan similitudes con los análogos de fosforotioato debido a los ángulos de enlace, valores de  $pK_b$ , y P-diaestereoisomería similares. Sin embargo, en algunos casos son hasta 10 veces más resistentes a la hidrólisis enzimática que sus fosforotioatos homólogos. También son más lipofílicos que los fosforotioatos, lo que podría ayudarles a penetrar las membranas celulares y alcanzar la maquinaria traduccional intracelular. Los análogos de boranofosfato también pueden usarse en la terapia de captura neutrónica de boro (TCNB). Véase B.R. Shaw *et al.*, "Reading, Writing and Modulating Genetic Information with Boranophosphate Mimics of Nucleotides, DNA and RNA", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1201, págs. 23-29 (2003); y J. Summers *et al.*, "Boranophosphates as Mimics of Natural Phosphodiesterases in DNA", *Current Medicinal Chemistry*, vol. 8, págs. 1.147-1.155 (2001).

K. Misiura *et al.*, "Synthesis of nucleoside  $\alpha$ -thiotriphosphates via an oxathiaphospholane approach", *Org. Lett.*, vol. 7, págs. 2.217-2.220 (2005); P. Li *et al.*, "Synthesis of  $\alpha$ -P-modified nucleoside diphosphates with ethylenediamine", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, págs. 16.782-16.783 (2005); N. Carrasco *et al.*, "Enzymatic synthesis of phosphoroselenoate DNA using thymidine 5'-( $\alpha$ -P-seleno)triphosphate and DNA polymerase for x-ray crystallography via MAD", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, págs. 448-449 (2004) y N. Carrasco *et al.*, "Efficient enzymatic synthesis of phosphoroselenoate RNA by using adenosine 5'-( $\alpha$ -P-seleno)triphosphate", *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 45, págs. 94-97 (2006), describieron los análogos fosforoselenoato de di- y tri-fosfatos de nucleósidos modificados en la posición  $\alpha$ . Sin embargo, hasta donde los inventores saben, no existen informes previos de análogos de polifosfato de nucleósido modificados en cualquier posición aparte de la posición  $\alpha$ , ni de polifosfatos de dinucleósidos modificados en cualquier posición.

Los análogos de nucleótidos de fosforoselenoato son parecidos a los fosforotioatos y boranofosfatos debido a sus ángulos de enlace, valores de  $pK_a$ , p-diaestereoisomería y resistencia a la degradación enzimática similares. Los fosforoselenoatos pueden ser muy útiles en la cristalografía de los ácidos nucleicos ya que puede usarse Se en la técnica de dispersión anómala múltiple (MAD). Véase J. Wilds *et al.*, "Selenium-assisted nucleic acid crystallography: use of phosphoroselenoatos for MAD phasing of a DNA structure", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, págs. 14.910-14.916 (2002); N. Carrasco *et al.*, (2004); N. Carrasco *et al.*, (2006); y P. S. Pallan *et al.*, "Selenium modification of nucleic acids: preparation of phosphoroselenoate derivatives for crystallographic phasing of nucleic acid structures", *Nat. Protoc.*, vol. 2, págs. 640-646 (2007).

Véase también nuestro trabajo sobre análogos de caperuza de ARNm anti-inverso descritos en la Patente estadounidense nº 7.074.596, así como la solicitud de patente internacional publicada WO 2008/157688.

## Resumen de la invención

Hemos descubierto una nueva clase de análogos de caperuza de dinucleótidos. Los análogos nuevos de caperuza de dinucleótidos se modificaron en diversas posiciones de fosfato con un grupo boranofosfato o un grupo fosforoselenoato. Los análogos nuevos poseen una gran utilidad como reactivos en la preparación de ARNm con caperuza. Han aumentado la estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Pueden usarse como inhibidores de la traducción dependiente de la caperuza. Opcionalmente, el grupo boranofosfato o fosforoselenoato tiene un grupo 2'-O ó 3'-O-alquilo, preferentemente un grupo metilo, produciéndose análogos llamados BH<sub>3</sub>-ARCAs o Se-ARCAs. Los ARCAs pueden modificarse con grupos  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -boranofosfato o fosforoselenoato. La selección del tipo y ubicación de la modificación modulan la actividad de proteínas que reconocen la caperuza durante la síntesis, el procesamiento, la exportación nucleo-citoplásmica y la degradación del ARNm.

En la Tabla 1 se enumeran varios análogos de BH<sub>3</sub> y de Se que han sido o serán sintetizados y caracterizados mediante métodos químicos, biofísicos, bioquímicos y biológico moleculares. Los compuestos que son especialmente favorables en las caperuzas del ARNm incluyen  $\beta$ -BH<sub>3</sub>-ARCAs y  $\beta$ -Se-ARCAs. Los compuestos que

son especialmente favorables como inhibidores de la traducción incluyen los análogos  $\beta$ - y  $\gamma$ -BH<sub>3</sub> y los análogos  $\gamma$ -Se.

5

Tabla 1

Análogos de BH<sub>3</sub> y Se

Nombre del compuesto <sup>a</sup>	X	Y	Z	R	N <sup>b</sup>
m <sup>7</sup> Gppp <sub>BH<sub>3</sub></sub> G (D1)	BH <sub>3</sub>	O	O	H	Gua
m <sup>7</sup> Gppp <sub>BH<sub>3</sub></sub> G (D2)	BH <sub>3</sub>	O	O	H	Gua
m <sup>7</sup> Gpp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pG (D1)	O	BH <sub>3</sub>	O	H	Gua
m <sup>7</sup> Gpp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pG (D2)	O	BH <sub>3</sub>	O	H	Gua
m <sup>7</sup> Gpp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pm <sup>7</sup> G	O	BH <sub>3</sub>	O	H	m <sup>7</sup> Gua
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ppG (D1)†	O	O	BH <sub>3</sub>	H	Gua
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ppG (D2)†	O	O	BH <sub>3</sub>	H	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gppp <sub>BH<sub>3</sub></sub> G (D1)	BH <sub>3</sub>	O	O	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gppp <sub>BH<sub>3</sub></sub> G (D2)	BH <sub>3</sub>	O	O	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pG (D1)	O	BH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pG (D2)	O	BH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ppG (D1)†	O	O	BH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ppG (D2)†	O	O	BH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sup>7</sup> Gppp <sub>Se</sub> G (D1)†	Se	O	O	H	Gua
m <sup>7</sup> Gppp <sub>Se</sub> G (D2)†	Se	O	O	H	Gua
m <sup>7</sup> Gpp <sub>Se</sub> pG (D1)†	O	Se	O	H	Gua
m <sup>7</sup> Gpp <sub>Se</sub> pG (D2)†	O	Se	O	H	Gua
m <sup>7</sup> Gpp <sub>Se</sub> pm <sup>7</sup> G†	O	Se	O	H	m <sup>7</sup> Gua
m <sup>7</sup> Gp <sub>Se</sub> ppG (D1)	O	O	Se	H	Gua
m <sup>7</sup> Gp <sub>Se</sub> ppG (D2)	O	O	Se	H	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gppp <sub>Se</sub> G (D1)†	Se	O	O	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gppp <sub>Se</sub> G (D2)†	Se	O	O	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>Se</sub> pG (D1)	O	Se	O	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>Se</sub> pG (D2)	O	Se	O	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gp <sub>Se</sub> ppG (D1)†	O	O	Se	CH <sub>3</sub>	Gua
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gp <sub>Se</sub> ppG (D2)†	O	O	Se	CH <sub>3</sub>	Gua

<sup>a</sup>D1 y D2 se refieren a diaestereoisómeros.

<sup>b</sup>Gua es guanina (Fórmula 2a) y m<sup>7</sup>Gua es 7-metilguanina (Fórmula 2b, en donde X es CH<sub>3</sub>).

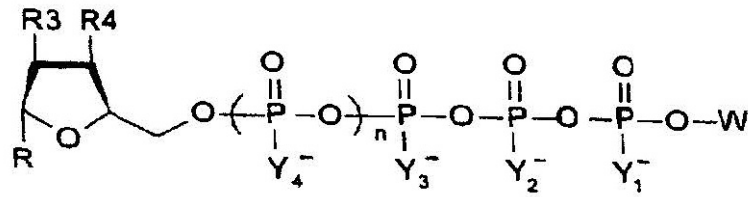
†Compuestos que se espera posean propiedades favorables, pero que todavía no habían sido sintetizados a la fecha de presentación internacional de la solicitud PCT actual.

10

En los siguientes párrafos se describen los diversos aspectos y realizaciones de la invención.

15

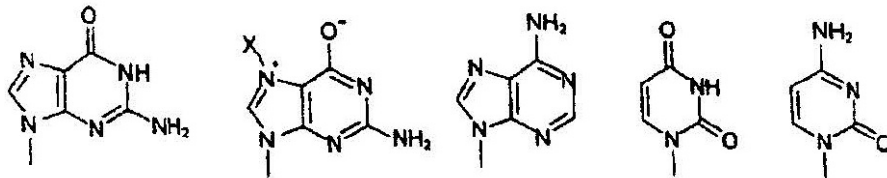
Uno o más de los siguientes compuestos, o un estereoisómero de uno o más de los siguientes compuestos, o mezclas de estereoisómeros de uno o más de los siguientes compuestos, o una sal o sales de cualquiera de ellos:



5 donde  $Y_1, Y_2, Y_3$  e  $Y_4$  se seleccionan del grupo formado por O,  $BH_3$  y Se; los diversos grupos  $Y_1$  pueden ser iguales o diferentes, mientras que  $i$  es 1, 2, 3 ó 4; y al menos un  $Y_1$  es  $BH_3$  o Se.

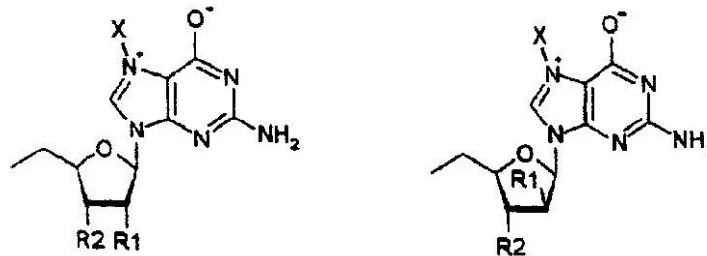
$n$  es 0 ó 1;

10 R se selecciona del grupo formado por:



15  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan del grupo formado por H, OH,  $OCH_3$  y  $OCH_2CH_3$ ; y  $R_3$  y  $R_4$  pueden ser iguales o diferentes;

20 W se selecciona del grupo formado por:

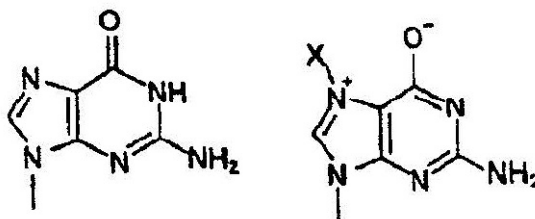


25  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan del grupo formado por H, OH,  $OCH_3$ , u  $OCH_2CH_3$ ; y  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser iguales o diferentes; y

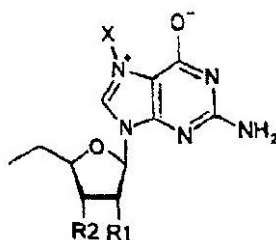
30 X se selecciona del grupo formado por metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo, bencilo sustituido, metilen-naftilo, y metilen-naftilo sustituido.

Un compuesto como el descrito, donde  $Y_1, Y_2, Y_3$  e  $Y_4$  se seleccionan del grupo formado por O, Se y  $BH_3$ ; los diversos grupos  $Y_1$  pueden ser iguales o diferentes, mientras que  $i$  es 1, 2, 3, ó 4; y al menos un  $Y_1$  es  $BH_3$  o Se.

35 Un compuesto como el descrito, donde R se selecciona del grupo formado por



5 Un compuesto como el descrito, donde W es



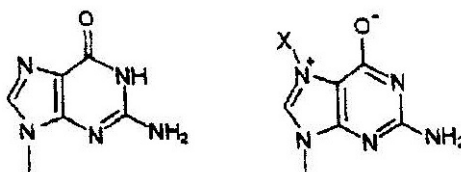
R2 es OH; R1 es H u OCH<sub>3</sub>; X es metilo; y n = 0; y sólo uno de Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> e Y<sub>3</sub> es BH<sub>3</sub> o Se.

10 Un compuesto como el descrito, donde, si n = 0, entonces Y<sub>2</sub> o Y<sub>3</sub> es BH<sub>3</sub> o Se, y donde, si n = 1, entonces Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> o Y<sub>4</sub> es BH<sub>3</sub> o Se.

Una molécula de ARN cuyo extremo 5' incorpora un compuesto como el descrito.

15 Una molécula de ARN cuyo extremo 5' incorpora un compuesto como el descrito.

Una molécula de ARN como se describe, donde R se selecciona del grupo formado por:



20 Un método de síntesis, *in vitro* o *in vivo*, de una molécula de ARN como se describe, y dicho método comprende hacer reaccionar ATP, CTP, UTP y GTP, una composición como la antes mencionada, y una plantilla de polinucleótido en presencia de ARN poli me rasa, bajo condiciones adecuadas para la transcripción por la ARN polimerasa de la plantilla de polinucleótido para producir una copia del ARN; donde algunas de las copias de ARN incorporarán el compuesto para formar una molécula de ARN como se describe.

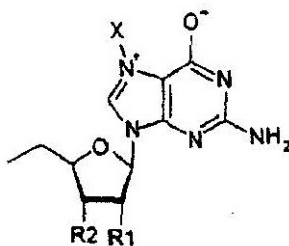
30 Un método de síntesis de una proteína o péptido *in vitro*, donde dicho método comprende la traducción de una molécula de ARN como se describe en un sistema acelular de síntesis de proteína, donde la molécula de ARN comprende un marco de lectura abierta, bajo condiciones adecuadas para la traducción del marco de lectura abierta de la molécula de ARN en la proteína o péptido codificado por el marco de lectura abierto.

35 Un método de síntesis de una proteína o péptido *in vivo* o en células cultivadas, donde dicho método comprende la traducción de una molécula de ARN como se describe en un sistema *in vivo* o en células cultivadas, donde la molécula de ARN comprende un marco de lectura abierta, bajo condiciones adecuadas para la traducción del marco de lectura abierta de la molécula de ARN en la proteína o péptido codificado por el marco de lectura abierto.

Un compuesto como el descrito para el uso en un método de inhibición total o parcial de la traducción del ARN en la proteína o péptido en un sistema que traduce el ARN en una proteína o péptido.

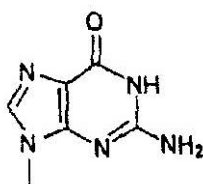
40 Un compuesto como el descrito para el uso en un método como el descrito, donde el sistema es un sistema nativo de traducción del ARN de un organismo vivo.

Una composición como la descrita, donde R1 es OCH<sub>3</sub>; R2 es OH; R3 es OH; R4 es OH; n es 0; Y<sub>1</sub> es O; Y<sub>2</sub> es Se; Y<sub>3</sub> es O; W es



y R es

5



### Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 muestra una síntesis de análogos de caperuza con un grupo boranofosfato en la posición α del puente del 5',5'-trifosfato.

La Figura 2 muestra una síntesis de análogos de caperuza con un grupo boranofosfato en la posición β del puente del 5',5'-trifosfato.

15

La Figura 3 muestra una síntesis de m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pm<sup>7</sup>G (método II).

La Figura 4 muestra una síntesis de m<sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG.

20

La Figura 5 muestra una síntesis de m<sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>Se</sub>pG.

La Figura 6 muestra una síntesis de m<sup>7</sup>Gp<sub>Se</sub>ppG.

25 La Figura 7 muestra las eficiencias traduccionales relativas *in vitro* del ARNm de luciferasa de luciérnaga bloqueado con ApppG (análogo de caperuza no funcional), m<sup>7</sup>GpppG, m<sup>7,3'-O</sup>GpppG, los análogos de caperuza de boranofosfato m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG (mezcla diaestereomérica 1:1) y m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pm<sup>7</sup>G.

La Figura 8 muestra la inhibición de la traducción *in vitro* del ARNm de luciferasa por los análogos de caperuza de boranofosfato.

30

La Figura 9 muestra la inhibición de la traducción *in vitro* del ARNm de luciferasa por los análogos de caperuza de boranofosfato incubados en lisado de reticulocito de conejo durante 60 min antes de iniciarse la traducción.

35 La Figura 10 muestra las eficiencias traduccionales *in vitro* del ARNm de luciferasa de luciérnaga bloqueado con ApppG, m<sup>7</sup>GpppG, m<sup>7,3'-O</sup>GpppG, y los análogos de caperuza de fosforoselenoato m<sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>Se</sub>pG (D1) y (D2).

La Figura 11 muestra la inhibición de la traducción *in vitro* del ARNm de luciferasa por los análogos de caperuza de fosforoselenoato.

40 La Figura 12 muestra la inhibición de la traducción *in vitro* del ARNm de luciferasa por los análogos de caperuza de fosforoselenoato incubados en lisado de reticulocito de conejo durante 60 min antes de iniciarse la traducción.

La Figura 13 muestra las eficiencias traduccionales relativas *in vitro* del ARNm de luciferasa de luciérnaga que posee una cola A<sub>31</sub> poli-A, con caperuza en 5' con varios análogos.

45

La Figura 14 muestra mediciones de la estabilidad de los ARNm de luciferasa bloqueados con varios análogos y con una cola poli(A) de 60 bases en células cultivadas HeLa después de la nucleoporación.



La Figura 15 muestra la eficiencia traduccional de los ARNm de luciferasa bloqueados con diversos análogos y con una cola poli(A) de 60-nt en células cultivadas HeLa después de la nucleoporación.

### Modos para la puesta en práctica de la invención

- 5 Síntesis y aislamiento de los análogos de caperuza
- La síntesis química de los análogos de caperuza de boranofosfato y fosforoselenoato fue una modificación de los esquemas sintéticos indicados para otros análogos. Véase M. Kadkura *et al.*, "Efficient synthesis of  $\gamma$ -methyl-capped-guanosine 5'-triphosphate as a 5'-terminal unique structure of U6 RNA via a new triphosphate bond formation involving activation of methyl phosphorimidazolide using  $ZnCl_2$  as a catalyst in DMF under anhydrous conditions", *Tetrahedron Lett.*, vol. 38. págs. 8.359-8.362 (1997); J. Stepinski *et al.* (2001); M. Kalek *et al.*, "Enzymatically stable 5' mRNA cap analogs", *Biorg. Med. Chem.*, vol. 14, págs. 3.223-3.230 (2006); y J. Kowalska *et al.* (2008).
- 15 Se convierte un mononucleótido a un derivado reactivo de imidazolida, que después se acopla a otro mononucleótido en DMF en presencia de un exceso de  $ZnCl_2$ . El  $ZnCl_2$  potencia significativamente la solubilidad de los reactivos en disolventes orgánicos, inhibe la hidrólisis de los derivados de imidazolida y acelera la velocidad de reacción. También podrán emplearse otros cloruros metálicos tales como  $MnCl_2$ ,  $CdCl_2$  o  $MgCl_2$  para mediar la formación del enlace pirofosfato, pero generalmente son menos eficientes que el  $ZnCl_2$ . Véase M. Kadokura *et al.*, "Efficient synthesis of  $\gamma$ -methyl-capped-guanosine 5'-triphosphate as a 5'-terminal unique structure of U6 RNA via a new triphosphate bond formation involving activation of methyl phosphorimidazolide using  $ZnCl_2$  as a catalyst in DMF under anhydrous conditions", *Tetrahedron Lett.*, vol. 38. págs. 8.359-8.362 (1997).
- 20 Un esquema sintético similar en términos generales se empleó para sintetizar análogos de caperuza que contenían enlaces fosfato-boranofosfato y fosfato-fosforoselenoato. Sin embargo, para los análogos de boranofosfato, los mejores resultados se obtuvieron usando  $MgCl_2$  en lugar de  $ZnCl_2$  como el mediador de acoplamiento. En presencia de  $ZnCl_2$  también ocurrieron reacciones de acoplamiento, pero estuvieron acompañadas de reacciones secundarias significativas relacionadas con la ruptura del enlace P-BH<sub>3</sub> bajo las condiciones ácidas producidas por el  $ZnCl_2$ .
- 25 En la Figura 1 se muestra la síntesis de análogos modificados en la posición  $\alpha$ . Inicialmente desarrollamos un método de síntesis del producto intermedio guanosina 5'-boranofosfato. Guanosina 5'-(H-fosfonato) fue sililado con *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA). El producto intermedio resultante, bis(trimetilsilil)fosfito, fue boronado por tratamiento con un complejo BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>, sin aislarse. La desililación y purificación posteriores por cromatografía de intercambio iónico produjeron el compuesto deseado, guanosina-5' -boranofosfato, con un rendimiento de ~30%. Para obtener el análogo de caperuza m<sup>7</sup>Gppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G, o su ARCA equivalente, m<sup>7,2'-O</sup>Gppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G, se acopló guanosina 5'-boranofosfato con el derivado de imidazolida de m<sup>7</sup>GDP o de m<sup>7,2'-O</sup>GDP, respectivamente, en una mezcla de DMF/agua al 9:1 en presencia de un exceso de  $MgCl_2$ . En los dos casos, el resultado fue una mezcla de dos P-diaestereoisómeros que después se separaron por HPIC en fase inversa (FI). los diaestereoisómeros se llamaron D1 y D2, de acuerdo con su orden de elución en la columna de HPLC FI.
- 30 En la Figura 2 se muestra la síntesis de análogos modificados en la posición  $\beta$ . la sal boranofosfato trietilamonio se obtuvo mediante una modificación del procedimiento de V. Nahum *et al.*, "Boranophosphate salts as an excellent mimic of phosphate salts: preparation, characterization, and properties", *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 20, págs. 4.124-4.131 (2004). En el procedimiento original, el tris(trimetilsilil)fosfito se boronó con el complejo BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>. La destilación posterior en metanol en presencia de una base apropiada (por ejemplo, amoniaco, tributilamina, etc.), seguida de la evaporación a sequedad, produjo el boranofosfato como la sal correspondiente (amonio, tributilamonio, etc.). Sin embargo, el producto estaba contaminado con la sal del ácido fosfónico (hasta un 20%). Probablemente esta contaminación se debió a la hidrólisis parcial de tris(trimetilsilil)fosfito a bis(trimetilsilil)fosfito bajo condiciones de reacción que no eran perfectamente anhidras (el compuesto bis no paso por una boronación posterior). Solucionamos este problema añadiendo un exceso del reactivo de sililación (BSA) a la mezcla de reacción, lo que inhibió la formación de bis(trimetilsilil)fosfito. La sal boranofosfato trietilamonio obtenida de esta manera se acopló con un exceso del derivado guanosina monofosfato imidazolida para producir un diguanosina 5',5''-(2-boranotrifosfato) simétrico (Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG, Figura 2).
- 35 Posteriormente, este compuesto se trató con yoduro de metilo en DMSO para introducir un grupo metilo en la posición N7 de la guanosina. La reacción produjo una mezcla de análogos de caperuza monometilados y dimetilados (m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG y m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pm<sup>7</sup>G). La relación entre estos productos puede controlarse ajustando las condiciones de reacción. En presencia de un exceso de ~4X del yoduro de metilo, se formó m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG como el producto principal (rendimiento de ~70%). Con un exceso de ~8X-10X de yoduro de metilo, el producto predominante fue m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pm<sup>7</sup>G (~50%). Sin embargo, una ruta preferida para obtener este último producto fue el acoplamiento de boranofosfato con un derivado de 7-metilguanosina imidazolida, lo que nos permitió aislar el producto con un rendimiento del 34%, pero en una síntesis de un solo paso. Véase la Figura 3.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Inicialmente, al tratar de obtener el producto intermedio 7,2'-O-dimetilguanosina 5'-(2-boranodifosfato) ( $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{BH}_3$ ), útil en la síntesis de  $\beta\text{-BH}_3\text{-ARCA}$ s ( $m_2^{7,2'-O} \text{Gpp}_{\text{BH}_3\text{pG}}$ ), se tuvo poco éxito. Acoplamos  $m_2^{7,2'-O} \text{GMP-Im}$  y un exceso de sal de boranofosfato trietilamonio en presencia de  $\text{MgCl}_2$ . Aunque al hacerse un análisis por MS ESI(-) de los productos de acoplamiento se demostró que se había formado el producto deseado, no fue posible aislarlo en cantidades suficientes. El compuesto puede sufrir una hidrólisis relativamente rápida en soluciones acuosas, haciendo que la separación por cromatografía de intercambio iónico sea prácticamente imposible. Por esta razón, desarrollamos una síntesis alternativa de  $m_2^{7,2'-O} \text{Gpp}_{\text{BH}_3\text{pG}}$ , mediante la reacción de  $m_2^{7,2'-O} \text{GMP-Im}$  con boranofosfato en exceso en presencia de  $\text{MgCl}_2$  para producir  $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{BH}_3$ , que después, sin aislarse, se acopló con  $\text{GMP-Im}$  en exceso. Véase la Figura 4.

En la Figura 5 se muestra la síntesis de  $m_2^{7,2'-O} \text{Gpp}_{\text{SeP}}\text{G}$ . Se preparó el selenofosfato ( $\text{PSeO}_3^{-3}$ ) mediante una modificación del método descrito en R. Glass *et al.*, "Selenophosphate", *Meth. Enzymol.*, vol. 252, págs. 309-315 (1995). Se trató trimetilsilil fosfito con selenio en piridina para producir trimetilsilil selenofosfato, que entonces se desililizó con metanol en presencia de trietilamina para producir la sal de seleno fosfatotrietilamonio. Este compuesto se acopló con el derivado imidazolida de 7,2'-O-dimetilguanosina 5'-monofosfato ( $m_2^{7,2'-O} \text{GMP-Im}$ ) para producir 7,2'-O-dimetilguanosina 5'-O-(2-selenodifosfato) ( $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{Se}$ ). Se empleó  $\text{ZnCl}_2$ , anhidro para mediar la reacción de acoplamiento; el  $\text{ZnCl}_2$  aumentó dramáticamente la solubilidad de los reactivos en DMF, y también aceleró la velocidad de reacción. La reacción fue muy rápida; fundamentalmente después de 15 min, usando HPLC FI, se observó una conversión del 100% de  $m_2^{7,2'-O} \text{GMP-Im}$  a  $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{Se}$ . El  $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{Se}$  es inestable en soluciones acuosas ácidas (hidrolizándose a  $m_2^{7,2'-O} \text{GMP}$ ), y sólo moderadamente estable en soluciones neutras o básicas. Por esto, se tuvo cuidado en mantener el pH a 7 o más durante la purificación de  $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{Se}$ , lo que permite el aislamiento del producto con un rendimiento del 80% después de la cromatografía de intercambio iónico. Después, el  $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{Se}$  se acopló con el derivado imidazolida de  $\text{GMP}$  en presencia de un exceso de  $\text{ZnCl}_2$ . En el HPLC FI se observaron dos picos, que corresponden a dos diaestereoisómeros de  $m_2^{7,2'-O} \text{Gpp}_{\text{SeP}}\text{G}$ , que se designaron D1 y D2 según su orden de elución. Sin embargo, el acoplamiento se realizó lentamente, y la desaparición completa del  $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{Se}$  tardó unos dos días. El tiempo de reacción extendido permitió una hidrólisis parcial de  $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}\beta\text{Se}$  a  $m_2^{7,2'-O} \text{GMP}$  y sólo un rendimiento de reacción moderado (conversión del 40% por HPLC, aislamiento del 25%). La mezcla diaestereomérica de  $m_2^{7,2'-O} \text{Gpp}_{\text{SeP}}\text{G}$  después de aislarse por cromatografía de intercambio iónico se resolvió con éxito en los diaestereoisómeros puros por HPLC FI. Los productos se caracterizaron mediante espectrometría de masa,  $^1\text{H}$  RMN y  $^{31}\text{P}$  RMN para confirmar las estructuras y homogeneidad. Los isómeros D1 y D2 de  $m_2^{7,2'-O} \text{Gpp}_{\text{SeP}}\text{G}$  son estables en solución acuosa, no se hidrolizan u oxidan apreciativamente, y pueden almacenarse como sólidos, protegidos de la humedad a  $-20^\circ\text{C}$ , durante al menos tres meses.

También se han producido y serán producidos otros análogos de  $\text{BH}_3^-$  y  $\text{Se}^-$  mediante reacciones generalmente análogas a las indicadas en las Figuras 1-6.

#### Ejemplo 1

Procedimientos generales para el aislamiento y la caracterización de análogos de caperuza.

Los nucleótidos intermedios se separaron usando cromatografía de intercambio iónico usando una columna DEAE-Sephadex A-2S (forma  $\text{HCO}_3^-$ ) con un gradiente lineal de bicarbonato de trietilamonio (TEAB) en agua desionizada. Después de la evaporación bajo presión reducida con la adición de etanol, los productos intermedios se aislaron, como por ejemplo las sales de trietilamonio. Los productos finales (análogos de caperuza) se separaron adicionalmente mediante HPLC FI semi-preparativa y, después de la liofilización repetida, se aislaron como sales de amonio. El HPLC analítico se llevó a cabo con un equipo Agilent Technologies 1200 Series, usando una columna Supelcosil LC-18-T RP (4,6 x 250 mm, velocidad de flujo 1,3 ml/min) con un gradiente lineal de 0%-25% de  $m$  etanol en tampón de acetato de amonio 0,05M (pH 5,9). Los compuestos de elución se detectaron usando un detector UV-vis (a 260 nm), y un detector fluorescente (excitación a 280 nm y emisión a 337 nm). Se hizo la HPLC semi-preparativa usando el equipo Waters 600E Multisolvant Delivery System y una columna Waters Discovery RP Amide C16 en fase inversa (21,2 mm x 250 mm, velocidad de flujo 5,0 ml/min) con un gradiente lineal de metanol en un tampón de acetato de amonio 0,05M (pH 5,9) y detección de UV a 260 nm. Se registraron los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$  RMN a  $25^\circ\text{C}$  usando un espectrómetro Varian UNITY-plus a 399,94 M Hz y 161,90 M Hz, respectivamente. Se determinaron los desplazamientos químicos en el  $^1\text{H}$  RMN relativos a sodio 3-trimetilsilil-[2,2,3,3-D4]-propionato (TSP) en  $\text{D}_2\text{O}$  como patrón interno. Se determinaron los desplazamientos químicos en el  $^{31}\text{P}$  RMN relativos al ácido fosfórico 20% en  $\text{D}_2\text{O}$  como patrón externo. Se determinaron los desplazamientos químicos  $^{31}\text{P}$  RMN con relación a ácido fosforoso al 20% en  $\text{D}_2\text{O}$  como el patrón externo. Los espectros de masa en modo de ión negativo por electrospray [(ESI MS(-))] se obtuvieron con un espectrómetro Micromass QToF 1MS. Los disolventes y otros reactivos se compraron en Sigma-Aldrich, y se usaron sin tratamiento adicional alguno, a menos que se indique lo contrario. El acetonitrilo y la acetona se destilaron sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  y se almacenaron sobre mallas moleculares 4 Å antes de usarse.  $\text{GMP}$  y  $\text{GDP}$  se convirtieron en sales de trietilamonio con una resina de intercambio iónico Dowex 50 WX8. Se prepararon  $m_2^{7,2'-O} \text{GMP}$  y  $m_2^{7,2'-O} \text{GDP}$  en la forma especificada anteriormente por J. Jemielity *et al.* (2003).

## Ejemplo 2

Procedimiento general para la síntesis de derivados de nucleótido imidazolida.

- 5 GMP-Im,  $m_2^{7,2'-O}$ GMP-Im, GDP-Im y  $m_2^{7,2'-O}$ GDP-Im se prepararon en la forma descrita por T. Mukaiyama *et al.*, "Phosphorylation by oxidation-reduction condensation. Preparation of active phosphorylating reagents", *M. Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 44, pág. 2.284 (1971). El nucleótido (1 equiv., sal TEA), imidazol (8 equiv.) y 2,2'-ditiodipiridina (3 equiv.) se mezclaron en DMF (~2,5 ml/100 mg de nucleótido). Se añadieron trietilamina (2 equiv.) y trifenilfosfina (3 equiv.), y la mezcla se agitó durante 6-8 h. Se precipitó el producto de la mezcla de reacción con una solución de NaClO<sub>4</sub> anhidro (1 equiv. por carga negativa) en acetona anhidra (~8 ml por ml de DMF). Después de enfriar a 4°C, se filtró el precipitado, se lavó repetidamente con acetona anhidra fría, y se secó al vacío bajo P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. Los rendimientos fueron de 80%-100%.

## Ejemplo 3

- 15 Guanosina 5'-(H-fosfonato).

Esta preparación fue la descrita por M. Yoshikawa *et al.*, "Studies of phosphorylation. IV. The phosphorylation of nucleosides with phosphorus trihalide". *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 43, págs. 456-461 (1970). 2',3'-O-isopropilideno guanosina (1,3 g, 4,0 mmol) se suspendió en 19,5 ml de trimetilfosfato y se enfrió a 0°C sobre hielo. Se añadió PCl<sub>3</sub> (1,06 ml, 12,1 mmol), y la mezcla se agitó a 0°C durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (80 ml), se ajustó el pH ~1,5 con NaHCO<sub>3</sub> sólido y se calentó a 7D°C durante 1 h. Se dejó que la temperatura de la solución llegase a temperatura ambiente, se ajustó a pH ~6 con NaHCO<sub>3</sub>, se diluyó con 80 ml de agua, y se hizo la cromatografía usando un equipo DEAE Sephadex con un gradiente de 0-0,9M de TEAB. Se recolectaron las fracciones que eluyen a 0,6-0,65M de TEAB, y que contenían ~3,0 mmol de producto, se evaporaron y secaron en un desecador al vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Esto produjo 1,34 g de la sal guanosina 5'-(H-fosfonato)trietilamonio (rendimiento del 75%). ESI MS (-) *m/z*: 346,08 (calc. para C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P: 346,06). <sup>1</sup>H RMN δ (ppm): 8,08 (1H, s, H8); 6,73 (1H, d, J=640 Hz, H-P); 5,93 (1H, d, J=5,4 Hz, H1'); 4,77 (1H, t, J=5,4 Hz); 4,48 (1H, t, J=3,2 Hz); 4,32 (1H, m, H4'); 4,11 (2H, m, H5' y H5"). <sup>31</sup>P RMN δ (ppm): 7,07 (1P, dt, J=640 Hz, J=6,0 Hz).

## Ejemplo 4

Guanosina 5'-O-boranofosfato, sal de trietilamonio.

- 35 Guanosina 5'-(H-fosfonato) (1,03 g, 2,3 mmol) se puso en un matraz de fondo redondo y se suspendió en 30 ml de acetonitrilo anhidro. Se selló el matraz con un septo de goma y se purgó con argón durante 30 min. Se inyectó N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (11,3 ml, 46 mmol) con una jeringa, y la mezcla se agitó vigorosamente hasta obtenerse una solución transparente, y entonces se agitó durante 30 min más. La solución se enfrió en un baño de hielo, y se añadió una solución de complejo BH<sub>3</sub>.SMe<sub>2</sub> 2 M en THF (5, 7 ml, 11,5 mmol). Después de 5 min, se sacó el matraz del baño de hielo, y se continuó la agitación durante 30 min más. Se evaporó la solución a presión reducida hasta obtener un residuo oleaginoso, que se puso nuevamente en un baño de hielo, se trató con 60 ml de metanol y 3 ml de amoníaco 2M en etanol, y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La solución se evaporó a sequedad bajo presión reducida, se disolvió en 100 ml de agua y se extrajo una vez con 20 ml de éter dietílico. Se eliminó el éter de la capa acuosa bajo presión reducida. Se separaron los productos usando un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-0,9 M de TEAB. Las fracciones que contenían 13,200 unidades de densidad óptica de producto se evaporaron a sequedad, se disolvieron en agua, y se liofilizaron para obtener 410 mg de la sal guanosina 5'-O-boranofosfato trietilamonio (32%): ESI MS (-) *m/z*: 360,13 (calc. para C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P<sup>11</sup>B: 360,09). <sup>1</sup>H RMN δ (ppm): 8,17 (1H, s, H8); 5,82 (1H, d, J=6,0 Hz, H1); 4,74 (1H, t, H2'); 4,47 (1H, t, H3'); 4,32 (1H, m, H4'); 4,03 (2H, m, H5' y H5"). <sup>31</sup>P RMN δ (ppm): 79,05 (1P, ~qq, J=158 Hz, 1=22,5 Hz).

## Ejemplo 5

Síntesis de  $m^7$ Gppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G.

- 55 A una mezcla de GMPBH<sub>3</sub> (50 mg, 0,089 mmol, sal TEA) y  $m^7$ GDP-Im (100 mg, 0,18 mmol, sal de sodio) en 2,5 ml de DMF/H<sub>2</sub>O (9:1) se añadió MgCl<sub>2</sub> anhidro (110 mg, 1,16 mmol) poco a poco, y la mezcla se agitó vigorosamente hasta la disolución de todos los reactivos. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, y transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción añadiendo EDTA (430 mg, 1,16 mmol) en 25 ml de agua con el pH ajustado a ~6 mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub> sólido. Los productos se separaron en un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-1,2M de TEAB. Se obtuvo una mezcla diaestereoisómera de  $m^7$ Gppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G (685 unidades de densidad óptica). Los diaestereoisómeros se resolvieron mediante HPLC semi-preparativo y se liofilizaron tres veces. El rendimiento después de la separación por HPLC fue 13,4 mg de  $m^7$ Gppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G (D1) y 7,3 mg de  $m^7$ Gppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G (D2) (18% y 9,8%, respectivamente). ESI MS (-) *m/z*: 799,22 (calc. para C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>B: 799,12). **D1**: <sup>1</sup>H RMN δ (ppm): 8,93 (1H, s,

H8, m<sup>7</sup>G); 7,99 (1H, s, H8 G); 5,79 (1H, d, J=3,2 Hz, H1', m<sup>7</sup>G); 5,73 (1H, d, J=6,0 Hz, H1' G); 4,59 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' G); 4,48 (1H, dd, J=4,4 Hz, J=3,2 Hz, H2' m<sup>7</sup>G); 4,40 (1H, m, H3, G); 4,37 (1H, m, H3' m<sup>7</sup>G); 4,27 (3H, m superpuesto, H4', H5', H5"); 4,13 (3H, m superpuesto, H4', H5', H5"); 3,95 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0,34 (3H, m ancho, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 84,07 (1P, m, Pa (P<sub>BH3</sub>)); -11,29 (1P, d, J=19,4 Hz, Py); -22,95 (1P, dd, J=19,4 Hz, J=30,0 Hz, P <sub>$\beta$</sub> ). **D2:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 8,87 (1H, s, H8, m<sup>7</sup>G); 7,95 (1H, s, H8 G); 5,79 (1H, d, J=2 Hz, H1', m<sup>7</sup>G); 5,68 (1H, d, J=5,4 Hz, H1' G); 4,62 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' G); 4,50 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' m<sup>7</sup>G); 4,41 (1H, m, H3', G); 4,37 (1H, m, H3' m<sup>7</sup>G); 4,25 (3H, m superpuesto, H4', H5', H5"); 4,15 (3H, m superpuesto, H4', H5', H5"); 3,93 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0,34 (3H, m ancho, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 84,0 (1P, m, Pa (P<sub>BH3</sub>)); -11,38 (1P, s, Py); -22,88 (1P, s, P <sub>$\beta$</sub> ).

## 10 Ejemplo 6

m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gppp<sub>BH3</sub>G.

15 A una mezcla de GMP<sub>BH3</sub> (30 mg, 0,053 mmol, sal TEA) y m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GDP-Im {60 mg, 0,11 mmol, sal de sodio) en 1,5 ml de DMF/H<sub>2</sub>O (9:1) se añadió MgCl<sub>2</sub> anhidro (80 mg, 0,85 mmol) poco a poco, y la mezcla se agitó vigorosamente hasta la disolución de todos los reactivos. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 4 días, y transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción añadiendo EDTA (320 mg, 0,85 mmol) en 25 ml de agua con el pH ajustado a  $\tilde{6}$  mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub> sólido. Los productos se separaron en un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-1,2M de TEAB. Se obtuvo una mezcla diaestereoisómera de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gppp<sub>BH3</sub>G (520 unidades de densidad óptica).  
 20 Los diaestereoisómeros se resolvieron mediante H PLC semi-preparativo y se liofilizaron tres veces. El rendimiento después de la separación por HPLC fue 6,1 mg de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gppp<sub>BH3</sub>G (D1) y 3,7 mg de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gppp<sub>BH3</sub>G (D2) (13,4% y 8,0%, respectivamente). ESI MS (-) m/z: 813,1S (calc. para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub><sup>11</sup>B: 813,13). **D1:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 9,03 (1H, s, H8, m<sup>7</sup>G); 8,09 (1H, s, H8G); 5,95 (1H, d, J=2,7 Hz, H1', m<sup>7</sup>G); 5,84 (1H, d, J=6,0 Hz, H1'G); 4,70 (1H, dd, J=6,0 Hz, J=5,1 Hz, H2' G); 4,56 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' m<sup>7</sup>G); 4,50 (1H, dd, J=3,5 Hz, 5,1 Hz, H3', G); 4,41 (1H, m, H5' G); 4,34 (2H, m superpuesto, H4', m<sup>7</sup>G, H4' G); 4,27 (2H, m superpuesto, H2', m<sup>7</sup>G, H5" G); 4,24 (2H, m, H5', H5", m<sup>7</sup>G); 4,08 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 3,60 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>); 0,40 (3H, m, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 83,7 (1P, m, Pa (P<sub>BH3</sub>)), -11,30 (1P, d, J=19,5 Hz, Py); -22,91 (1P, dd, J=19,5 Hz, J=30,0 Hz, P <sub>$\beta$</sub> ). **D2:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 8,98 (1H, s, H8, m<sup>7</sup>G); 8,06 (1H, s, H8G); 5,96 (1H, d, J=2,7 Hz, H1', m<sup>7</sup>G); 5,79 (1H, d, J=5,9 Hz, H1' G); 4,61 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' G); 4,50 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' m<sup>7</sup>G); 4,45 (1H, dd, J=3,5 Hz, 5,1 Hz, H3' G); 4,34 (2H, m (superpuesto), H4' m<sup>7</sup>G, H'5 G); 4,26 (3H, m (superpuesto), H2', m<sup>7</sup>G, H4', H5" G); 4,20 (2H, m, H5', H5", m<sup>7</sup>G); 4,06 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>); 3,61 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>); 0,40 (3H, m, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 83,7 (1P, m, Pa (P<sub>BH3</sub>)); -11,41 (1P, d, J=19,0 Hz, Py); -22,87 (1P, dd, J=19,0 Hz, J=32,0 Hz, P <sub>$\beta$</sub> ).

## Ejemplo 7

## 35 Sal Boranofosfato trietilamonio.

Esta sal se preparó usando una modificación del procedimiento de V. Nahum et al., "Boranophosphate salts as an Excellent Mimic of Phosphate Salts: Preparation, Characterization, and Properties", *J. Inorg. Chem.*, vol. 20, págs. 4.124-4.131 (2004). Se puso tris(trimetilsilil)fosfito (600 mg, 1,8 mmol) en un matraz de fondo redondo que contenía 5 ml de acetonitrilo anhidro. Se selló el matraz con un septo de goma y se purgó con argón durante 30 min. Se inyectó N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (1,5 ml, 5,4 mmol) con una jeringa. Después de 30min, la solución se enfrió en un baño de hielo, y se añadió una solución de complejo BH<sub>3</sub>-SMe<sub>2</sub> 2 M en THF (1,35 ml). Después de 5 min, se sacó el matraz del baño de hielo, y se continuó la agitación durante 30 min. Se evaporó la solución a presión reducida hasta obtener un residuo oleaginoso, que se puso nuevamente en un baño de hielo, se trató con 20 ml de metanol y 0,5 ml de trietilamina, y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. la solución se evaporó a sequedad y el residuo se secó sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. El rendimiento de [HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>BH<sub>3</sub> fue 530 mg (17,8 mmol) (97%, contaminado con acetamida). Esta sal de boranofosfato trietilamonio se almacenó a 4°C, y se usó en esta forma en reacciones hechas posteriormente. <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 0,33 ( $\tilde{d}$ q, JB-H=87,8 Hz, J<sub>P-H</sub>=22,3 Hz). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 84,3 ( $\tilde{q}$ q, J<sub>P-B</sub>=147 Hz, J<sub>P-H</sub>=22,3 Hz).

## 50 Ejemplo 8

Gpp<sub>BH3</sub>pG.

55 El derivado imidazolida de GMP (GMP-Im) (200 mg, 0,46 mmol, sal de sodio) y la sal de boranofosfato trietilamonio obtenida previamente (70 mg, 0,23 mmol) se suspendieron en 4 ml de DMF, y se añadió poco a poco MgCl<sub>2</sub> anhidro. Después de 1 h se detuvo la reacción añadiendo EDTA (1,48 mg, 4 mmol) en 40 ml de agua, y se ajustó el pH a  $\tilde{6}$  añadiendo NaHCO<sub>3</sub> sólido. Se separó el producto con un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-1,2M de TEAB. Después de la evaporación, se obtuvieron 165 mg (4.000 unidades de densidad óptica a 260 nm) de la sal Gpp<sub>BH3</sub>pG trietilamonio (rendimiento del 65%). ESI MS (-) m/z: 785,12 (calc. para C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>B: 785,10). <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 8,11 (1H, s, H8 G<sup>A</sup>); 8,09 (1H, s, H8 G<sup>B</sup>); 5,84 (2H, d, J=S,2 Hz, H1' G<sup>AB</sup>), 4,69 (2H,  $\tilde{t}$ , J=5,1 Hz, H2' G<sup>AB</sup>); 4,50 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' G<sup>A $\delta$ B</sup>); 4,49 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' G<sup>A $\delta$ B</sup>); 4,31 (2H, m, H4' GG<sup>AB</sup>); 4,24 (4H, m, H5' G<sup>AB</sup>, H5" G<sup>AB</sup>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$

(ppm): 75,10 (1P, m, P<sub>β</sub> (P<sub>BH3</sub>)), -11,20 (1P<sup>A</sup>,  $\tilde{d}$ t, J=30,2 Hz, J=5 Hz), -11,28 (1P<sup>B</sup>,  $\tilde{d}$ t, J=30,2 Hz, J=5 Hz). \*A y B denotan señales de los núcleos diaestereoisómeros.

## Ejemplo 9

5

m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG.

Se disolvió Gpp<sub>BH3</sub>pG (35 mg, sal TEA) en 1,5 ml de DMSO, y se añadieron 20  $\mu$ l de yoduro de metilo. Después de 4 h, se detuvo la reacción añadiendo 15 ml de agua y se ajustó el PH a  $\tilde{7}$  con NaHCO<sub>3</sub> sólido. Se separaron los productos con un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-1,2M de TEAB. Se recogió una mezcla diaestereoisomérica de m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG (550 unidades de densidad óptica) y se evaporó el disolvente. A continuación, el producto se disolvió en una pequeña cantidad de agua y se convirtió a la sal de sodio en una resina Dowex. los diaestereoisómeros se resolvieron posteriormente usando HPLC semi-preparativa, y se liofilizaron tres veces. los rendimientos después de la separación por HPLC fueron 10,2 mg de m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG (D1) y 9,8 mg de m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG (D2) como las sales de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (37,2% y 35,6%, respectivamente). ESI MS (-) m/z: 799,13 (calc. para C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>B: 799,12). **D1:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 8,02 (1H, s, H8G); 5,89 (1H, d, J=3,0 Hz, H8 m<sup>7</sup>G); 5,80 (1H, d, l=6,2 Hz, H8G), 4,68 (1H,  $\tilde{t}$ , H2'G); 4,51 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' m<sup>7</sup>G); 4,50 (1H,  $\tilde{t}$ , H3'G); 4,42 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' G); 4,35 (3H, m (superpuesto), H4' H5', H5" G); 4,22 (3H, m (superpuesto), H4', H5', H5", m<sup>7</sup>G); 4,06 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0,53 (3H, m, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 75,1 (1P, m, P<sub>β</sub> (P<sub>BH3</sub>)), -11,3 (2P,  $\tilde{d}$ , J<sub>P $\alpha$ -P $\beta$</sub> )=30,7 Hz, P $\alpha$  y P $\gamma$ ). **D2:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 8,04 (1H, s, H8G); 5,92 (1H, d, J=3,0 Hz, H8 m<sup>7</sup>G); 5,82 (1H, d, J=6,2 Hz, H8G), 4,68 (1H,  $\tilde{t}$ , H2'G); 4,51 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' m<sup>7</sup>G); 4,50 (1H,  $\tilde{t}$ , H3'G); 4,42 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' G); 4,35 (3H, m (superpuesto), H4' H5', H5" G); 4,22 (3H, m (superpuesto), H4', H5', H5", m<sup>7</sup>G); 4,06 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0,53 (3H, m, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 75,13 (1P, m, P<sub>β</sub> (P<sub>BH3</sub>)), -11,31 (2P,  $\tilde{d}$ , J<sub>P $\alpha$ -P $\beta$</sub> )=30,7 Hz, P $\gamma$  y P $\alpha$ ).

## Ejemplo 10

25

m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G (Método I).

Gpp<sub>BH3</sub>pG (50 mg, 800 unidades de densidad óptica, sal TEA) se disolvieron en 1,0 ml de DMSO, y se añadieron 30  $\mu$ l de yoduro de metilo. Después de 2 h, se añadieron 30  $\mu$ l más de yoduro de metilo. Después de 2 h, se detuvo la reacción añadiendo 15 ml de agua y se ajustó el pH a  $\tilde{7}$  con NaHCO<sub>3</sub> sólido. Se separaron los productos usando un equipo DEAE Sephadex con un gradiente de 0-1,2M de TEAB. Se recolectó m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G (200 unidades de densidad óptica), se evaporó y se convirtió en la sal de sodio sobre una resina Dowex. Finalmente, el producto se precipitó con etanol y se secó sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. El rendimiento fue 22 mg de m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G (sal de sodio) (54%). ESI MS (-) m/z: 813,10 (calc. para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub><sup>11</sup>B: 813,13). <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 9,02 (2H, s, H8 m<sup>7</sup>G); 6,04 (2H, d, J=3,7 Hz, H2'G); 4,67 (2H,  $\tilde{t}$ , H2' m<sup>7</sup>G); 4,53 (2H,  $\tilde{t}$ , H3' m<sup>7</sup>G); 4,40 (2H, m, H4' m<sup>7</sup>G); 4,36 (2H, m, H5' m<sup>7</sup>G); 4,23 (2H, m, H5" m<sup>7</sup>G); 4,13 (6H, s, CH<sub>3</sub>); 0,44 (3H, m, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 74,90 (1P, m, P<sub>β</sub> (P<sub>BH3</sub>)), -11,33 (1P<sup>A</sup>,  $\tilde{d}$ , J<sub>P $\alpha$ -P $\beta$</sub> )=31,0 Hz); -11,36 (1P<sup>B</sup>,  $\tilde{d}$ , J<sub>P $\alpha$ -P $\beta$</sub> )=31,0 Hz). \*A y B denotan señales de los núcleos diaestereoisómeros.

## Ejemplo 11

40

m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G (Método II).

El derivado imidazolidina de m<sup>7</sup>GMP (m<sup>7</sup>GMP-Im) (225 mg, 0,5 mmol, sal de sodio) y la sal boranofosfato trietilamonio (75 mg, 0,25 mmol, sal de sodio) se suspendieron en 4 ml de DMF, y se añadió poco a poco MgCl<sub>2</sub> anhidro (380 mg, 4 mmol). Después de 1 h se detuvo la reacción añadiendo EDTA (1,48 mg, 4 mmol) en 40 ml de agua, y se ajustó el pH a  $\tilde{6}$  añadiendo NaHCO<sub>3</sub> sólido. Se separó el producto usando un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-1,1 M de TEAB. Después de evaporar el disolvente, se disolvió el producto en una pequeña cantidad de agua y se convirtió a la sal de sodio en una resina Dowex. Después de precipitarse con etanol y secarse sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, se obtuvieron 150 mg de la sal de sodio de m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G (rendimiento del 34%). (La información sobre el espectro se da bajo la descripción del Método I dado anteriormente).

## Ejemplo 12

55

m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG.

A una suspensión de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GMP-Im (15 mg, 0,03 mmol, sal de sodio) y la sal boranofosfato trietilamonio (30 mg, 0,1 mmol) en 0,5 ml de DMF, se añadió poco a poco MgCl<sub>2</sub> (40 mg, 0,4 mmol) y se agitó la mezcla hasta la disolución de los reactivos (1-2 min). Se añadieron GMP-Im (40 mg, 0,09 mmol) y MgCl<sub>2</sub> (40 mg) a la mezcla de reacción. La reacción se detuvo después de 5 h añadiendo EDTA (0,8 mmol) en 10 ml de agua, y se ajustó el pH a  $\tilde{6}$  con NaHCO<sub>3</sub> sólido. Se separaron los productos usando H PLC semi-preparativo y se liofilizaron tres veces. Los rendimientos fueron 5,1 mg de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG (D1) y 4,8 mg de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG (D2) como las sales de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (18% y 17%, respectivamente). ESI MS (-) m/z: 813,14 (calc. para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub><sup>11</sup>B: 813,13). **D1:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 9,04 (1H, s, H8 m<sup>7</sup>G); 8,10 (1H, s, H8 G); 5,97 (1H, d, J=2,9 Hz, H1', m<sup>7</sup>G), 5,80 (1H, d, J=5,9 Hz, H1' G); 4,70 (1H,

$\tilde{t}$ , H2' G); 4,56 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' m<sup>7</sup>G); 4,50 (1H,  $\tilde{t}$  Hz, H3' G); 4,41 (1H, m, H5' G); 4,34 (2H, m, superpuesto, H4', m<sup>7</sup>G, H4' G); 4,27 (2H', m (superpuesto, H2', m<sup>7</sup>G, H5'' G); 4,24 (2H, m, H5', H5'', m<sup>7</sup>G); 4,08 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>); 3,59 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 0,45 (3H, m, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 75,12 (1P m, P <sub>$\beta$</sub>  (P<sub>BH<sub>3</sub></sub>)), -11,09 (2P,  $\tilde{d}$ , J<sub>P $\alpha$ -P $\beta$</sub> )=30,7 Hz, P $\alpha$  y P $\gamma$ ). **D2:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 9,00 (1H, s, H8 m<sup>7</sup>G); 8,08 (1H, s, H8G); 5,96 (1H, d, J=2,9 Hz, H1' m<sup>7</sup>G), 5,81 (1H, d, J=5,9 Hz, H1' G); 4,70 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' G); 4,55 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' m<sup>7</sup>G); 4,48 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' G); 4,40 (2H, m superpuesto, H4' m<sup>7</sup>G H5' G); 4,30 (3H, m (superpuesto), H2', m<sup>7</sup>G H4' G, H5'' G); 4,25 (2H, m, H5', H5'' m<sup>7</sup>G); 4,07 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>); 3,62 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>); 0,45 (3H, m, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 75,12 (1P, m, P <sub>$\beta$</sub>  (P<sub>BH<sub>3</sub></sub>)), -11,11 (2P,  $\tilde{d}$ , J<sub>P $\alpha$ -P $\beta$</sub> )=30,7 Hz, P $\alpha$  y P $\gamma$ ).

## Ejemplo 13

10

Sal selenofosfato trietilamonio.

Usando una jeringa se añadió gota a gota una suspensión de selenio (160 mg, 2 mmol) en piridina (1 ml) a una solución sellada con un septo y en la que se estaba burbujeando argón de tris(trimetilsililfosfito) (600  $\mu$ l, 1,8 mmol) en CH<sub>3</sub>CN anhidro (20 ml). La solución resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min, y después se evaporó a sequedad. Se añadió entonces una solución de trietilamina (500  $\mu$ l, 3,6 mmol) en MeOH (20 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el residuo se re- evaporó dos veces con metanol. El producto, obtenido como un residuo oleaginoso, amarillento, se usó sin tratamiento adicional alguno en la siguiente reacción.

20

## Ejemplo 14

7,2'-O-dimetilguanosina 5'-O-(2-selenodifosfato) (m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GDP $\beta$ Se).

25

A una suspensión de 7,2'-O-dimetilguanosina 5'-O-fosfato imidazolida (250 mg, 0,43 mmol) y sal selenofosfato trietilamonio (preparada a partir de 600  $\mu$ l de (Me<sub>3</sub>SiO)<sub>3</sub>P) en 5 ml de DMF, se añadió ZnCl<sub>2</sub> (590 mg, 4,30 mmol) y la mezcla se agitó vigorosamente hasta la disolución de todos los reactivos (3 min). Se agitó la solución obtenida durante 20 min a temperatura ambiente y la reacción se detuvo entonces añadiendo una solución de EDTA disódico (1,6 g, 4,30 mmol) y 800 mg de NaHCO<sub>3</sub> en 300 ml de agua. Se ajustó el pH a  $\sim$ 7 con la cantidad necesaria de NaHCO<sub>3</sub>. Se aisló el producto con un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-1,0M de TEAB. El rendimiento fue 254 mg (0,35 mmol) de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GDP $\beta$ Se como la sal de TEA (81%). ESI MS (-) m/z: 553,85 (calc. para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub><sup>80</sup>Se: 533,97).

30

## Ejemplo 15

35

m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>Se</sub>pG.

m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GDP $\beta$ Se (250 mg, 0,35 mmol) y GMP-Im (250 mg, 0,50 mmol) se suspendieron en 5 ml de DMF, y se añadió ZnCl<sub>2</sub> anhidro (480 mg, 3,5 mmol). La solución obtenida se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 días. La reacción se detuvo añadiendo EDTA disódico (1,3 g, 3,5 mmol) en 100 ml de agua, y se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub> sólido. Los productos se aislaron con un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-1,2M de TEAB. Finalmente, los diaestereoisómeros se separaron por HPLC semi-preparativo y se liofilizaron tres veces. Los rendimientos fueron 40 mg (0,045 mmol) de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>Se</sub>pG (D1) y 35 mg (0,040 mmol) de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>Se</sub>pG (D2) como las sales de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (13% y 11%, respectivamente). ESI MS (-) m/z: 878,99 (calc. para C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub><sup>80</sup>Se: 879,02). **D1:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 9,02 (1H, s, H8 m<sup>7</sup>G); 8,04 (1H, s, H8G); 5,97 (1H, d, J=2,4 Hz, H1' m<sup>7</sup>G); 5,81 (1H, d, J=6,3 Hz, H1' G); 4,69 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' G), 4,55 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' m<sup>7</sup>G); 4,54 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' G), 4,43 (1H, m, H5' G), 4,32 (2H, m superpuesto, H4' G, H5'' G); 4,26 (4H, m superpuesto, H2' m<sup>7</sup>G, H4' m<sup>7</sup>G, H5' m<sup>7</sup>G, H5'' m<sup>7</sup>G); 4,06 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>); 3,59 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 17,4 (1P,  $\tilde{t}$ , J=29,6 Hz, P <sub>$\beta$</sub>  (P<sub>BH<sub>3</sub></sub>)); -12,4 (2P,  $\tilde{d}$ , J=29,6 Hz, P $\alpha$  y P $\gamma$ ). **D2:** <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm): 9,01 (1H, s, H8 m<sup>7</sup>G); 8,03 (1H, s, H8G); 5,94 (1H, d, J=2,7 Hz, H1' m<sup>7</sup>G); 5,79 (1H, d, J=6,1 Hz' H1' G); 4,68 (1H,  $\tilde{t}$ , H2' G), 4,56 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' m<sup>7</sup>G); 4,50 (1H,  $\tilde{t}$ , H3' G), 4,41 (1H, m, H5' G), 4,32 (3H, m superpuesto, H4' G, H5'' G); 4,26 (3H, m superpuesto, H4' m<sup>7</sup>G, H5' m<sup>7</sup>G, H5'' m<sup>7</sup>G); 4,07 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>); 3,58 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>); 0,45 (3H, m, BH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN  $\delta$  (ppm): 17,4 (1P,  $\tilde{t}$ , J=29,6 Hz, P <sub>$\beta$</sub>  (P<sub>BH<sub>3</sub></sub>)); -12,4 (2P,  $\tilde{d}$ , J=29,6 Hz, P $\alpha$  y P $\gamma$ ).

50

## Ejemplo 16

55

7-metilguanosina 5'-O-(H-fosfonato).

A guanosina 5'-O-(H-fosfonato) (260 mg, 0,65 mmol) disuelta en DMSO (10 ml) se añadió yoduro de metilo (322  $\mu$ g, 5,2 mmol), y la solución se agitó durante 3 h en un matraz tapado. La reacción se detuvo diluyendo con 200 ml de agua y la mezcla de reacción se extrajo tres veces con éter. El éster restante se eliminó de la capa acuosa bajo presión reducida, y se aisló el producto con un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-0,7M de TEAB. Después de la evaporación y secado sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, se obtuvieron 200 mg (0,43 mmol) de producto como una sal de trietilamonio (66%). ESI MS (-) m/z: 360,06 (calc. para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P<sub>1</sub>: 360,07).

60

## Ejemplo 17

7-metilguanosina 5'-O-fosforoselenoato ( $m^7$ GMPSe, sal de trietilamonio).

5 En un matraz de fondo redondo se puso 7-metilguanosina 5'-(H-fosfonato) (200 mg, 0,43 mmol) y se suspendió en 20 ml de acetonitrilo anhidro. Se selló el matraz con un septo de goma y se purgó con argón durante 30 min. Se inyectó N,O-bis(trimetil)acetamida (11,3 ml, 46 mmol) con una jeringa. La mezcla se agitó vigorosamente hasta obtenerse una solución transparente, y entonces se agitó durante 30 min más. Se añadió entonces selenio (40 mg, 0,5 mmol) en piridina (0,5 ml) y se continuó agitando durante 30 min más. Se evaporó la solución a presión reducida hasta obtener un residuo oleaginoso, se añadió una solución de trietilamina (60  $\mu$ l, 0,43 mmol) en metanol (40 ml), y la mezcla obtenida se agitó durante 2 h. Se evaporó la solución y el producto se disolvió en 100 ml de agua, y se filtró usando papel filtro. El producto se aisló usando un equipo DEAE Sephadex con un gradiente 0-0,9 M de TEAB. Después de la evaporación y liofilización, las fracciones produjeron 93 mg de la sal 7-metilguanosina 5'-O-fosforoselenoato trietilamonio (45%). ESI MS (-)  $m/z$ : 439,97 (calc. para  $C_{11}H_{15}N_5O_7P^{80}Se$ : 439,98).

## Ejemplo 18

$m^7$ Gp<sub>Se</sub>ppG.

20 A una suspensión de  $m^7$ GMPSe (10 mg, 0,021 mmol) y GDP-Im (15 mg, 0,027 mmol) en DMF (0,8 ml) se añadió  $ZnCl_2$  anhidro (30 mg, 0,22 mmol). Se mantuvo la reacción a temperatura ambiente durante 2 días, y se detuvo entonces añadiendo 90 mg de EDTA disódico en 10 ml de agua y se neutralizó con  $NaHCO_3$ . Se separaron los diaestereoisómeros por HPLC FI. Los rendimientos fueron 2 mg de  $m^7$ Gp<sub>Se</sub>ppG (D1) y 2,5 mg de  $m^7$ Gp<sub>Se</sub>ppG (D2) como las sales de  $NH_4^+$  (10% y 13%, respectivamente). ESI MS (-)  $m/z$ : 865,02 (calc. para  $C_{21}H_{28}N_{10}O_{17}P_3^{80}Se$ : 865,00).

## Ejemplo 19

Medición de las afinidades de enlace de eIF<sub>4</sub>E.

30 Se llevaron a cabo las mediciones de titulación por fluorescencia usando un espectrofluorómetro LS-50B ó LS-55 (Perkin Elmer Co.) a  $20,0 \pm 0,2^\circ C$  en 50 mM HEPES/KOH (pH 7,2) 0,5 mM EDTA, y 1 mM DTT, con la fuerza iónica ajustada a 150 mM mediante la adición de KCl. Se añadieron diversas soluciones de análogos de caperuza, de concentración cada vez mayor, como alícuotas de 11  $\mu$ l a 1,4 ml de soluciones de proteína de 0,1 ó 0,2  $\mu$ M. Se midieron las intensidades de la fluorescencia con excitación a 280 nm ó 295 nm con un ancho de banda de 2,2 nm, y detección a 337 nm con un ancho de banda de 4 nm y un filtro de corte a 290 nm. Se corrigieron los datos en cuanto a la dilución de la muestra y efectos del filtro interno. Se determinaron las constantes de asociación en el equilibrio ( $K_{as}$ ) ajustando la dependencia teórica de la intensidad de la fluorescencia sobre la concentración de análogo de caperuza con los datos experimentales, como se describe en A. Niedźwiecka *et al.*, "Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins", *J. Mol. Biol.*, vol. 312, págs. 615-635 (2002). Se permitió que la concentración de proteína fuese un parámetro libre en la ecuación de equilibrio, para determinar la cantidad de proteína "activa". La  $K_{as}$  final se calculó como el promedio ponderado de tres a diez titulaciones independientes, con los factores de ponderación tomados como los valores recíprocos de los cuadrados de las desviaciones estándar numéricas. Se realizó el análisis de regresión por mínimos cuadrados no lineal usando ORIGIN 6,0 (Microcal Software Inc., EE.UU.).

## Ejemplo 20

Ensayo de la susceptibilidad a DcpS.

50 Se expresó DcpS humano en *Escherichia coli*, como se describe en L. Cohen *et al.*, "Nematode  $m^7$ GpppG y  $m_3^{2,2,7}$ GpppG decapping: activities in *Ascaris* embryos and characterization of *C. elegans* scavenger DcpS", *RNA*, vol. 10, págs. 1.609-1.624 (2004). Se almacenó a  $-80^\circ C$  una solución de 15  $\mu$ M de la proteína en tampón Tris 20 mM, pH 7,5, que contenía KCl 50 nM, EDTA 0,2 mM, DTI 1 mM, PMSF 0,5 mM y glicerol 20% hasta su uso. Se hicieron reacciones enzimáticas a  $30^\circ C$  en 500  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7,9, que contenía  $MgCl_2$  20 mM y  $(NH_4)_2SO_4$  60 mM. Se trató una solución de 40  $\mu$ M del análogo de caperuza seleccionado con 5,0  $\mu$ l de DcpS durante 120 min. A los 10, 30, 60, y 120 min, se obtuvo una muestra de 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se desactivó por incubación a  $90^\circ C$  durante 2 min. Se analizaron las muestras sin tratamiento adicional alguno usando HPLC FI analítico con un gradiente lineal de metanol en  $KH_2PO_4$  0,1 M, pH 6,0. de 0-50% durante 15 min.

60

## Ejemplo 21

Síntesis de ARNm con caperuza de análogos de BH<sub>3</sub> y Se. Método I (para análogos de m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G (mezcla D1/D2) y m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pm<sup>7</sup>G).

5 Se sintetizó una plantilla de ADN para la transcripción *in vitro* usando PCR del plásmido 5P6p-5'UTR β-globin-LUCiferasa. La plantilla contenía el promotor SP6 seguido por la secuencia 5'-UTR de ARNm de β-globina de conejo y la región de codificación completa de la luciferasa de luciérnaga. Una mezcla de reacción de transcripción típica *in vitro* (50 μl) contenía tampón de transcripción SP6 (Fermentas, no. cat. EP0131), 2 μg de plantilla de ADN, 2 U/μl inhibidor de la ribonucleasa RiboLock (Fermentas), 2 mM de cada uno de los siguientes: ATP, CTP, y UTP, GTP 0,1 mM, y análogo de caperuza del dinucleótido 1 mM. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 5 min antes de añadir la polimerasa SP6 ARN (Fermentas) hasta una concentración final de 2 U/μl. Después de 30 min de incubación a 37°C, se añadió GTP hasta una concentración final de 1 mM, y se continuó la reacción durante 90 min más. Las mezclas de reacción se trataron con 1U de DNasa RQ1 (RNAse-free, Promega) por μg de plantilla de ADN en tampón de transcripción a 37°C durante 20 min. Se purificaron los transcritos de ARN sobre columnas Sephadex G-S0 tratadas con DEPC (Farmacia). La integridad de los transcritos se confirmó por electroforesis sobre un gel de agarosa 1%, no desnaturizante. Se determinaron las concentraciones espectrofotométricamente. Los transcritos se almacenaron a 80°C hasta su uso.

## Ejemplo 21

Síntesis de ARNm con caperuza de análogos BH<sub>3</sub> y Se. Método II (para análogos de m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG (D1) y m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>p<sup>7</sup>G (D2), m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G (D1), m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG (D2), m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>Se</sub>pG (D1) y m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>Se</sub>p<sup>7</sup>G (D2), m<sub>2</sub><sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG (D1), m<sub>2</sub><sup>7</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pm<sup>7</sup>G, m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GppspG (D1) y m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gppsp<sup>7</sup>G (D2)).

25 Se sintetizaron *in vitro* ARNm de luciferasa poliadenilada, en caperuza mediante PCR a partir de una plantilla de ADNds que contenía el promotor SP6, la secuencia 5'-UTR de ARNm de β-globina de conejo y la región de codificación completa de la luciferasa de luciérnaga y 31 residuos de adenosina. Una mezcla de reacción de transcripción típica (40 μl) contenía tampón de transcripción SP6 (Fermentas), 0,7 μg de plantilla de ADN, 1 U/μl inhibidor de la ribonucleasa RiboLock (Fermentas), 0,5 mM de cada uno de los siguientes: ATP, CTP, y UTP, GTP 0,1 mM, y análogo de caperuza del dinucleótido 0,5 mM. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 5 min antes de añadir la polimerasa SP6 ARN (Fermentas) hasta una concentración final de 1 U/μl, y se continuó la incubación durante 45 min a 37°C. La mezcla de reacción se trató con DNasa como en el Método I. Se purificaron los transcritos de ARN sobre columnas NucAway (Ambion). La integridad de los transcritos y la cuantificación se realizaron como en el Método I.

## Ejemplo 22

Eficiencia de la traducción de ARNm con caperuza en un sistema *in vitro*.

40 Se empleó un sistema de lisado de reticulocito de conejo tratado con una nucleasa de micrococo (Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System, Promega) para la traducción *in vitro*. Las reacciones de traducción se hicieron con 10 μl durante 60 min a 30°C. Una mezcla típica de reacción contuvo 40% de lisado de reticulocito, los 20 aminoácidos "estándar" (0,01 mM de cada uno), MgCl<sub>2</sub> (1,2 mM), acetato de potasio (170 mM) y ARNm (cinco concentraciones diferentes de cada concentración del transcripto, entre 0,25 y 4 μg/ml). Se midió la actividad de la luciferasa con un luminómetro (Glomax, Promega). Se usó regresión lineal para el ajuste de los datos (actividad de luciferasa vs. transcripto de ARNm) y la eficiencia traduccional se definió como la pendiente de esta línea. Las eficiencias traduccionales relativas de los ARNm de ensayo se compararon con la del ARNm de luciferasa con caperuza de m<sup>7</sup>GpppG, habiéndose definido este último como 1,0.

## Ejemplo 23

Inhibición de la traducción dependiente de la caperuza *in vitro* mediante análogos de BH<sub>3</sub>.

55 Se hicieron las reacciones de traducción *in vitro* con 12,5 μl durante 60 min a 30°C bajo condiciones favorables para la traducción dependiente de la caperuza. En algunos casos, la mezcla de reacción se incubó durante 60 min a 30°C antes de añadir el análogo de caperuza de dinucleótido (inhibidor) y ARNm de luciferasa con caperuza de m<sub>2</sub><sup>7,3'-O</sup>GpppG para iniciar la traducción. En otros casos, para analizar la estabilidad biológica, se incubó el análogo de caperuza en la mezcla de traducción durante 60 min a 30°C antes de añadir el ARNm de luciferasa para iniciar la traducción. Una mezcla de reacción típica contuvo 56% de lisado de reticulocito, los 20 aminoácidos "estándar" (0,01 mM de cada uno), MgCl<sub>2</sub> (1,2 mM), acetato de potasio (170 mM), inhibidor de ribonucleasa RiboLock (0,32 U/μl), solución de análogo de caperuza (1/10 del volumen total de reacción) y ARNm de luciferasa con caperuza de m<sub>2</sub><sup>7,3'-O</sup>GpppG. El transcripto no fue poliadenilado, sino que contenía un 3'-UTR de 59 bases. Se hicieron reacciones



con concentraciones del análogo de caperuza entre 0,12 y 100  $\mu\text{M}$ . Se midió la actividad de la luciferasa usando un luminómetro. A partir de las mediciones calculamos los valores  $\text{CI}_{50}$ , definidos como la concentración del análogo de caperuza que produjo una inhibición del 50%. Se usó el programa OriginPro8 para el ajuste de la curva con la ecuación  $q_{\text{LUC}} = Z/(1+1/\text{CI}_{50}) + N$ , donde  $q_{\text{LUC}}$  es la actividad de la luciferasa sintetizada en presencia del análogo de caperuza, Z es la actividad de la luciferasa sintetizada en ausencia del análogo de caperuza, N es la actividad de la luciferasa sintetizada de manera independiente de la caperuza, e I es la concentración del análogo de caperuza. En la Tabla 2 se muestran los datos.

5

Tabla 2

10

Caracterización biofísica y bioquímica de los análogos de  $\text{BH}_3$

Análogo de caperuza	Análogo de caperuza/afinida d eIF4E ( $K_{\text{AS}}\mu\text{M}^{-1}$ )	Susceptibilidad a DcpS	Eficiencia traduccional <i>in vitro</i>		Inhibición de la traducción <i>in vitro</i> ( $\text{CI}_{50}, \mu\text{M}$ )	
			Método I	Método II	Condición A	Condición B
$m^7\text{GpppG}$	$9,4 \pm 0,4$	hidrolizado	1,00	1,00	$8,3 \pm 0,2$ (n=21)	$35,1 \pm 10,8$
$m^7\text{Gpppm}^7\text{G}$	$5,0 \pm 0,2$	hidrolizado	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
$m^7\text{Gppp}_{\text{BH}_3}\text{G}$ (D1)	$14,5 \pm 0,2$	hidrolizado	N.D.	N.D.	$3,2 \pm 0,3$ (n=2)	$9,2 \pm 1,9$ (n=2)
$m^7\text{Gppp}_{\text{BH}_3}\text{G}$ (D2)	$14,4 \pm 0,6$	hidrolizado	N.D.	N.D.	$3,1 \pm 0,2$ (n=2)	$16,4 \pm 0,8$ (n=2)
$m^7\text{Gpp}_{\text{BH}_3}\text{pG}$ (D1)	$44 \pm 2$	resistente	$1,41 \pm 0,26$ (det. para mezcla D1/D2 1:1)	$1,91 \pm 0,37$	$1,6 \pm 0,3$ (n=4)	$1,3 \pm 0,1$ (n=5)
$m^7\text{Gpp}_{\text{BH}_3}\text{pG}$ (D2)	$13,0 \pm 0,2$	resistente		N.D.	$4,5 \pm 0,5$ (n=3)	$3,5 \pm 0,9$ (n=3)
$m^7\text{Gpp}_{\text{BH}_3}\text{pm}^7\text{G}$	$11,1 \pm 0,2$	resistente	$2,81 \pm 0,16$	$3,56 \pm 0,04$	$3,0 \pm 0,1$ (n=3)	$3,0 \pm 0,2$ (n=4)
$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{GpppG}$	$10,8 \pm 0,3$	hidrolizado	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
$m_2^{7,3'-\text{O}}\text{GpppG}$	$10,2 \pm 0,3$	hidrolizado	$2,73 \pm 0,25$	$1,82 \pm 0,20$	N.D.	N.D.
$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{Gppp}_{\text{BH}_3}\text{G}$ (D1)	$15,3 \pm 0,2$	hidrolizado	N.D.	$2,83 \pm 0,63$	N.D.	N.D.
$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{Gppp}_{\text{BH}_3}\text{G}$ (D2)	$14,4 \pm 0,2$	hidrolizado	N.D.	$1,84 \pm 0,11$	N.D.	N.D.

$m_2^{7,2'-O}$ Gpp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pG (D1)	39,4 ± 1,2	resistente	N.D.	2,66±1,1 1	N.D.	N.D.
$m_2^{7,2'-O}$ Gpp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pG (D2)	13,2 ± 0,2	resistente	N.D.	3,35±0,2 6	N.D.	N.D.

## Ejemplo 24

5 Resultados de la caracterización biofísica y bioquímica de los análogos de BH<sub>3</sub><sup>-</sup> y Se<sup>-</sup>.

Se determinaron las afinidades de enlace de eIF4E eucariótico por los diversos análogos de caperuza usando extinción por fluorescencia. Esta prueba biofísica permite predecir la eficacia potencial de los análogos de caperuza en la traducción. Se espera que los que poseen afinidades más altas hacia eIF4E que el análogo de caperuza sin modificar ( $m^7$ GpppG) serán reconocidos mejor por la maquinaria traduccional, produciendo eficiencias traduccionales más altas. También se espera que compitan más efectivamente con el ARNm sin modificar cuando se usan dinucleótidos sin caperuza para inhibir la traducción. Véase en general E. Grudzien-Nogalska *et al.*, "Synthesis of anti-reverse cap analogs (ARCAs) and their applications in mRNA translation and stability", *Methods Enzymol.*, vol. 431, págs. 203-227 (2007). Los resultados demostraron que las constantes de asociación para todos los análogos de BH<sub>3</sub> y Se estudiados fueron similares o superiores a los de sus homólogos sin modificar. Véanse las Tablas 2 y 3.

20

Tabla 3

Caracterización biofísica y bioquímica de los análogos de Se

Análogo de caperuza	Análogo de caperuza/afinidad d eIF4E (K <sub>AS</sub> )μM <sup>-1</sup>	Susceptibilidad a DcpS	Eficiencia traduccional <i>in vitro</i> (Método II)	Inhibición de la traducción <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> , μM)	
				Condición A	Condición B
$m^7$ GpppG	9,4 ± 0,4	hidrolizado	1,00	8,3±0,2 (n=21)	35,1±10,8
$m_2^{7,2'-O}$ GpppG	10,8 ± 0,3	hidrolizado	N.D.	N.D.	N.D.
$m_2^{7,3'-O}$ GpppG	10,2 ± 0,3	hidrolizado	1,82±0,20	N.D.	N.D.
$m_2^{7,2'-}$	38,5 ± 0,7	hidrolizado	2,24±0,28	8,4±1,4	14,7±1,6

25

$^{\circ}\text{Gpp}_{\text{Se}}\text{pG}$ (D1)				(n=3)	(n=1)
$m_2^{7,2'}\text{Gpp}_{\text{Se}}\text{pG}$ (D2)	19,0 ± 0,5	hidrolizado	2,31±0,22	3,9±0,5 (n=3)	11,4±7,2 (n=1)
$m^7\text{Gp}_{\text{Se}}\text{ppG}$ (D1)	N.D.	resistente	N.D.	N.D.	N.D.
$m^7\text{Gp}_{\text{Se}}\text{ppG}$ (D2)	N.D.	resistente	N.D.	N.D.	N.D.

Ejemplo 25

5 Eficiencias traduccionales de los ARNm con caperuza de análogos de BH<sub>3</sub> y Se.

Se determinaron las eficiencias traduccionales mediante traducción *in vitro*. Generalmente, se encontró que los ARNm con caperuza de los nuevos análogos poseen eficiencias traduccionales más altas que los ARNm con caperuza de los compuestos madre sin modificar (Tablas 4 y 5). Especialmente, se observaron eficiencias traduccionales altas con los análogos que fueron incorporados al ARNm exclusivamente en la orientación correcta (BH<sub>3</sub>-ARCA, Se-ARCA y  $m^7\text{Gpp}_{\text{BH}_3\text{pm}^7}\text{G}$ ).

Tabla 4

15 Eficiencia traduccional *in vitro* de ARNm de luciferasa con caperuza de análogos de caperuza de boranofosfato de dinucleótido

Análogo de caperuza	Eficiencia traduccional en comparación con $m^7\text{GpppG-LUC ARNm}$				
	Experimento N°				Media (DE)
	1	2	3	4	
ApppG	0,34	0,55	0,53	0,48	0,48 (0,09)
$m^7\text{GpppG}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$m_2^{7,3'-\text{O}}\text{GpppG}$	2,53	2,92	2,96	2,50	2,73 (0,25)
$m^7\text{Gpp}_{\text{BH}_3}\text{pG}^{\text{a}}$	1,66	1,42	1,14	-	1,41 (0,26)
$m^7\text{Gpp}_{\text{BH}_3\text{pm}^7}\text{G}$	-	2,63	2,91	2,89	2,81 0,16

<sup>a</sup> Mezcla 1:1 de D1 y D2

Tabla 5

Eficiencia traduccional *in vitro* de ARNm de luciferasa que contiene una cola poli-A de 31 bases y con caperuza de análogos de caperuza de boranofosfato o fosforoselenoato

5

Análogo de caperuza	Eficiencia traduccional en comparación con m <sup>7</sup> GpppG-LUC-(A) <sub>31</sub> ARNm					Media (DE)
	Experimento No.					
	1	2	3	4	5	
ApppG	0,27	0,16	0,14	0,19	0,18	0,19 (0,05)
m <sup>7</sup> GpppG	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
m <sub>2</sub> <sup>7,3'-0</sup> GpppG	1,98	1,66	1,61	1,77	2,08	1,82 (0,20)
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-0</sup> Gpp <sub>Se</sub> pG (D1)	2,05	2,09	2,16	2,65	-	2,24 (0,28)
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-0</sup> Gpp <sub>Se</sub> pG (D2)	2,53	2,31	2,09	-	-	2,31 (0,22)
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-0</sup> Gpp <sub>BH3</sub> pG (D1)	-	-	-	1,87	3,44	2,66 (1,11)
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-0</sup> Gpp <sub>BH3</sub> pG (D2)	-	-	-	3,16	3,53	3,35 (0,26)
m <sup>7</sup> Gpp <sub>BH3</sub> pG(D1)	-	-	-	1,65	2,17	1,91 (0,37)
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-0</sup> Gpp <sub>BH3</sub> G (D1)	-	-	-	2,38	3,28	2,83 (0,63)
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-0</sup> Gpp <sub>BH3</sub> G (D2)	-	-	-	1,76	1,92	1,84 (0,11)
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-0</sup> Gpp <sub>s</sub> pG (D1)	-	-	-	2,92	2,83	2,88 (0,06)
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-0</sup> Gpp <sub>s</sub> pG (D2)	-	-	-	3,20	3,02	3,11 (0,13)
m <sup>7</sup> Gpp <sub>BH3</sub> pm <sup>7</sup> G	-	-	-	-	3,56	3,56 (0,04)

## Ejemplo 26

- 10 Susceptibilidad de los nuevos análogos a la degradación con DcpS.

También se determinó esta susceptibilidad. Inesperadamente, se descubrió que todos los análogos β-BH<sub>3</sub> son resistentes a la hidrólisis con DcpS (Tabla 2). Ya que J. Kowalska *et al.* (2008) habían demostrado que los análogos de caperuza β-fosforotioato correspondientes son todos susceptibles al DcpS, este resultado indica que las diferentes modificaciones de fosfato en la misma posición del puente de trifosfato pueden tener diferentes consecuencias químicas. En comparación, con los análogos de Se, sólo los modificados en la posición y fueron resistentes a DcpS (Tabla 3).

## Ejemplo 27

- 20 Los análogos de BH<sub>3</sub> como inhibidores de la traducción *in vitro* dependiente de la caperuza.

Se hicieron dos tipos de experimentos. En uno de ellos (condición A) se añadió un análogo de caperuza al sistema de traducción conjuntamente con ARNm de luciferasa. En el otro (condición B), se incubó el análogo de caperuza en

el sistema de traducción durante 60 min antes de añadir ARNm. En los dos tipos de experimentos, se encontró que los análogos de BH<sub>3</sub> y Se son inhibidores fuertes de la traducción (Tablas 2 y 3). Asimismo, en comparación con m<sup>7</sup>GpppG, la incubación de algunos de estos análogos no empeoran sus propiedades inhibitorias, lo que se supone es un reflejo de su resistencia al ataque con pirofosfatasa. Existe una correlación entre la resistencia a la hidrólisis con DcpS y la estabilidad de los análogos en el sistema de traducción.

#### Ejemplo 28

Medición de la eficiencia traduccional y la degradación de ARNm en células Hela cultivadas.

Se empleó nucleoporación para transportar el ARN a las células Hela con un Nucleofector II (Amaxa Biosystems), siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. Se introdujo un microgramo de ARN en 10<sup>6</sup> células en la Solución V del Nucleofector, usando el programa T-024.

Para la medición de la síntesis de luciferasa, las células se dividieron en varios tubos Eppendorf, se pusieron a baño María a 37°C, y se agitaron. Para la extracción de proteína, 2 x 10<sup>5</sup> células fueron lisadas en 200 µl de Reactivo de Lisado de Cultivo Celular de Luciferasa (Promega). Se determinó la actividad de la luciferasa de los extractos celulares siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Para determinar la estabilidad del ARNm, se distribuyeron las células en platos de cultivo celular de 35 mm y se pusieron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% CO<sub>2</sub>. Se cosecharon las células en diversos puntos de tiempo y se lavaron dos veces con PBS. Para la extracción de ARN citoplásmico, 2 x 10<sup>5</sup> células fueron lisadas en 175 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Igepal (Sigma) 0,5% (v/v) y ditiotretol 1 mM. Los ARN se purificaron adicionalmente usando el mini equipo RNeasy® y se analizaron usando PCR en tiempo real.

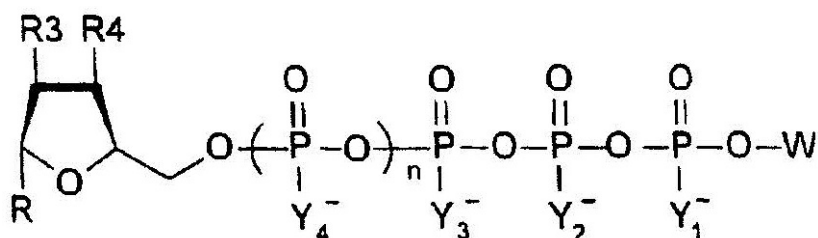
Se hizo la transcripción inversa usando 400 ng de ARN en mezclas de reacción de 20 µl que contenían MgCl<sub>2</sub> 5,5 mM, 500 µM de cada dNTP, 2,5 µM de hexámeros aleatorios, 0,2 unidades de inhibidor ARNasa, y 0,8 unidades de transcriptasa inversa MultiScribe (Applied Biosystems). Las mezclas de reacción se incubaron a 25°C durante 10 min, 48°C durante 30 min y 95°C durante 5 min. Se hizo el PCR cuantitativo en tiempo real con cebadores específicos diseñados para cada ARNm con la herramienta Beacon Designer (Bio-Rad). Los niveles de ARNm de luciferasa se determinaron usando PCR empleando cebadores diseñados para amplificar las bases 226-398 del extremo 5'. Los niveles de GAPDH ARNm de ratón se determinaron (como control) siguiendo el mismo método, y en las mismas muestras de ARN usando cebadores específicos para el GAPDH de ratón. La amplificación y detección se hicieron con el sistema de detección PCR en tiempo real iCycler IQ con mezclas de reacción de 25 µl que contenían 5 µl de la mezcla de reacción de transcripción (50 ng) de ADNc), 12,5 µl de IQ SYBRgreen Supermix, y 0,3 mM de cebadores (Bio-Rad). Las condiciones de incubación fueron 3 min a 95°C para la activación de la polimerasa, seguida de 40 ciclos, cada uno de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Se calcularon los niveles de ARNm de luciferasa usando el método de curva estándar absoluta como se describe en el Boletín del Usuario No. 2 del Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7700. Después, se normalizó el ARNm de luciferasa comparándose con el nivel determinado de GAPDH ARNm de ratón en cada muestra, lo que es un indicador del total de ARN celular purificado en un extracto celular. El ARNm de luciferasa restante en cada punto de tiempo se convirtió a un porcentaje del ARN presente en el tiempo cero, y se graficaron los resultados como Log<sub>10</sub>([ARN]) vs. tiempo para determinar t<sub>1/2</sub>. Los resultados se muestran en la Figura 14.

Se determinaron las eficiencias traduccionales de diversos ARNm de luciferasa normalizando la velocidad de síntesis de la luciferasa a la concentración de ARNm de luciferasa presente en las células en el tiempo cero. Los resultados se muestran en la Figura 15.

REIVINDICACIONES

1. Uno o más de los siguientes compuestos, o un estereoisómero de uno o más de los siguientes compuestos, o mezclas de estereoisómeros de uno o más de los siguientes compuestos, o una sal o sales de cualquiera de ellos:

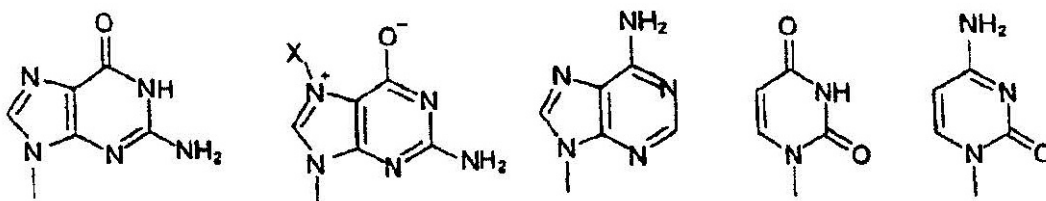
5



10 donde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y  $Y_4$  se seleccionan del grupo que consiste en O,  $BH_3$  y Se; los diversos grupos  $Y_i$  pueden ser iguales o diferentes, donde  $i$  es 1, 2, 3 ó 4; y al menos un  $Y_i$  es  $BH_3$  o Se;

$n$  es 0 ó 1;

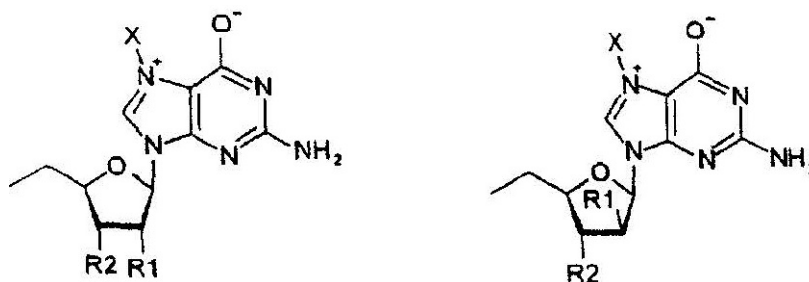
15 R se selecciona del grupo que consiste en:



20

$R_3$  y  $R_4$  se seleccionan del grupo que consiste en H, OH,  $OCH_3$  y  $OCH_2CH_3$ ; y  $R_3$  y  $R_4$  pueden ser iguales o diferentes.

25 W se selecciona del grupo que consiste en:



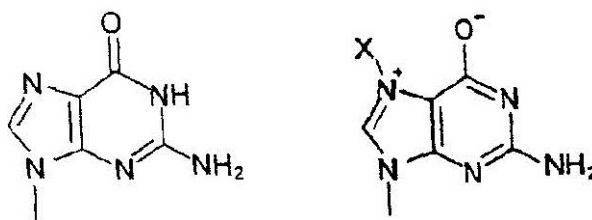
30  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan del grupo que consiste en H, OH,  $OCH_3$  u  $OCH_2CH_3$ ; y  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser iguales o diferentes; y

X se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo, bencilo sustituido, metilennaftilo y metilennaftilo sustituido.

35

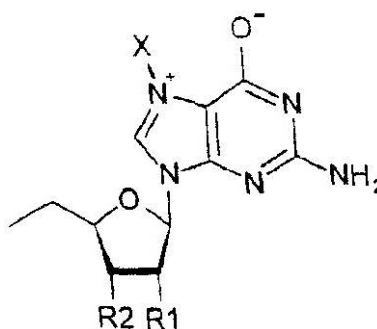
2. Un compuesto como el indicado en la reivindicación 1; donde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y  $Y_4$  se seleccionan del grupo que consiste en O, Se y  $BH_3$ ; los diversos grupos Y, pueden ser iguales o diferentes, donde  $i$  es 1,2,3, ó 4; y al menos un  $Y_i$  es  $BH_3$  o Se;

3. Un compuesto como el indicado en la reivindicación 2, donde R se selecciona del grupo que consiste en:



5

4. Un compuesto como el indicado en la reivindicación 2, donde W es:



10

R2 es OH; R1 es H u OCH<sub>3</sub>; X es metilo, y n = 0; y sólo uno entre Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> y Y<sub>3</sub> es BH<sub>3</sub> o Se.

15

5. Un compuesto como el indicado en la reivindicación 2, donde, si n = 0, entonces Y<sub>2</sub> o Y<sub>3</sub> es BH<sub>3</sub> o Se, y donde, si n = 1, entonces Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> o Y<sub>4</sub> es BH<sub>3</sub> o Se.

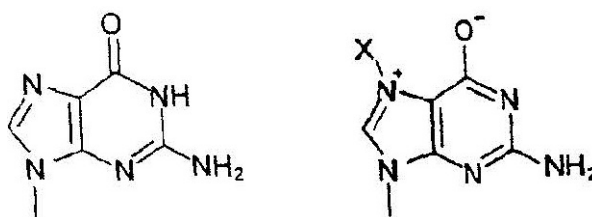
20

6. Una molécula de ARN cuyo extremo 5' incorpora un compuesto como el indicado en la reivindicación 2.

7. Una molécula de ARN cuyo extremo 5' incorpora un compuesto como el indicado en la reivindicación 5.

8. Una molécula de ARN como la indicada en la reivindicación 7, donde R se selecciona del grupo que consiste en:

25



30

9. Un método de síntesis, *in vitro* o *in vivo*, de una molécula de ARN como la indicada en la reivindicación 6, donde dicho método comprende la reacción de ATP, CTP, UTP y GTP, una composición como la indicada, y una plantilla de polinucleótido en presencia de ARN polimerasa, bajo condiciones que conduzcan a la transcripción por el ARN polimerasa de la plantilla de polinucleótido en una copia del ARN; por lo cual algunas de las copias de ARN incorporarán el compuesto para formar una molécula de ARN como la indicada en la reivindicación 6.

35

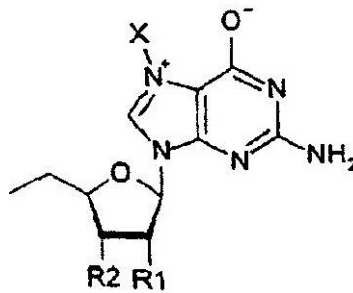
10. Un método de síntesis de una proteína o péptido *in vitro*, donde dicho método comprende la traducción de una molécula de ARN como la indicada en la reivindicación 6 en un sistema acelular de síntesis de proteína, donde la molécula de ARN comprende un marco de lectura abierto, bajo condiciones adecuadas para la traducción del marco de lectura abierto de la molécula de ARN en la proteína o péptido codificado por el marco de lectura abierto.

11. Un método de síntesis de una proteína o péptido in vivo o en células cultivadas, donde dicho método comprende la traducción de una molécula de ARN como la indicada en la reivindicación 6 in vivo o en células cultivadas, donde la molécula de ARN comprende un marco de lectura abierto, bajo condiciones adecuadas para la traducción del marco de lectura abierto de la molécula de ARN en la proteína o péptido codificado por el marco de lectura abierto.

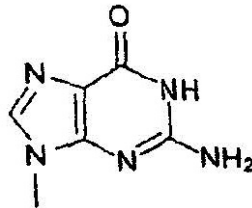
5 12. Un compuesto como el indicado en la reivindicación 2 para el uso en un método de inhibición total o parcial de la traducción del ARN en una proteína o péptido en un sistema que traduce el ARN en una proteína o péptido.

10 13. Un compuesto como el indicado en la reivindicación 2 para el uso en un método como el indicado en la reivindicación 12, donde el sistema es un sistema nativo de traducción del ARN de un organismo vivo.

14. Una composición como la indicada en la reivindicación 2; donde R1 es OCH<sub>3</sub>; R2 es OH; R3 es OH; R4 es OH; n es O; Y<sub>1</sub> es O; Y<sub>2</sub> es Se; Y<sub>3</sub> es O; W es



15 y R es



20



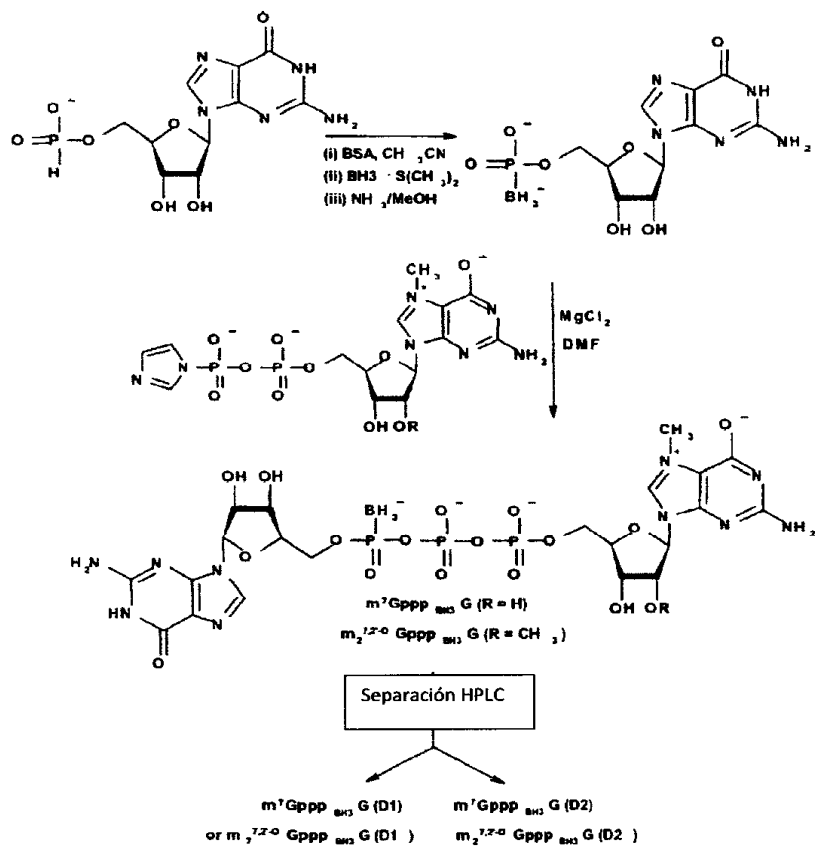


Fig. 1

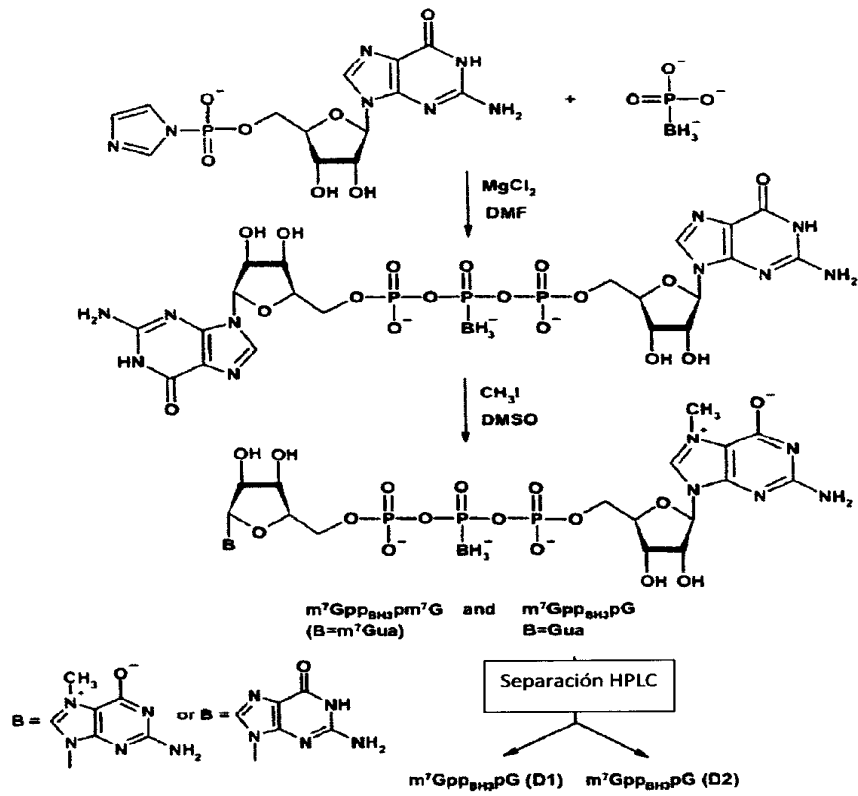


Fig. 2

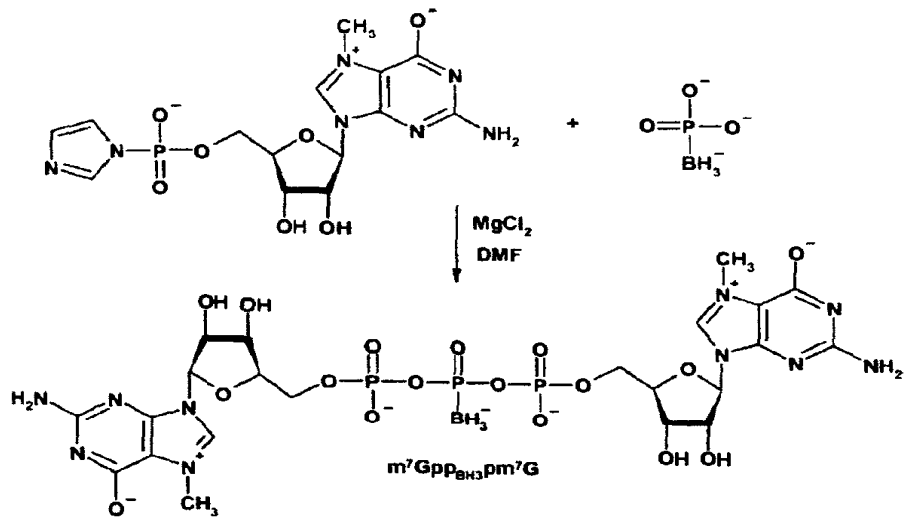


Fig. 3

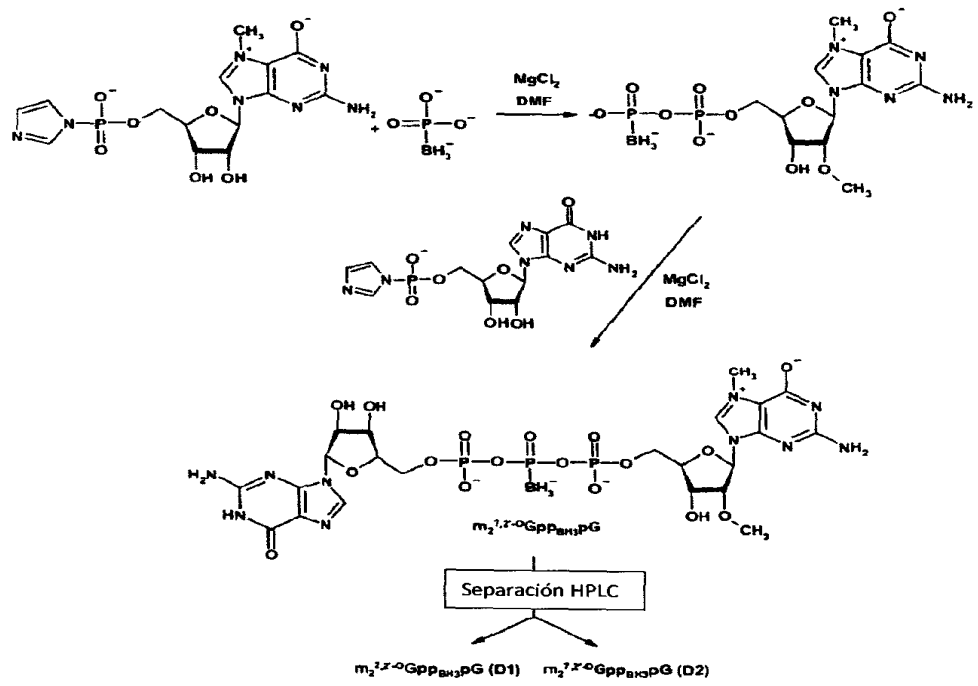


Fig. 4

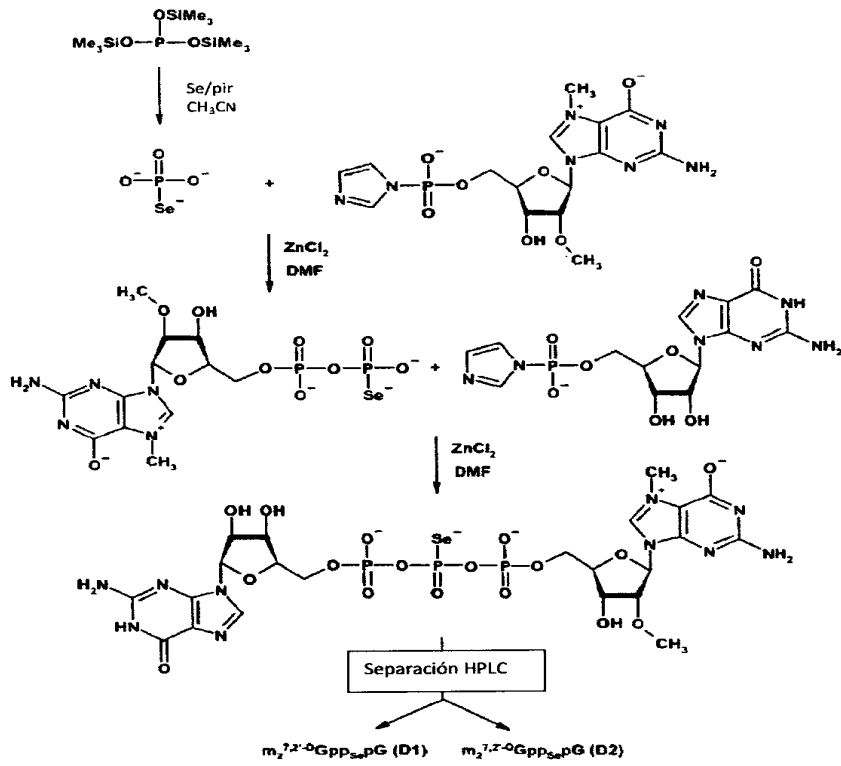


Fig. 5

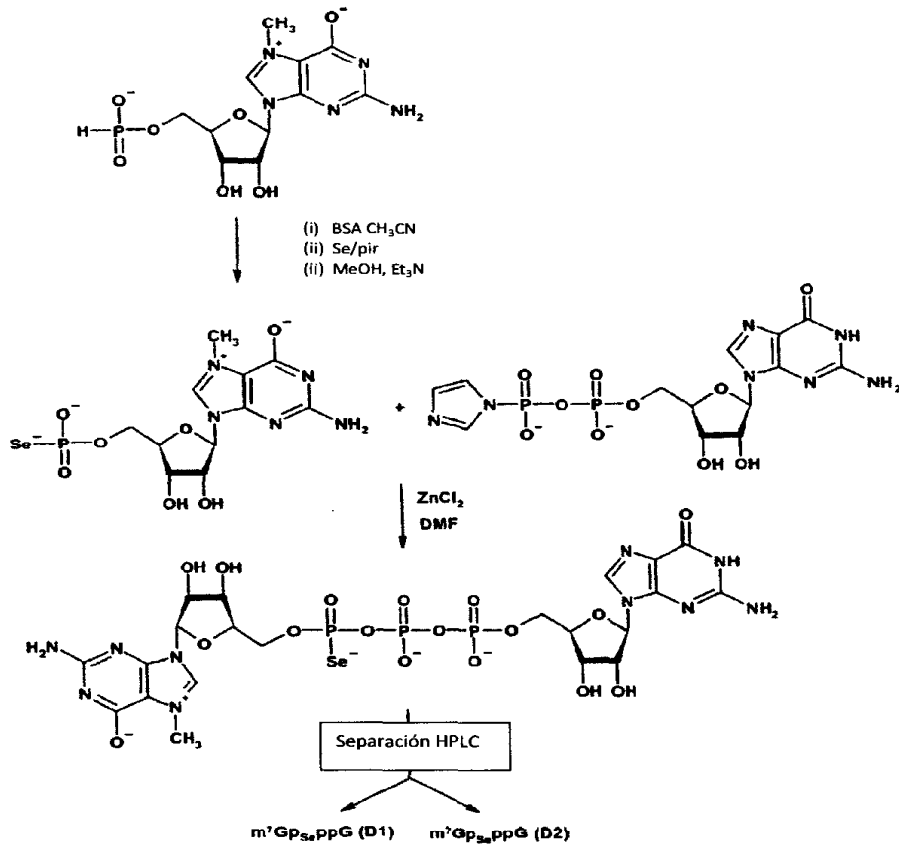


Fig. 6

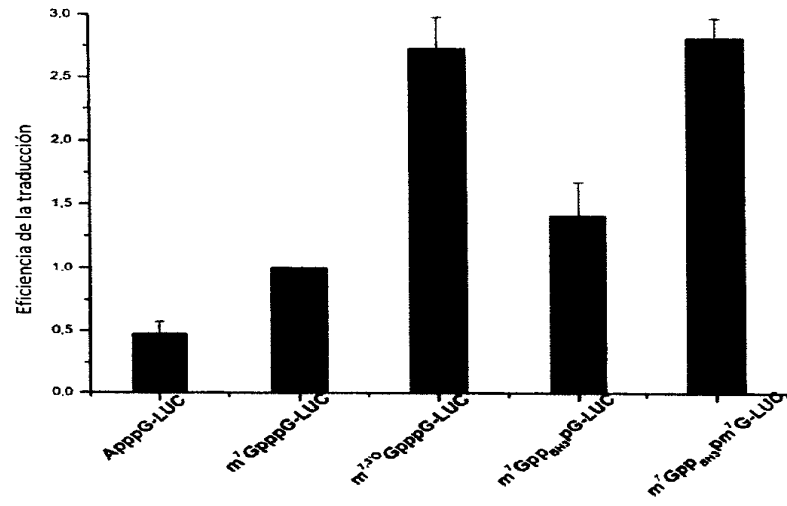


Fig. 7

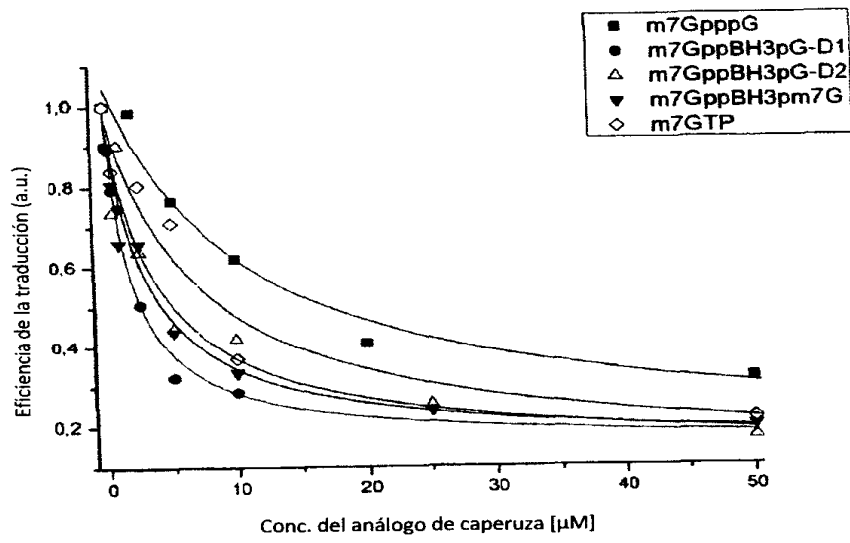


Fig. 8



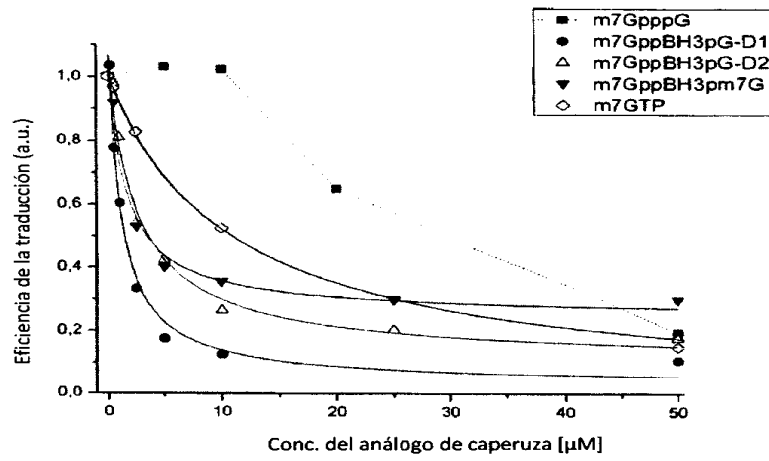


Fig. 9

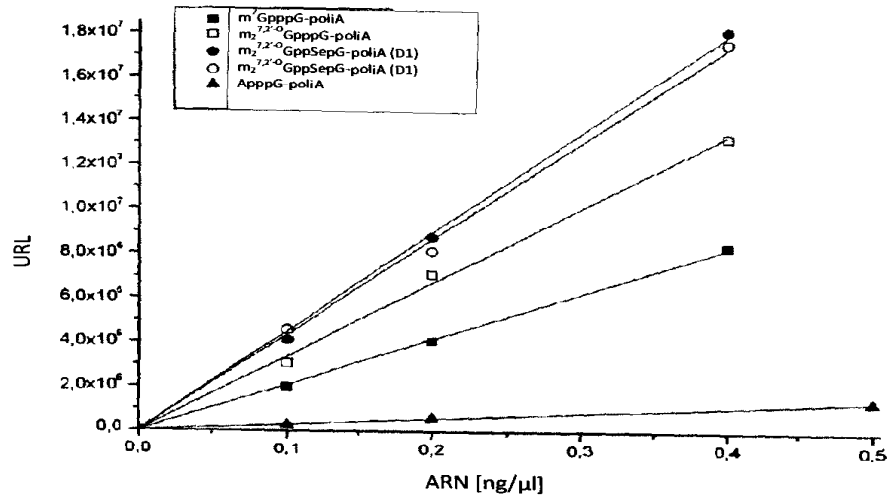


Fig. 10

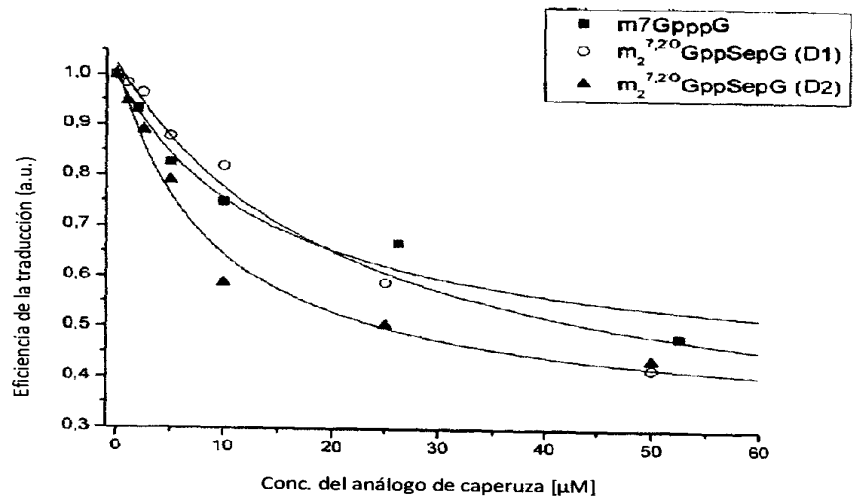


Fig. 11

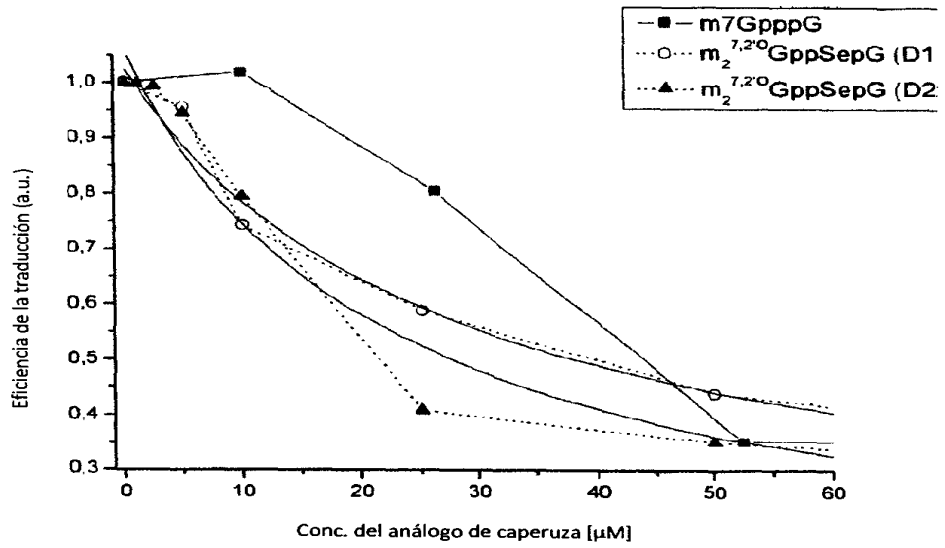
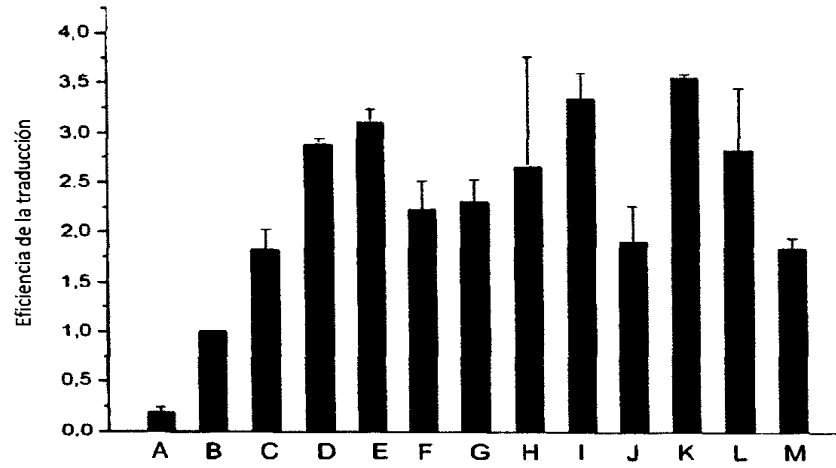
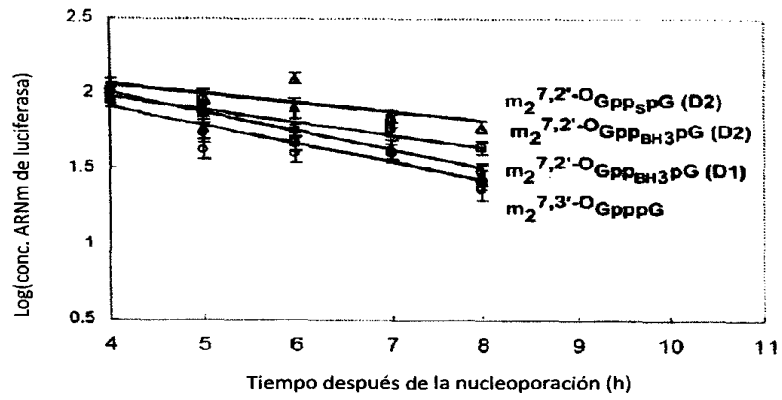


Fig. 12



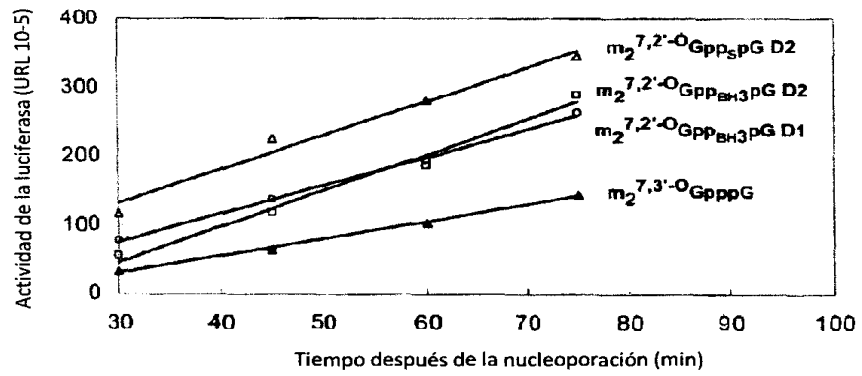
- A - Ap3G-LUC-poliA31
- B - m<sup>7</sup>Gp3G-LUC-poliA31
- C - m<sub>2</sub><sup>7,3°</sup>Gp3G-LUC-poliA31
- D - m<sub>2</sub><sup>7,2°</sup>Gpp<sub>sp</sub>G(D1)-LUC-poliA31
- E - m<sub>2</sub><sup>7,2°</sup>Gpp<sub>sp</sub>G(D2)-LUC-poliA31
- F - m<sub>2</sub><sup>7,2°</sup>Gpp<sub>se</sub>pG(D1)-LUC-poliA31
- G - m<sub>2</sub><sup>7,2°</sup>Gpp<sub>se</sub>pG(D2)-LUC-poliA31
- H - m<sub>2</sub><sup>7,2°</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG(D1)-LUC-poliA31
- I - m<sub>2</sub><sup>7,2°</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG(D2)-LUC-poliA31
- J - m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG(D1)-LUC-poliA31
- K - m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G-LUC-poliA31
- L - m<sub>2</sub><sup>7,2°</sup>Gpp<sub>BH3</sub>G(D1)-LUC-poliA31
- M - m<sub>2</sub><sup>7,2°</sup>Gpp<sub>BH3</sub>G(D2)-LUC-poliA31

**Fig. 13**



Análogo	Vida media	Cociente
ARCA	2.35±/0.3	1.00
BH3 D1	2.43±/0.4	1.03
BH3 D2	3.48±/0.6	1.48
S-ARCA	5.0±/1.0	2.13

Fig. 14



Análogo de caperuza	Pendiente relativa
ARCA	1.00
BH3 (D1)	1.64
BH3 (D2)	2.09
S-ARCA (D2)	2.01

Fig. 15