

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 500 515

51 Int. CI.:	
C07H 19/207	(2006.01)

(12)	TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA				
 96) Fecha de presentación y núme 97) Fecha y número de publicación 	ero de la solicitud europea: n de la concesión europea:	19.06.2008 23.07.2014	E 08771474 (7) EP 2167523		

54 Título: Síntesis y utilización de análogos de fosforotioato antiinversos de la caperuza de ARN mensajero

30 Prioridad:	Titular/es:
 19.06.2007 US 944842 P (45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 30.09.2014 	BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE (50.0%) P.O. Box 16070 Baton Rouge, LA 70893, US y UNIWERSYTET WARSZAWSKI (50.0%)
	12 Inventor/es:
	JEMIELITY, JACEK; GRUDZIEN-NOGALSKA, EWA M.; KOWALSKA, JOANNA; DARZYNKIEWICZ, EDWARD y RHOADS, ROBERT E. ⁷⁴ Agente/Representante: CURELL AGUILÁ. Mireia
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

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

Síntesis y utilización de análogos de fosforotioato antiinversos de la caperuza de ARN mensajero

5 Los derechos de la fecha de presentación de la solicitud US provisional número de serie 60/944.842, presentada el 19 de junio de 2007, se reivindican bajo 35 U.S.C. § 119(e) en los Estados Unidos de América, y se reivindican bajo los tratados y convenciones aplicables en todos los países.

El desarrollo de la presente invención fue financiado por el Gobierno de los Estados Unidos de América bajo el número de concesión R01GM20818 concedido por el National Institute of General Medical Sciences. El Gobierno de 10 los Estados Unidos de América tiene ciertos derechos en esta invención.

El desarrollo de la presente invención fue financiado parcialmente por el Gobierno de Polonia con el número de concesión 2 P04A 006 28 concedido por el Ministerio Polaco de Ciencia y Educación Superior.

Campo técnico

15

20

55

60

65

Se han sintetizado nuevos análogos de fosforotioato antiinverso de la caperuza ("cap") del ARN mensajero, y se ha demostrado que son útiles en la traducción de ARNm.

Antecedentes de la técnica

En eucariotas, los extremos 5' de la mayoría de los ARN mensajeros (ARNm) están bloqueados, o "con caperuza". Además, existen algunas otras formas de ARN que también presentan caperuza, por ejemplo ARN nucleares pequeños (ARNnp). La caperuza contiene un enlace de trifosfato 5'-5' entre dos restos nucleosídicos, y un grupo 7-25 metilo en un anillo de guanina distal. El formación de caperuza ("capping") de ARNm y ARNnp promueve sus funciones normales en las células.

La capacidad para sintetizar in vitro moléculas de ARN con caperuza es útil debido a que permite preparar 30 moléculas de ARN que se comportan apropiadamente en una variedad de aplicaciones biológicas. Tales aplicaciones incluyen tanto aplicaciones de investigación así como la producción comercial de polipéptidos, por ejemplo la producción en un sistema de traducción libre de células de polipéptidos que contienen un aminoácido "no natural" en un sitio específico, o la producción en células cultivadas de polipéptidos que requieren modificación postraduccional para su actividad o estabilidad. En estos últimos sistemas, la síntesis transcurre durante un tiempo 35 considerablemente largo, y por lo tanto produce más proteína.

El método más frecuentemente usado para obtener in vitro ARN con caperuza es transcribir un molde de ADN con una ARN polimerasa bacteriana o de bacteriófago en presencia de los cuatro trifosfatos de ribonucleósidos y un dinucleótido de caperuza tal como m⁷G(5')ppp(5')G (en adelante m⁷GpppG). La polimerasa inicia la transcripción con

- un ataque nucleofílico por el 3'-OH del resto Guo de m⁷GpppG en el α -fosfato del siguiente trifosfato de nucleósido 40 en la plantilla, dando como resultado el producto inicial m⁷GpppGpN. El producto iniciado por GTP alternativo, pppGpN se suprime ajustando la relación de m⁷GpppG a GTP entre 5 y 10 en la mezcla de reacción de transcripción.
- Los ARN sintéticos se pueden sintetizar mediante la transcripción libre de células de moldes de ADN. Véanse 45 Contreras et al., "Simple, efficient in vitro synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eukaryotic genes", Nucl. Acids Res., vol. 10, p. 6353-6362 (1982); J. Yisraeli et al., "Synthesis of long, capped transcripts in vitro by SP6 and T7 RNA polymerases, p. 42-50 en J. Dahlberg et al. (Eds.), Meth. Enzymol., vol. 180., p. 42-50 (1989); y D. Melton et al., "Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids
- containing a bacteriophage SP6 promoter", Nucl. Acids Res., vol. 12, p. 7035-7056 (1984). 50

Los ARN con caperuza así producidos son activos en reacciones de ayuste llevadas a cabo in vitro. Véanse M. Konarska et al., "Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. Cell, vol. 38, p. 731-736 (1984); e I. Edery et al., "Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 82, p. 7590-7594 (1985).

Los ARNm con caperuza se traducen en sistemas de traducción libres de célula de forma más eficiente que lo que lo hacen los ARNm sin caperuza. Véanse S. Muthukrishnan et al., "5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation", Nature, vol. 255, p. 33-37 (1975); L. Chu et al., "Paradoxical observations on the 5' terminus of ovalbumin messenger ribonucleic acid", J. Biol. Chem., vol. 253, p. 5228-5231 (1978); E. Darzynkiewicz et al., " β -Globin mRNAs capped with m⁷G,

 $m_2^{2.7}G$ or $m_3^{2.2.7}G$ differ in intrinsic translation efficiency", Nucl. Acids Res., vol. 16, p. 8953-8962 (1988); y E. Darzynkiewicz et al., "Inhibition of eukaryotic translation by nucleoside 5'-monophosphate analogues of mRNA 5'cap: Changes in N7 substituent affect analogue activity", Biochem., vol. 28, p. 4771-4778 (1989).

Los ARNm no metilados en 5' son traduccionalmente menos activos que los ARNm metilados en 5'. Véase G. Both et al., "Methylation-dependent translation of viral messenger RNAs in vitro", Proc. Natl. Acad Sci. USA, vol. 72, p. 1189-1193 (1975).

- 5 Los ARNm con caperuza introducidos mediante electroporación en células de mamífero cultivadas son traducidos más eficientemente que lo que lo son los ARNm sin caperuza. Véase E. Grudzien et al., "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs", J. Biol. Chem. vol. 281, p. 1857-1867 (2006).
- A. Pasquinelli et al., "Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases", RNA, vol. 1, p. 957-967
 (1995), dieron a conocer que las polimerasas de bacteriófagos usan el 3'-OH del resto de 7-metilguanosina de m⁷GpppG para iniciar la transcripción, demostrando que aproximadamente de un tercio a una mitad de los productos de ARN obtenidos con este análogo de caperuza contienen realmente la caperuza en orientación invertida, *es decir*, Gpppm⁷GpN. Tales moléculas de ARN con caperuza inversa se comportan anormalmente. Los mismos autores dieron a conocer que cuando se inyectaron transcritos de ARNsn pre-UI con caperuza inversa en núcleos de Xenopus laevis, se exportaron más lentamente que los transcritos naturales. De forma similar, los ARNsn U1 con
- caperuza inversa citoplásmicos en el citoplasma no se importaban apropiadamente al núcleo.
- La presencia de una caperuza en ARNm estimula fuertemente la traducción de un transcrito de ARNm a proteína. E. Grudzien et al., "Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNAs with high translational efficiency", RNA vol. 10, p.
 1479-1487 (2004), demostraron que los ARNm que contienen caperuzas incorporadas exclusivamente en la orientación inversa se tradujeron en un sistema libre de células con sólo 4% de la eficiencia de los ARNm que contienen caperuzas incorporadas exclusivamente en la orientación normal.
- J. Stepinski et al., "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogues 7methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG", RNA, vol. 7, p. 1486-1495 (2001) dieron a conocer la síntesis y uso de dos nuevos análogos de caperuza, m⁷3'dGpppG y m₂^{7,3'-O}GpppG, que son incapaces de incorporarse en la orientación inversa. Los ARNm a los que se les añaden la caperuza con estos "análogos de caperuza antiinversos" (ARCAs) se tradujeron más eficientemente en un sistema *in vitro* que los ARNm a los que se les añadieron la caperuza con el análogo convencional, m⁷GpppG. Véase también la patente U.S. nº 7.074.596, y la Publicación de Solicitud de Patente U.S. 2003/0194759.

Z. Peng et al., "Synthesis and application of a chain-terminating dinucleotide mRNA cap analog", Org. Lett, vol. 4, p. 161-164 (2002) dieron a conocer la síntesis de ^OGpppG y su uso en la transcripción *in vitro* de ARN con caperuza homogéneamente.

35

40

J. Jemielity et al, "Novel 'anti-reverse' cap analogues with superior translational properties", RNA, vol. 9, p. 1108-1122 (2003) dieron a conocer que la sustitución en la posición 2' con -OCH₃ o -H, para producir m₂^{7,2'-O}GpppG o m⁷2'dGpppG, respectivamente, produjeron ARCA con propiedades equivalentes a o ligeramente más favorables que aquellas de los ARCA sustituidos en la posición 3' según se mide mediante los criterios de unión a la proteína de unión a caperuza traduccional eIF4E, incorporación correcta en ARNm durante la transcripción *in vitro* y eficiencia traduccional de los ARNm resultantes en un sistema libre de células.

La cantidad de proteína producida a partir de ARNm sintéticos introducidos en células de mamífero cultivadas está limitada por la degradación del ARNm por procesos de recambio naturales. Una ruta *in vivo* importante de la degradación de ARNm se inicia mediante la eliminación de la caperuza desde el ARNm intacto mediante una pirofosfatasa específica, Dep1/Dcp2, que escinde entre los a y fosfatos. E. Grudzien et al., "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs", J. Biol Chem., vol. 281, p. 1857-1867 (2006), diseñaron y sintetizaron un análogo de caperuza en el que un grupo metilénico sustituyó el átomo O entre los grupos α y β fosfato, m₂^{7,3-O}Gpp_{CH2}pG, los ARNm con caperuza con este análogo fueron resistentes a la hidrólisis por Dcp2 humana recombinante *in vitro*. Cuando se introducen en células cultivadas, los ARNm con caperuza con m₂^{7,3-O}GpppG.

Existen dos enzimas de eliminación de caperuza conocidas: Dcp1/Dcp2, que actúa sobre ARNm intacto para iniciar la degradación 5' \rightarrow 3'; y DcpS, que actúa sobre oligonucleótidos con caperuza cortos que resultan de la 55 degradación 3' \rightarrow 5'. Debido a que Dcp1/Dcp2 o Dcp2 solas liberan m⁷GDP a partir de los ARNm con caperuza, es probable que la escisión se produzca entre los α - y β -fosfatos. Véase Z. Wang et al., "The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 99, p. 12663-12668 (2002). Previamente, se demostró que los 5'-monofosforotioatos de nucleósidos, así como los análogos de trifosfato tales como ATPyS, GTPγS, y GDPβS, fueron estables frente a fosfatasas. Véanse Eckstein et al., "Guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate). An inhibitor of adenylate cyclase stimulation by guanine nucleotides and fluoride ions", J. Biol. Chem., vol. 254, p. 60 9829-9834 (1979), y D. Cassel et al., "Activation of turkey erythrocyte adenylate cyclase and blocking of the catecholamine-stimulated GTPase by guanosine 5'-(gamma-thio) triphosphate", Biochem. Biophys, Res, Commun.) vol. 77, p. 868-873 (1977). Adicionalmente, se descubrió que los polinucleótidos que contienen enlaces internucleotídicos de fosforotioato son degradados más lentamente que sus contrapartes naturales. Véase H. Matzura et al., "A polyribonucleotide containing alternation P=O and P=S linkages", Eur. J. Biochem., vol. 3, p. 448-65

452 (1968). De forma interesante, los diastereómeros de fosforotioatos pueden mostrar diferentes sensibilidades frente a nucleasas. La nucleasa P1 hidroliza el diastereómero Sp más rápidamente que el Rp. Véase B. Potter et al., "Synthesis and configurational analysis of a dinucleoside phosphate isotopically chiral at phosphorus. Stereochemical course of Penicillium citrum nuclease P1 reaction", Biochemistry, vol. 22, p. 1369-1377 (1983). La ribonucleasa T1 y

- 5 la fosfodiesterasa de veneno de serpiente escinden preferiblemente el diastereómero Rp con respecto al Sp. Véanse F. Eckstein et al., "Stereochemistry of the transesterification step of ribonuclease T1", Biochemistry, vol. 11, p. 3507-3512 (1972), and P. Burgers et al., "Absolute Configuration of the Diastereomers of Adenosine 5'-O-(1thiotriphosphate): Consequences for the stereochemistry of polymerization by DNA-dependent RNA polymerase from Escherichia coli", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 75, p. 4798-4800 (1978).
- 10 Aunque el ARNm con caperuza con m₂^{7,3'-0}Gpp_{CH2}pG fue más estable en células cultivadas, tuvo menor eficiencia traduccional, presumiblemente debido a que m₂^{7,3'-0}Gpp_{CH2}pG se une a elF4E *in vitro* con una afinidad considerablemente menor que m₂^{7,3'-0}GpppG. De este modo, incluso aunque fue más estable en células cultivadas, esta ventaja se compensó por una menor eficiencia de la traducción.
- 15

J. Kowalska et al., "Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing phosphorothioate moiety in 5',5'triphosphate chain", Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids, vol. 24, p. 595-600 (2005) dieron a conocer la síntesis de tres análogos de caperuza en los que S está sustituido por O en los restos de α, β o γ-fosfato, por ejemplo m⁷Gp_sppG, m⁷Gpp_sG y m⁷Gpp_{s-CH3}pG. Estos análogos de caperuza de fosforotioatos sintetizados fueron inhibidores más estables de la traducción dependiente de la caperuza, y fueron resistentes a la enzima de eliminación de caperuza

- 20 estables de la traducción dependiente de la caperuza, y fueron resistentes a la enzima de eliminación de caperuza DcpS. Sin embargo, estos compuestos no mostrarían mayor eficiencia traduccional *in vitro* ni *in vivo* que los ARCA normales, debido a que se incorporarían en gran medida en la orientación inversa.
- Existe la necesidad de una modificación que lograse tanto una mayor eficiencia de la traducción como un incremento
 de la resistencia a la degradación tanto *in vivo* como *in vitro*. Los compuestos únicos dados a conocer en la presente
 memoria satisfacen ambas cosas.

Descripción de la invención

30 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que presenta una de las siguientes estructuras:







en las que:

5 cada Y se selecciona del grupo que consiste en O y S; los diversos Y pueden ser iguales o diferentes; y al menos un Y es S;

R1 se selecciona del grupo que consiste en H, OH, OCH₃, y OCH₂CH₃;

10 R2 se selecciona del grupo que consiste en H, OH, OCH₃, y OCH₂CH₃;

n es 3 o 4;

si R1 es OH, entonces R2 no es OH;

B se selecciona de entre el grupo que consiste en guanina, adenina, uridina, citosina; y

X se selecciona de entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo, bencilo sustituido, naftilmetilo, naftilmetilo sustituido, y otros grupos alifáticos o aromáticos de C1 a C10 sustituidos y no sustituidos; los diversos X pueden ser iguales o diferentes.

En una forma de realización, el compuesto del primer aspecto presenta la estructura



25

15

20

En una forma de realización, el compuesto del primer aspecto presenta la estructura



en la que B se selecciona de entre el grupo que consiste en



5

En una forma de realización, el compuesto del primer aspecto presenta la estructura



10

15

En una forma de realización, el compuesto del primer aspecto se selecciona de entre el grupo que consiste en $m_2^{7,2^{\circ}}$ ^OGpp_spG; $m_2^{7,3^{\circ}}$ OGpp_spG; $m_2^{7,2^{\circ}}$ OGpp_spG; $m_2^{7,3^{\circ}}$ OGpp_spG; $m_2^{7,2^{\circ}}$ OGpp_spG; $m_2^{7,3^{\circ}}$ OGpp_spG; $m_2^{7,2^{\circ}}$ OGpp_sp_SG; $m_2^{$ ^OGpp_sp_sG.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN cuyo extremo 5' incorpora un compuesto del primer aspecto como se menciona anteriormente.

- En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para sintetizar in vitro una molécula de ARN 20 como se menciona anteriormente en el segundo aspecto, comprendiendo dicho método hacer reaccionar ATP, CTP, UTP, GTP, un compuesto como se menciona, y un molde polinucleotídico, en presencia de una ARN polimerasa, en condiciones que conducen a la transcripción por la ARN polimerasa del molde polinucleotídico en una copia de ARN, con lo que algunas de las copias de ARN incorporarán el compuesto como se menciona, para obtener una molécula de ARN como se cita.
- 25

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para sintetizar in vitro una proteína o péptido, comprendiendo dicho método traducir una molécula de ARN como se menciona anteriormente en el segundo aspecto en un sistema de síntesis proteica libre de células, en el que la molécula de ARN comprende un marco abierto de lectura, en condiciones que conduzcan a traducir el marco abierto de lectura de la molécula de ARN en la

30 proteína o péptido codificado por el marco abierto de lectura.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para sintetizar *in vivo* una proteína o péptido, comprendiendo dicho método introducir en células una molécula de ARN como se menciona anteriormente en el segundo aspecto, en el que la molécula de ARN comprende un marco abierto de lectura, en condiciones que conduzcan a traducir el marco abierto de lectura de la molécula de ARN en la proteína o péptido codificado por el marco abierto de lectura.

En una forma de realización, el compuesto del primer aspecto consiste esencialmente en un único estereoisómero. En una forma de realización adicional, el compuesto del primer aspecto es una mezcla de al menos dos diastereómeros, un primer diastereómero y un segundo diastereómero, en el que dichos primer y segundo diastereómeros son por lo demás idénticos, con la excepción de que dichos primer y segundo diastereómeros tienen diferentes configuraciones estereoquímicas en un átomo de fósforo quiral, en el que dicho átomo de fósforo quiral es un átomo de fósforo que está unido a un átomo de azufre.

En una forma de realización del compuesto del primer aspecto, n es 3 y dicho compuesto contiene un grupo βfosforotioato, o n es 4 y dicho compuesto contiene un grupo γ-fosforotioato. En esta forma de realización, dicho compuesto no es hidrolizado por Dcp2 en condiciones fisiológicas. El compuesto del primer aspecto como se menciona en esta forma de realización se puede usar en un método para sintetizar *in vivo* una proteína o péptido, comprendiendo dicho método introducir en células una molécula de ARN cuyo extremo 5' incorpora el compuesto del primer aspecto como se menciona en esta forma de realización, en el que la molécula de ARN comprende un marco abierto de lectura, en condiciones que conduzcan a traducir el marco abierto de lectura de la molécula de

- ARN en la proteína o péptido codificado por el marco abierto de lectura; en el que la velocidad de traducción *in vivo* es al menos el doble de la velocidad de traducción *in vivo* que se obtendría a partir de un método de otro modo idéntico en el que cada Y es un átomo de oxígeno, y en el que ningún Y es un átomo de azufre.
- 25 En una forma de realización del compuesto del primer aspecto, n es 3 y dicho compuesto contiene un grupo γfosforotioato; o n es 4 y dicho compuesto contiene un grupo δ-fosforotioato. En esta forma de realización, dicho compuesto no es hidrolizado por DcpS en condiciones fisiológicas, y dicho compuesto inhibe la traducción dependiente de la caperuza.
- 30 Se ha descubierto que la sustitución de S en uno o más fosfatos junto con la sustitución 2'-O metilo produce nuevos análogos, denominados S-ARCA, con propiedades sorprendentes. La nueva modificación de los ARCA asegura que los grupos α, β, y γ fosforotioato se sitúan precisamente en los sitios activos de proteínas que se unen a la caperuza en la maquinaria tanto traduccional como eliminador de caperuza. Al menos algunos de estos análogos son resistentes a Dcp1/Dcp2. Algunos S-ARCA tienen una afinidad mucho mayor por eIF4E que los análogos
- 35 correspondientes que carecen de un grupo fosforotioato. Cuando se introdujeron ARNm que contienen los diversos S-ARCA en células de cultivo, algunos se tradujeron tanto como cinco veces más eficientemente que los ARNm sintetizados con el análogo convencional, m⁷GpppG. Además, la semivida de los ARNm con caperuza con algunos S-ARCA fue tanto como tres veces más larga que aquella de los ARNm sintetizados con caperuzas no modificadas. La combinación de un ARNm más eficientemente traducido y un ARN más estable dio como resultado una mayor
- 40 producción global de proteínas informadoras en células con sección transversal que con los ARNm sintéticos convencionales o con los ARNm con caperuza con ARCA previos. Los S-ARCA incrementaron la estabilidad *in vivo* e incrementaron sorprendentemente la eficiencia de la traducción que surge de una mayor afinidad por eIF4E combinada con una resistencia a Dcp1/Dcp2. La resistencia a la hidrólisis por Dcp2 en condiciones fisiológicas se correlacionó sorprendentemente con un grupo β-fosforotioato en trifosfatos, y se espera que también se correlacione
- 45 con un γ-fosforotioato en tetrafosfatos. Otra ventaja con respecto a los ARCA normales es la aparición de pdiastereomería, debido a los restos de fosforotioato. En cada caso cuando el resto de fosforotioato esté situado precisamente en posiciones α, β o γ, todavía existen dos posibilidades para colocar el átomo de azufre (proR y proS), lo que da como resultado dos diastereómeros diferentes con actividad biológica potencialmente diferente. Por ejemplo, hubo diferencias significativas en las afinidades de unión por elF4E entre los diastereómeros contraparte
- 50 D1 y D2 y también ARNm con caperuza con m₂^{7,2-O}Gpp_spG (D1), y D1 fue mucho más susceptible a Dcp2 que su contraparte D2. Por tanto, los S-ARCA diastereoméricamente puros se pueden aprovechar como sondas P-quirales útiles para la investigación de los cursos estereoquímicos de procesos enzimáticos que implican a la caperuza.

Breve descripción de los dibujos

55

5

10

La figura 1 representa la síntesis del α S-ARCA m₂^{7,2-O}Gppp_sG (D1 y D2).

La figura 2 representa la síntesis del γ S-ARCA m₂^{7,2'-O}Gp_sppG (D1 y D2).

60 La figura 3 representa la síntesis del β S-ARCA m₂^{7,2-O}Gpp_spG (D1 y D2).

La figura 4 representa la síntesis de un tetrafosfato γ S-ARCA, m₂^{7,2-O}Gpp_sppG (D1 y D2).

La figura 5 representa la síntesis de un S-ARCA con dos restos fosforotioato en las posiciones α y β en un puente de trifosfato, m₂^{7,2-O}Gpp_sp_sG (D1, D2, D3 y D4).

Las figuras 6A-6H representan un análisis de oligonucleótidos sintetizados in vitro digeridos con hDcp2 mediante HPLC de intercambio aniónico.

5 La figura 7 representa el decaimiento de los ARNm de luciferasa con caperuza con S-ARCA en células HC11.

La figura 8 representa la eficiencia traduccional de ARNm con caperuza con S-ARCA en células HC11.

- 10 Las figuras 9A-9E representan la distribución polisómica de ARNm de luciferasa con caperuza con S-ARCA en células HC11, mostrado como sedimentación en gradientes de sacarosa al monitorizar mediante absorbancia a 260 nm (A), y mediante uso de PCR de tiempo real para mostrar la distribución de ARNm de luciferasa (B, C, y D) y ARNm de GAPDH (E).
- 15 La figura 10 representa el curso de tiempo de la expresión de luciferasa tras la nucleoporación de células HC11 con los ARNm con caperuza con S-ARCA.

Modos de poner en práctica la invención

20 Materiales y métodos

Los ejemplos que no están comprendidos en las reivindicaciones son proporcionados únicamente a título comparativo.

25 Ejemplo 1

Procedimientos químicos generales

- Los nucleótidos intermedios se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAD-30 Sephadex A-25 (forma HCO³⁻) usando un gradiente lineal de bicarbonato de trietilamonio (TEAB) en agua desionizada, y tras la evaporación a presión reducida con adición de etanol, se aislaron como sales de trietilamonio. Los productos finales (análogos de caperuza) se separaron mediante RP HPLC semipreparativa o analítica, y, tras la liofilización repetida, se aislaron como sales de amonio. La HPLC analítica se llevó a cabo en un aparato Spectra-Physics SP8800 provisto de una columna de fase inversa Supelcosil LC-18-T (4,6 x 250 mm, caudal 1,3 ml/min.) con
- 35 un gradiente lineal 0-25% de metanol en tampón de acetato de amonio 0,05 M a pH 5,9, usando detección de UV a 260 nm. La HPLC semipreparativa se llevó a cabo en un Waters 600E Multisolvent Delivery System equipado con una columna de fase inversa Waters HR-C-18 (19 x 300 mm, caudal 5,0 m/min.) con un gradiente lineal de metanol en tampón de acetato de amonio 0,05 M (pH 5,9, usando detección de UV a 260 nm.
- 40 Los GMP y GDP se adquirieron de Sigma-Aldrich y se convirtieron en sales de trietilamonio usando resina de intercambio iónico Dowex 50 WX 8. Otros nucleótidos, *es decir*, m⁷GMP, m₂^{7,2-O}GMP, m⁷GDP, m₂^{7,2-O}GDP, se prepararon como se dio a conocer previamente en J. Jemielity et al., "Novel "anti-reverse" cap analogues with superior translational properties", RNA, vol. 9, p. 1108-1122 (2003). La sal trietilamónica de tiofosfato se preparó a partir de Na₃PSO₃ mediante conversión en resina de intercambio iónico Dowex 50 WX 8 y (tras la evaporación hasta
- 45 sequedad) y reevaporación con etanol al 99,8% se almacenó a -20°C. Véase J Kowalska et al., "A simple and rapid synthesis of nucleotide analogues containing a phosphorothioate moiety at the terminal position of the phosphate chain", Tetrahedron Lett., vol. 48, p. 5475-5479 (2007). La 7-metilguanosina se preparó como se dio a conocer previamente, con la excepción de que se usó DMF en lugar de DMA (véase J. Jones et al., "Purine Nucleosides. 111. Methylation Studies of Certain Naturally Occurring Purine Nucleosides", J. Am. Chem. Soc., vol. 85, p. 193-201
- 50 (1963)). La 7,2'-O-dimetilguanosina se sintetizó a partir de 2'-O-metilguanosina mediante un procedimiento análogo. La 2'-O-metilguanosina se preparó según J. Kusmierek et al., "A new route to 2'(3')-O-alkylpurine nucleosides", Nucleic Acids Res. vol. 1, p. 73-77, Publicación Especial nº 4 (1978).
- La estructura y homogeneidad de los compuestos finales se confirmó mediante recromatografía en RP HPLC, espectrometría de masas usando ionización por electropulverización negativa (MS ESI-) y espectroscopía de RMN ¹H y RMN ³¹P. (Los resultados se muestran en la Tabla 1). Los espectros de RMN ¹H y RMN ³¹P se registraron a 25°C en un espectrómetro Varian UNITY-plus a 399,94 MHz y 161,90 MHz respectivamente. Los desplazamientos químicos de RMN ¹H se dieron a conocer con respecto a 3-trimetilsilil-[2,2,3,3-D4]-propionato de sodio (TSP) en D₂O como patrón interno. Los desplazamientos químicos de RMN ³¹P se dieron a conocer con respecto a ácido fosforoso al 20% en D₂O como patrón interno. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Micromass QToF 1

MS usando ionización por electropulverización negativa (ESI-).

Ejemplo 2

65 Procedimiento general para derivados de imidazolida de nucleótido (GMP-Im, m₂^{7,2'-O}GMP-Im, GDP-Im, y m₂^{7,2'-O}GDPIm) (7, 8, y 12-15)

Véase T. Mukaiyama, et al., "Phosphorylation by oxidation-reduction condensation. Preparation of active phosphorylating reagents", M. Bull. Chem. Soc. Jpn., vol. 44, 2284 (1971). Un nucleótido apropiado (1 eq. de sal de TEA), imidazol (8 eq.), y 2,2'-ditiodipiridina (3 eq.) se mezclaron en DMF (aprox. 2,5 ml/100 mg de nucleótido). Se

5 añadieron trietilamina (2 eq.) y trifenilfosfina (3 eq.), y la mezcla se agitó durante 6-8 h. El producto se precipitó de la mezcla de reacción con perclorato de sodio anhidro (1 eq. por una carga negativa) disuelto en acetona seca (aprox. 8 ml/1 ml de DMF). Tras enfriar hasta 4ºC, el precipitado se filtró, se lavó repetidamente con acetona seca fría, y se secó a vacío sobre P₄O₁₀. Los rendimientos fueron 80-100%. En caso de m⁷GMP, debido a su menor solubilidad en DMF, se usó un mayor exceso de 2 veces de reactivos, y el tiempo de reacción se prolongó hasta 24 h.

10 Ejemplo 3

Procedimiento general para 5'-O-fosforotioatos de nucleósido (9-11)

- Una suspensión de un nucleósido apropiado (1 eq., secado toda la noche a vacío sobre P₄O₁₀) en fosfato de trimetilo (1,5 ml/100 mg de nucleósido) se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo/agua. Se añadieron 2,6-dimetilpiridina (3 eq.) y PSCl₃ (1,5 eq.). La reacción se mantuvo a 0°C toda la noche, después se paralizó con TEAB 0,35 M y se agitó durante 1 h a RT. El producto se separó mediante cromatografía de DEAE Sephadex usando un gradiente lineal de 0-0,7 M de TEAB. Rendimientos: (9) 380 mg (0,67 mmoles) partiendo de 257 mg (0,91 mmoles) de guanosina (74%); (10) 57 mg (0,10 mmoles) partiendo de 120 mg (0,42 mmoles) de 7-metilguanosina (24%); (11) 75 mg (0,13
- mmoles) partiendo de 70 mg (0,23 mmoles) de 7,2'-O-dimetilguanosina (53%).

Ejemplo 4

25 Síntesis de 5'U-(2-O-tiodifosfatos) de nucleótido

5'-O-(2-tiodifosfato) de 7,2'-O-dimetilguanosina (17). A una suspensión de 14 (100 mg, 0,21 mmoles) y sal trietilamónica de tiofosfato (220 mg) en 5 ml de DMF se le añadió ZnCl₂ anhidro (190 mg, 1,40 mmoles). La disolución resultante se agitó durante 20 min. a RT. La reacción se paralizó mediante adición de disolución de EDTA (520 mg, 1,40 mmoles) en 50 ml de agua y se neutralizó con NaHCO₃ sólido. El producto se aisló en DEAE

30 (520 mg, 1,40 mmoles) en 50 ml de agua y se neutralizó con NaHCO₃ sólido. El producto se aisló en DEAE Sephadex usando un gradiente 0-1,0 M de TEAB. Rendimiento: 106 mg (0,15 mmoles) de (17) como sal de TEA (71%).

5'-O-(2-tiodifosfato) de 7-metilguanosina (16). Este compuesto se sintetizó como se describe para (17), partiendo de
 (13) (40 mg, 0,089 mmoles) y sal trietilamónica de tiofosfato (100 mg). Rendimiento: 31 mg (0,046 mmoles) de (16) como sal de TEA (52%).

Ejemplo 5

40 Síntesis de S-ARCA de caperuza

A continuación se proporcionan las descripciones para la síntesis de diversos S-ARCA de caperuza. Las rutas sintéticas se representan en las figuras 1, 2 y 3. Los (números) se refieren a compuestos como se numeran en las figuras 1, 2 y 3.

45

50

 m^7 Gppp_sG D1 y D2 (1a, 1b). A una suspensión de (9) (10 mg, 0,018 mmoles) y 7 (15 mg, 0,027 mmoles) en DMF (0,8 ml) se le añadió ZnCl₂ anhidro (30 mg, 0,22 mmoles). La reacción se mantuvo a RT durante 2 días. La reacción se paralizó mediante adición de 90 mg de EDTA en 10 ml de agua y se neutralizó con NaHCO₃ sólido. Los diastereómeros (1a) y (1b) se separaron mediante RP HPLC analítica. Rendimiento: 0,8 mg de (1a) y 1,0 mg de (1b) como sales de NH₄⁺. En la figura 1 se muestra un esquema de la síntesis.

 m^{7} Gpp_spG D1 y D2 (2a, 2b). Este compuesto se sintetizó como se describe para 1, partiendo de 16 (20 mg, 0,030 mmoles), 15 (23 mg, 0.053 mmoles), ZnCl₂ (60 mg, 0,44 mmoles) en 2 ml de DMF. Rendimiento: 2.2 mg de (2a) y 1,8 mg de (2b) como sales de NH₄⁺. En la figura 3 se muestra un esquema de la síntesis.

55

m⁷Gp_sppG D1 y D2 (3a, 3b). Este compuesto se sintetizó como se describe para (1), partiendo de (10) (58 mg, 0,090 mmoles), (12) (120 mg, 0,22 mmoles), ZnCl₂ (249 mg, 1,8 mmoles) en 3,5 ml de DMF. Rendimiento: 14,7 mg de (3a) y 10,1 mg de (3b) como sales de NH₄⁺. En la Fig. 2 se muestra un esquema de la síntesis.

- 60 m₂^{7,2'-O}Gppp_sG D1 y D2 (4a, 4b). Los compuestos (9) (48 mg, 0,084 mmoles) y (8) (57 mg, 0,10 mmoles) se suspendieron en 2 ml de DMF. A continuación, se añadió ZnCl₂ anhidro (115 mg, 0,84 mmoles). La disolución resultante se mantuvo a RT durante 2 días. La reacción se paralizó mediante adición de 350 mg de EDTA en 30 ml de agua, y se neutralizó con bicarbonato de sodio sólido. Los productos se separaron mediante RP HPLC de fase inversa semipreparativa, usando un gradiente lineal de metanol en acetato de amonio 0,05M, pH = 5,9, de 0-50% en 45 min. Rendimiento: 5,2 mg de (4a) y 7,4 mg de (4b) como sales de NH₄⁺. En la figura 1 se muestra un esquema de
- 45 min. Rendimiento: 5,2 mg de (4a) y 7,4 mg de (4b) como sales de NH4⁺. En la figura 1 se muestra un esquema de la síntesis.

 $m_2^{7,2-O}$ Gpp_spG D1 y D2 (5a, 5b). Este compuesto se sintetizó como se describe para (4), partiendo de (17) (106 mg, 0,16 mmoles), (15) (103 mg, 0,24 mmoles) y ZnCl₂ (260 mg, 1,9 mmoles) en 5 ml de DMF. La reacción se paralizó con 800 mg de EDTA en 100 ml de agua, y se neutralizó con bicarbonato de sodio sólido. Los productos se separaron mediante RP HPLC semipreparativa, usando acetato de amonio 0,05M isocrático, pH = 5,9. Rendimiento: 10,0 mg de (5a) y 12,1 mg de (5b) como sales de NH₄⁺. En la figura 3 se muestra un esquema de la síntesis.

m₂^{7,2-O}Gp_sppG D1 y D2 (6a, 6b). Este compuesto se sintetizó como se describe para (4), partiendo de (11) (70 mg, 0,15 mmoles), (12) (107 mg, 0,20 mmoles) y ZnCl₂ anhidro (220 mg, 1,6 mmoles) en 3 ml de DMF. La reacción se paralizó con 650 mg de EDTA en 70 ml de agua. Los productos se separaron mediante RP HPLC semipreparativa, usando gradiente lineal de metanol en acetato de amonio 0,05M, pH = 5,9, de 0-50% en 45 min. Rendimiento: 15 mg de (6a) y 20 mg de (6b) como sales de NH₄⁺. En la figura 2 se muestra un esquema de la síntesis.

Las estructuras y homogeneidad de los compuestos finales anteriores se confirmaron mediante recromatografía en 15 RP HPLC, espectrometría de masas usando ionización por electropulverización negativa (MS ESI-), y espectroscopía de RMN ¹H y RMN ³¹P. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 Desplazamientos químicos de RMN ¹H en partes por millón (±0,01) frente a 3-trimetilsilil-[2,2,3,3-²H₄]-propionato de sodio interno, y desplazamientos químicos de RMN ³¹P en partes por millón (±0,01) frente a H₃PO₄ externo.

	1a	·	11)	2a	1	2b)	3a		3b)
-	m′G	G	m ⁷ G	G								
H8	_a	8,22	_ a	8,14	9,00 ^b	8,04	9,01 ^b	7,94	9,11 ^b	8,01	9,08 ^b	8,01
H1'	5,92	5,85	5,91	5,84	5,83	5,74	5,84	5,74	5,92	5,79	5,90	5,79
H2'	4,58	4,62	4,58	4,62	4,58	4,71	4,45	4,60	4,58	4,69	4,54	4,67
H3'	4,46	4,47	4,46	4,47	4,49	4,54	4,42 ^c	4,42 ^c	4,50	4,49	4,49	4,42
H4'	435 [°]	435 [°]	4,35 ^c	4,35 [°]	4,27 ^c	4,36 ^c	4,36 ^c	4,39 ^c	4,34 ^c	4,39 ^c	4,36 ^c	4,42 ^c
H5'	4,38 ^c	4,31 ^c	4,38 ^c	4,31 ^c	4,42	4,27 ^c	4,39 ^c	4,22 ^c	4,38 ^c	4,27	4,37 ^c	4,29 ^c
H5"	4,26 ^c	4,31 ^c	4,26 ^c	4,31 ^c	4,36 ^c	4,27 ^c	4,36 ^c	4,20 ^c	4,33 ^c	4,26	4,35 ^c	4,29 ^c
CH ₃ (N7)	4,07	-	4,05	-	4,06	-	4,03	-	4,07	-	4,07	-
Ρα	44,1	17	44,7	17	-12,	37	-12,3	37	-11,2	26	-11,2	26
Ρβ	-23,8	86	-23,	86	30,2	27	30,1	8	-23,	79	-23,	79
Ργ	-11,2	29	-11,	29	-12,	37	-12,3	37	43,6	6	43,2	26

	4a		4b		5a		5b		6a		6b	
	m ₂ ^{7,2'-0} G	G	m ₂ ^{7,2-0} G	G	m ₂ ^{7,2'-0} G	G						
H8	_a	8,10	_a	8,07	9,01 ^b	8,03	9,02 ^b	8,01	9,08 ^b	8,01	9,06 ^b	8,01
H1'	5,94	5,31	5,93	5,80	5,97	5,80	5,93	5,78	5,95	5,79	5,93	5,18
H2'	4,26	4,68	4,21	4,66	4,24	4,68	4,25 ^c	4,68	4,23	4,68	4,18	4,66
H3'	4,36	4,50	4,52	4,48 ^c	4,54	4,49	4,54	4,49	4,56	4,50	4,49 ^c	4,49 ^c
H4'	4,30 ^c	4,37 ^c	4,33 ^c	4,35 ^c	4,33 ^c	4,27 ^c	4,31 ^c	4,26 ^c	4,33	4,28	4,30 ^c	4,30 ^c
H5'	4,39 ^c	430 ^c	4,46 ^c	4,28 ^c	4,41	4,30 ^c	4,41	4,30 ^c	4,40	4,33 ^c	4,30 ^c	4,30 ^c
H5"	4,30 ^c	4,30 ^c	4,34 ^c	4,26 ^c	4,32 ^c	4,27 ^c	4,34 ^c	4,27 ^c	4,33 ^c	4,28	4,30 ^c	4,30 ^c
CH ₃ (N7)	4,08	-	4,07	-	4,06	-	4,07	-	4,08	-	4,08	-
CH ₃ (2'-O)	3,59	-	3,59	-	3,60	-	3,58	-	3,59	-	3,59	-
Ρα	43,6	1	43,7	0	-12,1	0	-12,1	0	-11,2	5	-11,3	2
Ρβ	-23,8	6	-23,8	0	30,3	3	30,2	3	-23,8	5	-23,7	2

5



^a – protones intercambiables; ^b – protones intercambiablemente pero visibles; ^c – valor aproximado debido al solapamiento de la señal

Ejemplo 6

Síntesis de S-ARCA de tetrafosfato

La utilidad de la estrategia desarrollada para la síntesis de S-ARCAs que contienen un puente de 5',5'-tetrafosfato se mostró mediante la síntesis de m^{27,2'-0}Gpp_sppG (figura 4). Las síntesis de otros tres S-ARCA de tetrafosfato (es decir,

10 $m_2^{7,2-O}Gp_spppG$, $m_2^{7,2-O}Gppp_spG$, $m_2^{7,2-O}Gpppp_sG$) está disponible vía un enfoque análogo.

m_2

5

15

^{7,2'-0}Gpp_sppG (D1 y D2).



Se suspendieron 5'-(tiodifosfato) de 7,2'-O-dimetilguanosina (20 mg, 0,029 mmoles) e imidazolida de 5'-difosfato de guanosina (30 mg, 0,056 mmoles) en 2 ml de DMF. A continuación, se añadió ZnCl₂ anhidro (61 mg, 0,45 mmoles).
La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La reacción se paralizó mediante adición de EDTA (166 mg, 0,45 mmoles) en 20 ml de agua, y se neutralizó con bicarbonato de sodio sólido. Los productos se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico DEAE Sephadex usando un gradiente 0-1,2 M de TEAB. Las fracciones que contienen una mezcla diastereomérica de m2^{7,2'-O}GppsppG se recogieron, se vertieron juntas y se evaporaron a presión reducida con adición repetida de etanol. La purificación final se logró mediante RP HPLC semipreparativa, usando un gradiente lineal de metanol en acetato de amonio 0,05 M, pH = 5,9, de 0-25% en 60 min. Rendimiento: 7 mg de m2^{7,2'-O}GppspG (mezcla diastereomérica) como sal de NH⁴⁺.

MS ESI (-): Calc. para C₂₂H₃₀N₁₀O₁₇P₃S: 897,02; encontrado: 879,09

30 D1: RMN ¹H: δ (ppm) 9,14 (1H, s) 8,08 (1H, s), 5,99 (1H, d), 5,813 (1H, d); 4,70 (1H; t), 4,64 (1H, t), 4,54 (1H, t), 4,45 (1H, m), 4,35 (2H, m), 4,29 (3H, m), 4,07 (3H, s), 3,60 (3H, s); RMN ³¹P: δ 30,2 (1P, t, P γ), -11,1 (1P, dd, P δ), -11,9 (1P, dd, P α), -23,8 (1P, d, P β)

D2: RMN ¹H: δ (ppm) 9,16 (1H, s) 8,08 (1H, s), 6,03 (1H, d), 5,83 (1H, d); 4,70 (1H; t), 4,60 (1H, t), 4,54 (1H, t), 4,45 (1H, m), 4,35 (2H, m), 4,29 (3H, m), 4,07 (3H, s), 3,58 (3H, s); RMN ³¹P: δ 30,2 (1P, t, Pγ), -11,1 (1P, dd, Pδ), -11,9 (1P, dd, Pα), -23,8 (1P, d, Pβ)

Ejemplo 7

45

40 Síntesis de S-ARCA con dos restos de fosforotioato

La estrategia desarrollada ofrece también una vía para sintetizar compuestos que contienen múltiples compuestos de fosforotioato en el puente de 5',5'-polifosfato que se puede lograr mediante la ruta sintética sugerida en la figura 5, por ejemplo el compuesto m₂^{7,2'-O}Gpp_sp_sG. El derivado de imidazolida de 5'-O-tiofosfato de guanosina se preparará de forma análoga al procedimiento dado a conocer previamente para el derivado de imidazolida de 5'-O-tiofosfato de 5'-O-tiofosfato de adenosina [M. Shimazu et al., "Regio-and stereocontrolled synthesis of 2'-5'-linked phosphorothioate oligoadenylates by uranyl ion catalyst in aqueous solution", J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2002, 1778 - 1785], y se

purificará en una columna DEAE Sephadex A-25 con un gradiente lineal de bicarbonato de trietilamonio (de 0 a 0,5 M de TEAB en agua desionizada). En la figura 5 se muestra una representación de la síntesis.

5'-O-(1,2-ditiodifosfato) de guanosina. El derivado de imidazolida de 5'-O-monotiofosfato de guanosina (sal trietilamónica, 53 mg, 0,1 mmoles) se mezclará con sal trietilamónica de fosforotioato (320 mg, aprox. 1,2 mmoles), y la mezcla resultante se suspenderá en 3,5 ml de DMF. A continuación, se añadirán cloruro de cinc anhidro (55 mg, 0,4 mmoles) y cloruro de manganeso (50 mg, 0,4 mmoles). La reacción se paralizará mediante adición de disolución de EDTA (270 mg, 0,8 mmoles en 35 ml de agua) y se llevará hasta pH 7 con bicarbonato de sodio. El aislamiento cromatográfico se realizará en una columna DEAE-Sephadex A-25 con un gradiente lineal de bicarbonato de trietilamonio (de 0 a 0,9 M de TEAB en agua desionizada). Las fracciones que contienen 5'-O-(1,2-ditiodifosfato) de guanosina se recogerán y se evaporarán a presión reducida con adición de metanol, y el sólido resultante se secó a vacío sobre P₄O₁₀.

m₂^{7,2'-O}Gpp_sp_sG. El derivado de imidazolida de 5'-O-monofosfato de 7,2'-O-dimetilguanosina (sal sódica, 23 mg, 0,05 mmoles) se mezclará con 5'-O-(1,2-ditiodifosfato) de guanosina (sal trietilamónica, 39 mg, 0,05 mmoles), y la mezcla resultante se suspenderá en 1,5 ml de DMF. A continuación, se añadirá cloruro de cinc anhidro (55 mg, 0,4 mmoles). La reacción se paralizará mediante adición de disolución de EDTA (135 mg, 0,4 mmoles en 20 ml de agua) y se llevará hasta pH 7 con bicarbonato de sodio. El aislamiento cromatográfico y la separación de los diastereómeros de m₂^{7,2'-O}Gpp_sp_sG (D1, D2, D3, D4) se realizará mediante RP HPLC de fase semipreparativa.

Ejemplo 8

Cultivo celular

Las células epiteliales mamarias HC11 se derivaron clonalmente a partir de la estirpe celular de glándula mamaria de ratón COMMA-1D. Véase K. Danielson et al., "Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vivo and functional differentiation in vitro", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 81, p. 3756-3760 (1984). Las células se hicieron crecer en medio RPMI 1640 que contiene 10% de suero de crecimiento bovino (HyClone), 5 μg/ml de insulina bovina (Sigma), y 10 ng/ml de EGF recombinante (BD Biosciences).

Ejemplo 9

Síntesis in vitro de los ARNm

- 35 Los ARN con caperuza se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* en presencia de un plásmido que codifica luciferasa (*pluc*-A₆₀), con T7 polimerasa, en presencia de los cuatro trifosfatos de nucleósido y de diferentes dinucleótidos de caperuza. Véase J. Jemielity et al., "Novel "anti-reverse" cap analogues with superior translational properties", RNA, vol. 9, p. 1108-1122 (2003). Una reacción de transcripción típica contenía 40 mM de Tris-HCl, pH 7,9, 6 mM de MgCl₂, 2 mM de espermidina, 10 mM de DTT, 0,1 mg/ml de BSA, 1 U/ml de RNasin (Promega), 0,5
- 40 mM de ATP, 0,5 mM de CTP, 0,5 mM de UTP, 0,1 mM de GTP, 1 mM de análogo de caperuza, 15 μg/ml de ADN, y 1 U/μl de T7 polimerasa (Promega). *pluc*-A₆₀, que contiene toda la secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga en pGEM4 (Promega) y un tramo de poly(A) de 60-nt 3'-terminal (véase E. Grudzien et al., "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs", J. Biol. Chem., vol. 281, p. 1857-1867 (2006)), se digirió con *Hpa*l para la síntesis de ARNm de luciferasa, y con *Nco*l para la síntesis de oligonucleótidos con caperuza .
 - Los ARN cortos (oligonucleótidos con caperuza de aproximadamente 48 nt) se sintetizaron en presencia de 10 μ Ci/ μ l de [α -³²P]GTP (ICN) en mezclas de reacción de 50 μ l incubadas durante 45 min a 37°C. Las mezclas de reacción se extrajeron con fenol y cloroformo, y entonces los ARN se separaron a partir de nucleótidos no incorporados usando columnas de centrifugación (Ambion), según el protocolo del fabricante. Las concentraciones de los ARNm se determinaron mediante recuento de Cerenkov, en el que la radioactividad específica de [α -³²P]GTP
- en la mezcla de reacción de transcripción final se usó para la conversión de cpm a pmoles.

Los ARNm se sintetizaron en mezclas de reacción de 200 µl incubadas durante 45 min. a 37°C. Tras la incubación, las mezclas de reacción de 200 µl se trataron con 3 unidades de DNasa RQ1 (Promega) durante 20 min. a 37°C, y el ARN se purificó con un RNeasy mini kit (Qiagen) usando el protocolo del fabricante. Las concentraciones de los ARN se determinaron espectrofotométricamente.

Ejemplo 10

50

55

60 Ensayo de eliminación de caperuza de ARN *in vitro*

La actividad de Dcp2 se midió con oligonucleótidos de 48 nt con caperuza como sustratos, una forma truncada de ARNm de luciferasa (48 nucleótidos). GST-hDcp2 se expresó en *Escherichia coli* y se purificó como se describe por Z. Wang et al., "The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 99, p. 12663 12668 (2002). Los elizonucleótidos con concruza con comparison en primer lugar a diagotida con CST.

p. 12663-12668 (2002). Los oligonucleótidos con caperuza se sometieron en primer lugar a digestión con GST-

hDcp2 a 37°C durante 2 h en tampón de eliminación de caperuza (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM de acetato de potasio, 2 mM de acetato de magnesio, 0,5 mM de MnCl₂, 2 mM de ditiotreitol, y 0,1 mM de espermina). Véase C. Piccirillo et al., "Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2", RNA, vol. 9, p. 1138-1147 (2003). La mezcla de reacción se extrajo entonces una vez con un volumen igual de fenol y dos veces

- 5 con cloroformo, y el ARN se hizo precipitar con etanol. Los productos de la reacción de eliminación de caperuza se digirieron posteriormente con un cóctel de ribonucleasas (RiboShredder; Epicentre) a 3ºC durante 1 h. Los productos se resolvieron mediante HPLC de intercambio aniónico en una columna de 4,6 x 250 mm Partisil 10SAX/25 (Whatman). El gradiente consistió en agua durante 1 min., un gradiente lineal hasta 112 mM de KH₂PO₄, pH 4,5, durante 20 min., un gradiente lineal de 112-450 mM de KH₂PO₄ durante 15 min., un gradiente lineal de 450 mM a 1,5
- 10 M de KH₂PO₄ durante 15 min., y elución isocrática a 1,5 M de KH₂PO₄ durante 9 min., todo ello a un caudal de 1 ml/min.

Ejemplo 11

15 Medida de la eficiencia traduccional y decaimiento de ARNm en células HC11

Se usaron dos métodos, electroporación y nucleoporación, para suministrar ARN a las células. En el caso de la electroporación, se introdujeron 5 µg de ARN en 10⁷ células HC11 en un volumen total de 400 µl de medio RPMI 1640 reducido en suero en una cubeta Gene Pulser (espacio de 4 mm) con un Bio-Rad Genepulser™ ajustado a

- 20 0,22 kV y 960 μF. Tras la descarga, las células se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron durante 2 min. 300 x g a temperatura ambiente, se resuspendieron en medio completo precalentado, y se colocaron a 37°C. La nucleoporación se llevó a cabo con un Amaxa Nucleofector II (Amaxa Biosystems) según las recomendaciones del fabricante. Se introdujo un microgramo de ARN en 10⁶ células HC11 con Nucleofector Solution V y el ajuste de regímenes recomendados (programa T-024).
- 25

Para la medida de la eficiencia traduccional, las células se dividieron en varios tubos Eppendorf, se colocaron en un baño de agua a 37°C, y se agitaron. Para la medida de la estabilidad del ARNm, las células se distribuyeron en placas de cultivo celular de 35 mm y se colocaron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Las células se recogieron en diversos tiempos y se lavaron dos veces con PBS.

30

35

Para la extracción de ARN citoplásmico, se lisaron 2×10^5 células en 175 µl de tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 140 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5% (v/v) de Igepal (Sigma), y 1 mM de ditiotreitol). Los ARN se purificaron posteriormente usando el RNeasy mini kit. Para la extracción de proteínas, se lisaron 2×10^5 células en 200 µl de Reactivo de Lisis de Cultivo Celular de Luciferasa (Promega). La actividad de luciferasa de los extractos celulares se midió según el protocolo del fabricante (Promega).

Ejemplo 12

Preparación de polisomas

40

45

Para separar subunidades ribosómicas y complejos de iniciación, se trataron 4 x 10⁶ células HC11 durante 2 min. con PBS enfriado con hielo que contiene 0,1 mg/ml de cicloheximida, se lavaron dos veces con el mismo medio, y se lisaron en 600 µl de 0,3 M de NaCl, 15 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 15 mM de MgCl₂, 1% de Triton X-100, 1 mg/ml de heparina, y 0,1 mg/ml de cicloheximida. Tras centrifugar a 14.000 x *g* durante 10 min., el sobrenadante se depositó en capas sobre un gradiente de sacarosa de 15-45% en el mismo tampón pero que carece de Triton X-100, y se centrifugó en un rotor Beckman SW41 Ti a 38.000 rpm a 4°C durante 2 h. Los gradientes se fraccionaron con monitorización continua de la absorbancia a 260 nm. El ARN de cada fracción (1 ml) se aisló y analizó mediante PCR en tiempo real.

50 Ejemplo 13

PCR en tiempo real

Para la medida de la estabilidad del ARNm, se trataron aproximadamente 2 μg de cada muestra de ARN total,
aislada de células HC11 y purificadas con un RNeasy mini kit (Qiagen), con 3 unidades de DNase RQ1 (Promega) durante 20 min. a 37°C. La transcripción inversa se llevó a cabo en 400 ng de ARN en mezclas de reacción de 20 μl que contienen 5,5 mM de MgCl₂, 500 mM de cada dNTP, 2,5 mM de hexámeros al azar, 0,2 unidades de inhibidor de RNase, 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. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo con cebadores específicos diseñados para cada ARNm con la herramienta Beacon Designer (Bio-Rad). Para detectar secuencias en el extremo 5' de ARNm de luciferasa, los cebadores fueron 5'-CGTTCGGTTGGCAGAAGCTA-3' (SEC ID NO: 1) y 5'-ACTGTTGAGCAATTCACGTTCATT-3'(SEC ID NO: 2). El ARNm de luciferasa desde la estructura de caperuza hasta el comienzo del tramo de homopolímero 3'-terminal consistió en 1714 nucleótidos. Estos cebadores amplificaron los nucleótidos 226-398. Los niveles de ARNm de

GAPDH de ratón se midieron mediante el mismo método y en las mismas muestras de ARN con los cebadores 5'-CAATGTGTCCGTCGTGGATCT-3' (SEC ID NO: 3) y 5'-GAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA-3' (SEC ID NO: 4).

La amplificación y detección se llevaron a cabo con el sistema de detección de PCR en tiempo real iCycler IQ en 5 mezclas de reacción de 25 μl que contienen 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, y 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min. a 60°C.

Los niveles de ARNm de luciferasa se calcularon usando el método de la curva estándar absoluta como se describe en Boletín de Usuario nº 2 para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700. Después de que se calculó la cantidad de ARNm de luciferasa a partir de una curva estándar, se normalizó para la cantidad de ARNm de GAPDH de ratón en cada muestra. La cantidad de ARNm de luciferasa restante en cada punto de tiempo se convirtió en un porcentaje del ARN presente a tiempo cero, y los resultados se representaron gráficamente como log₁₀([RNA]) frente al tiempo, para determinar la semivida. Para el análisis de ARN a partir de gradientes de polisomas, se añadió a cada fracción antes del aislamiento del ARN ARNm de GFP sintetizado *in vitro* como un

15 polisomas, se anadio a cada fraccion antes del aislamiento del ARN ARNM de GFP sintetizado in vitro como un patrón interno, para controlar la variación en el rendimiento de ARN. El nivel de ARNM de GFP se usó para normalizar los niveles de ARNM de luciferasa y de GAPDH.

Ejemplo 14

20

Afinidades de unión por eIF4E

Las afinidades de unión de análogos S por elF4E murina se determinaron mediante extinción de la fluorescencia. Se llevaron a cabo medidas de valoración de la fluorescencia en un espectrofluorómetro LS-50B (Perkin Elmer Co.) en 50 mM de HEPES/KOH (pH 7,2), 100 mM de KCl, 0,5 mM de EDTA, 1 mM de DTT a 20,0 ± 0,2°C. Se añadieron alícuotas de concentración creciente de 1 μl de disoluciones de análogo de caperuza a 1,4 ml de disoluciones de proteína 0,1. Las intensidades de la fluorescencia (excitación a 280 nm con una anchura de banda de 2,5 nm, y detección a 337 nm con una anchura de banda de 4 nm y un filtro de corte de 290 nm) se corrigieron teniendo en cuenta la dilución de la muestra y el efecto de *filtro interno*. Las constantes de asociación en el equilibrio (*K*_{AS}) se

- 30 determinaron ajustando la dependencia teórica de la intensidad de la fluorescencia de la concentración total del análogo de caperuza a los puntos de datos experimentales según la ecuación descrita previamente (véase A. Niedzwiecka 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. 319, p. 615-635 (2002)). La concentración de proteína se ajustó como un parámetro libre de la ecuación del equilibrio que muestra la cantidad de proteína "activa".
- 35 La K_{AS} final se calculó como un promedio ponderado de tres a diez valoraciones independientes, tomándose los pesos como los recíprocos de las desviaciones estándar numéricas al cuadrado. Se llevó a cabo el análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineal numérico usando ORGIN 6.0 (Microcal Software Inc., USA). Le energía libre de Gibbs de la unión se calculó a partir del valor de K_{AS} según la ecuación estándar $\Delta G^{0} = -R T \ln K_{AS}$.

40 Ejemplo 15

Hidrólisis enzimática mediante DcpS humana y de *C. elegans*

Unas DcpS humana y de nematodo se expresaron en *Escherichia coli* según los procedimientos descritos previamente (L.S. Cohen et al., "Nematode m7GpppG and m3(2,2,7)GpppG decapping: activities in Ascaris embryos and characterization of C. elegans scavenger DcpS", RNA, vol. 10, p. 1609-1624 (2004)). Ambas proteínas se almacenaron a -80°C en 20 mM de tampón de Tris, pH 7,5, que contiene 50 mM de KCl, 0,2 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0,5 mM de PMSF, y 20% de glicerol. Un análogo de caperuza apropiado, a una concentración de 1 mM se trató con 5,0 o 7,0 μl de DcpS (procedente de ser humano o de *C. elegans*, respectivamente) en 500 μl de 50 mM de

50 tampón de TRIS, pH = 7,9, que contiene 20 mM de MgCl₂ y 60 mM de (NH₄)₂SO₄ a 37°C durante 60-90 min. Cada 15-20 min. se recogió una muestra de 100 μl a partir de la mezcla de reacción y se desactivó mediante incubación en 90°C durante 3 min. Las muestras recogidas se analizaron sin tratamiento posterior mediante RP HPLC analítica, usando un gradiente lineal de metanol en 0,1 M de KH₂PO₄, pH = 6,0, de 0-50% en 15 min. y detección mediante UV a 260 nm.

Ejemplo 16

Inhibición de la traducción dependiente de la caperuza

- 60 Se usó un lisado de reticulocito de conejo tratado con nucleasa microcócica para la traducción *in vitro* (A. Cai et al., "Quantitative assessment of mRNA cap analogues as inhibitors of in vitro translation", Biochemistry, vol. 38, p. 8538-8547 (1999)). La traducción óptima dependiente de la caperuza se logró a 100 mM de acetato de potasio y 1,4 mM de cloruro de magnesio. Para determinar la inhibición de la traducción por diversos análogos de caperuza, se añadió al lisado, a la concentración de 5 μg/ml, ARNm de globina de conejo natural, y la síntesis proteica se midió mediante for incorporación do la ³ HI ou La paralización de los datos de K. so capo como se describe provisionneto (Cai et al.).
- 65 incorporación de [³H]Leu. La normalización de los datos de K_I se llevó a cabo como se describe previamente (Cai et

al., 1999). Las concentraciones de las disoluciones de análogo de caperuza dinucleotídico se midieron mediante absorción de UV a pH 7,0 usando λ = 255 nm y ϵ_{M} = 22,6 x 10⁻³ M.

Resultados

Ejemplo 17

5

15

Síntesis de análogos de caperuza

10 Las rutas sintéticas que conducen a los análogos que poseen el grupo fosforotioato en las posiciones α , γ y β de la cadena de trifosfato se representan en las figuras 1, 2 y 3, respectivamente.

Se sintetizó una serie de seis análogos de caperuza que poseen un único resto de fosforotioato en las posiciones α , β o γ de la cadena 5',5'-trifosfato (ver a continuación). Debido a la presencia del centro P estereogénico, cada S-análogo se obtuvo como una mezcla de dos diasterómeros, denominados D1 y D2 según su orden de elución durante RP HPLC. Cada S-análogo se resolvió con éxito mediante RP HPLC, proporcionando doce compuestos que se caracterizaron subsiguientemente de forma biofísica_y bioquímica. Seis de los S-análogos contenían una

modificación de ARCA, un grupo 2'-O-metilo en el resto m⁷Guo, y por tanto se denominan S-ARCA. La introducción de un grupo fosforotioato en la posición β produjo resistencia a Dcp2, incrementó la semivida, y mejoró la eficiencia
 traduccional.



Compuesto	Abreviatura	Х	Y	Z	R	Confi	guración
1a	m ⁷ Gppp₅G (D1)	S	0	0	Н	Sp	
1b	m ⁷ Gppp₅G (D2)	S	0	0	Н	$R_{ ho}$	
2a	m ⁷ Gpp₅pG (01)	0	S	0	Н		n.a.
2b	m ⁷ Gpp₅pG (D2)	0	S	0	Н		n.a.
3a	m ⁷ Gp₅ppG (D1)	0	0	S	Н		n.a.
3b	m ⁷ GpsppG (D2)		0	S	Н		n.a.
4a	m2 ^{7,2'-0} Gppp _s G (D1)	S	0	0	CH_3	S_{p}	
4b	m2 ^{7,2'-0} Gppp _s G (D2)	S	0	0	CH₃	$R_{ ho}$	
5a	m2 ^{7,2'-0} Gpp _s pG (D1)	0	S	0	CH₃		n.a.
5b	m2 ^{7,2'-0} Gpp _s pG (D2)	0	S	0	CH_3		n.a.
6a	m2 ^{7,2'-0} Gp _s ppG (D1)	0	0	S	CH_3		n.a.
6b	m₂ ^{7,2'-0} Gp₅ppG (D2)	0	0	S	CH_3		n.a.
n.a. * no asignado							

- 25 La síntesis química de S-ARCA fue una modificación de la desarrollada originalmente para análogos de caperuza con puentes de 5',5'-polifosfato sin modificar. Véanse M. Kadokura et al., "Efficient synthesis of γ-methyl-capped guanosine 5'-triphosphate as a 5'-terminal unique structure of U6 RNA via a new triphosphate bond formation involving activation of methyl phosphorimidazolidate using ZnCl2 as a catalyst in DMF under anhydrous conditions", Tetrahedron Lett., vol. 38, p. 8359-8362 (1997); J. Stepinski et al., "Synthesis and properties of mRNAs containing 20
- 30 the novel "anti-reverse" cap analogues 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG", RNA, vol. 7, p. 1486-1495 (2001), y J. Jemielity et al., "Novel "anti-reverse" cap analogues with superior translational properties", RNA, vol. 9, p. 1108-1122 (2003). Se acoplaron en DMF dos especies mononucleotídicas, una de las cuales se convierte primero en un derivado de imidazolida reactivo. La reacción se facilita mediante un exceso de 8 veces de ZnCl₂, que mejora significativamente la solubilidad de los agentes reaccionantes en medios orgánicos, evita la hidrólisis de los derivados de imidazolida, y acelera la velocidad de la reacción. Una etapa importante en la síntesis
- hidrólisis de los derivados de imidazolida, y acelera la velocidad de la reacción. Una etapa importante en la síntesis fue el acoplamiento de un derivado de imidazolida apropiado con un 5'-fosforotioato o 5'-(2-tiodifosfato) de nucleósido en DMF en presencia de ZnCl₂. Los 5'-(2-tiodifosfatos) de nucleósido intermedios se obtuvieron

eficientemente en una reacción similar, recientemente desarrollada, que utiliza el anión tiofosfato (PSO₃³⁻) como nucleófilo. Véase J. Kowalska et al., "A simple and rapid synthesis of nucleotide analogues containing a phosphorothioate moiety at the terminal position of the phosphate chain", Tetrahedron Lett., Vol. 48, 2007, 5475-5479. La estrategia de reacción que se ha desarrollado permite la introducción del resto de fosforotioato en posiciones seleccionadas de la cadena de polifosfato, así como la producción de 5'-(2-tiodifosfatos) de nucleósidos intermedios.

Como se muestra anteriormente y como se utiliza en las reivindicaciones, el resto de fosfato que se denomina "α" es el resto de fosfato más distante al resto de 7-metilguanosina. La posición denominada "β" es el fosfato siguiente en el sentido que se mueve hacia el resto de 7-metilguanosina. En los ARCA de trifosfato, como se muestra anteriormente, el "γ" es el fosfato más próximo al resto de 7-metilguanosina. En los ARCA de tetrafosfatos, el "γ" está separado del resto de 7-metilguanosina por el fosfato "δ". (En los ARCA con un resto de 7-metilguanosina, debe apreciarse que la definición anterior se debería modificar para referirse en su lugar al resto con la posición que es

La ruta sintética que conduce a los análogos 1 y 4 modificados en la posición α del puente de 5',5'-trifosfato (es *decir*, m⁷Gppp_sG y m₂^{7,2'-O}Gppp_sG) se representa en la figura 1. En ambas reacciones de acoplamiento final, se usó un exceso de 1,5 a 2 veces de fosforimidazolida para asegurar el consumo completo del 5'-tiofosfato de nucleósido.

- 20 El acoplamiento transcurrió ininterrumpidamente, conduciendo a un consumo casi completo del sustrato en 1-2 días. La síntesis de los análogos 3 y 6 modificados en la posición γ (es decir, m⁷Gp_sppG y m₂^{7,2-O}GpsppG), que se representa en la figura 2, fue similar a la descrita anteriormente. En cada caso, la formación de dos diastereómeros se indicó mediante RP HPLC como se muestra en la figura 2. Los 5'-tiofosfatos nucleosídicos 9, 10 y 11 intermedios se sintetizaron vía tiofosforilación de nucleósidos apropiados mediante PSCl₃ en fosfato de trimetilo en presencia de
- 25 2,6-dimetilpiridina a 0°C, similar a los procedimientos dados a conocer previamente (J.R. Moran et al., "A practical enzymatic synthesis of (Sp) adenosine 5'-O-(1-thiotriphosphate) ((Sp)-ATP-α-S)", J. Org. Chem., vol. 49, p. 704-706 (1984)). En el caso de los compuestos 10 y 11, la metilación en la posición N7 se tuvo que realizar en la etapa del nucleósido, antes de la etapa de tiofosforilación, debido a que de otro modo el yoduro de metilo alquila preferiblemente el átomo de azufre (hallazgos no publicados). La conversión de 5'-ditiofosfatos de nucleósido en sus
- 30 derivados de imidazolida (7, 8 y 12-15) se logró fácilmente vía la reacción con imidazol utilizando el sistema de activación de 2,2'-ditiodipiridina/trifenilfosfina (T. Mukaiyama et al., "Phosphorylation by oxidation-reduction condensation. Preparation of active phosphorylating reagents", Bull. Chem. Soc. Jpn., vol. 44, p. 2284 (1971)). Los análogos modificados en la posición β, es *decir*, m⁷Gpp_spG (2) y m₂ ^{7,2'O}Gpp_spG (5) se sintetizaron como se representa en la figura 3. El análisis mediante HPLC del acoplamiento final reveló la formación de 2 P-
- 35 diastereoisómeros. Šin embargo, sus tiempos de retención fueron muy similares. Para obtener los 5'-O-(2tiodifosfatos) de nucleósido intermedios 16 y 17, se utilizó una reacción de acoplamiento recientemente desarrollada entre una imidazolida de 5'-monofosfato de nucleósido y una sal trietilamónica de tiofosfato (PSO₃³⁻) como nucleófilo (J. Kowalska et al., "A simple and rapid synthesis of nucleotide analogues containing a phosphorothioate moiety at the terminal position of the phosphate chain", Tetrahedron Lett., Vol. 48, 2007, 5475-5479).
- 40

45

55

5

En todas las reacciones que conducen a los análogos de caperuza 1-6, el análisis mediante HPLC reveló que los compuestos deseados se formaron como productos principales, con cantidades sólo moderadas de subproductos. No obstante, los rendimientos preparativos fueron sorprendentemente menores que los indicados por HPLC, estando globalmente en el intervalo de 10-20%. Esto es probablemente debido a grandes pérdidas de material durante la separación prolongada de diastereoisómeros mediante RP HPLC, que en muchos casos se llevó a cabo repetidamente a fin de obtener muestras diastereoméricamente puras.

Ejemplo 18

50 Reacción de extracción de caperuza in vitro

Se ensayaron oligonucleótidos con caperuza con S-ARCA para la hidrólisis mediante hDcp2 recombinante para ensayar si ARNm con caperuza con los diversos diastereómeros de $m_2^{7,2-O}$ Gppp_sG y $m_2^{7,2-O}$ Gpp_spG diferiría en su sensibilidad a la escisión por Dcp1/Dcp2. Véanse generalmente Z. Wang et al., "The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme", Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 99, p. 12663-12668 (2002), y Z. Wang et al., "An mRNA Stability Complex Functions with Poly(A)-Binding Protein To Stabilize mRNA In Vitro", Mol. Cell Biol., vol. 19, p. 4552-4560 (1999). Los análogos de caperuza usados estaban inicialmente no marcados, de manera que para seguir los productos de la reacción de digestión se sintetizaron oligonucleótidos con caperuza en presencia de [α -³²P]GTP y un molde de ADN en el que G fue el primer ribonucleótido especificado tras el promotor. Los oligonucleótidos con caperuza con los S-ARCA se sometieron a digestión con Dcp2 *in vitro*, después de lo cual los

- 60 oligonucleótidos con caperuza con los S-ARCA se sometieron a digestión con Dcp2 *in vitro*, después de lo cual los productos se digirieron adicionalmente con un cóctel de ribonucleasas (RiboShredder de Epicenter). Cualquier nucleótido en el lado 5' de un resto G adquirió un grupo 3'-fosfato marcado con ³²P tras la digestión con ribonucleasas mediante transferencia del vecino más próximo. Entonces se usó la cromatografía de intercambio aniónico para resolver los monofosfatos de 3'-nucleósido marcados (3'-NMP*), en posiciones internas en el ARN,
- 65 procedentes de productos 5'-terminales marcados (figura 6). Estos últimos comprenden p₃Gp* derivado de

transcritos sin caperuza y m₂^{7,2'-O}Gp₃Gp* (cuando se usó m₂^{7,2'-O}Gp₃G), o pGp* que resulta de ARN con caperuza resistente o no resistente a la escisión enzimática, respectivamente. Todos los análogos de caperuza usados fueron ARCA, lo que aseguró que se incorporasen en ARN exclusivamente en la orientación correcta. Esto garantizó además que sólo un producto 5'-terminal (m₂^{7,2'-O}Gp₃Gp*) se observase con el tratamiento con ribonucleasas. El ARN sin caperuza no es un sustrato para Dcp2, lo que explica la observación del producto p₃Gp* tras la digestión con Dcp2.

Para determinar qué análogos de caperuza protegen a ARNm frente a la escisión por hDcp2, se digirió ARN corto marcado con ³²P con caperuza con hDcp2 recombinante utilizando unas condiciones en las que (i) el oligonucleótido con caperuza con m₂^{7,2'-O}Gp₃G fue digerido completamente por hDcp2 (Fig. 6A), y (ii) el oligonucleótido con caperuza con m₂^{7,3'-O}Gpp_{CH2}pG fue resistente (Fig. 6B). Se demostró previamente que m₂^{7,3'-O}Gpp_{CH2}pG protege a ARNm frente a la degradación por hDcp2. Véase E. Grudzien et al., "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs", J. Biol. Chem., vol. 281, p. 1857-1867 (2006). Se descubrió que sólo el isómero D2 de m₂^{7,2'-O}Gpp_spG estabilizó ARN frente a la hidrólisis por hDcp2 (Fig. 6F). Los oligonucleótidos con caperuza con los isómeros de m₂^{7,2'-O}Gpp_sG y m₂^{7,2'-O}Gp_spG no mostraron incremento en la estabilidad frente a hDcp2 (Figs. 6C, 6D, 6G, y 6H).

Ejemplo 19

5

20 Degradación en 5' de los ARNm con caperuza con análogos de caperuza de fosforotioato

Debido a que los ARN cortos con caperuza con m2^{7,2-O}GppspG (D2) fueron resistentes a la hidrólisis por hDcp2, se predijo que la presencia de este análogo de caperuza afectaría a la estabilidad del ARNm en las células. Se usó nucleoporación o electroporación para introducir ARNm de luciferasa sintético en células epiteliales mamarias de ratón HC11. Estos métodos permiten medir la síntesis de luciferasa y los niveles de ARNm de luciferasa en las células casi inmediatamente tras la descarga. Para la electroporación, se usaron condiciones optimizadas previamente. Véase E. Grudzien et al., "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs", J. Biol. Chem., vol. 281, p. 1857-1867 (2006). Para la nucleoporación, se siguieron condiciones recomendadas por Amaxa Biosystems (véase Materiales y Métodos). Puesto que el protocolo de Amaxa dio la mayor eficiencia de transfección y también la mayor viabilidad celular, se usó en la mayoría de los experimentos descritos en la presente memoria.

Los ARNm de luciferasa que contienen diversas caperuzas 5'-terminales y un tramo poly(A) de 60 nt 3'-terminal (Luc-A₆₀) se sintetizaron *in vitro*. Tras la nucleoporación, las células se eliminaron a intervalos de hasta 90 min. para medir la eficiencia traduccional, usando la velocidad de incremento de la actividad de luciferasa; o hasta 8 h para medir la estabilidad del ARNm de luciferasa mediante PCR en tiempo real. La determinación de la eficiencia traduccional y de la estabilidad del ARNm podría ser errónea si los ARNm recuperados de las células contienen ARNm tanto traducido como no traducido. Para abordar esta cuestión, se determinaron las velocidades de degradación para ARNm citoplásmico total *frente a* ARNm polisómico. El ARNm de luciferasa con caperuza con m₂^{7,2+O}Gp₃G se nucleoporó en células HC11, que entonces se lisaron a diversos tiempos y se depositaron sobre un gradiente de sacarosa para separar polisomas a partir de los complejos de iniciación. Las fracciones polisómicas se combinaron, y el ARN se purificó. Para seguir la degradación del ARNm citoplásmico, se usó ARNm aislado de extractos de células totales. El ARNm de luciferasa se cuantificó en ambos casos mediante PCR en tiempo real usando un par de cebadores dirigidos contra el extremo 5' de ARNm de luciferasa.

Los transcritos asociados con polisomas se degradaron a aproximadamente la misma velocidad que el ARNm citoplásmico total (datos no representados). Esto sugiere que incluso si existen conjuntos traducidos y no traducidos de ARNm de luciferasa a cualquier tiempo dado, el ARNm se intercambia libremente entre ellos. Esta observación valida las medidas de la eficiencia traduccional y de la velocidad de degradación.

50

Las estabilidades de Luc-A₆₀ con caperuza con diversos S-ARCA se determinaron tras la nucleoporación en células HC11. El ARNm restante en las células a diversos tiempos se determinó mediante PCR en tiempo real. Luc-A₆₀ con caperuza con m₂^{7,2'-O}Gpp_spG (D2) fue más estable (t½ = 257 min.) que el ARNm con caperuza con la caperuza natural, m⁷Gp₃G (t½ = 86 min.), o el compuesto progenitor, m₂^{7,2'-O}Gp₃G (t½ = 155 min.) (figura 7 y Tabla 2). Esto sugiere que el incremento en la estabilidad de los ARNm resultó de la resistencia a la hidrólisis por Dcp1/Dcp2. Ni m₂^{7,2'-O}Gpp_sG (D1) (t½ = 169 min.) ni m₂^{7,2'-O}Gpp_spG (D1) (t½ = 185 min.) confirieron estabilidad significativamente mayor que m₂^{7,2'-O}Gp₃G (t½ = 155 min.) (Tabla 2). Fue digno de atención el hecho de que la afinidad por elF4E tanto de m₂^{7,2'-O}Gpp_sG (D1) como de m₂^{7,2'-O}Gpp_spG (D1) fue 3 veces mayor que la de m₂^{7,2'-O}Gp₃G. Se podría haber esperado que los ARNm con caperuza con esos análogos serían más estables si la hipótesis sobre la competición pathways by novel cap analogs", J. Biol. Chem., vol. 281, p. 1857-1867 (2006). No se observaron incrementos en la estabilidad o en la eficiencia traduccional (ver a continuación) para los ARNm con caperuza con estos análogos. Esto puede indicar que, aunque m₂^{7,2'-O}Gpp₅G (D1) y m₂^{7,2'-O}Gpp₅PG (D1) se unen más fuertemente a elF4E, había un límite superior más allá del cual la afinidad elevada por elF4E no aceleró la traducción global. Según esta interpretación, cuando la velocidad de unión de la caperuza se hace suficientemente elevada, alguna otra etapa en la iniciación de la síntesis proteica se convierte en limitante de la velocidad.

Ejemplo 20

Eficiencia traduccional de los ARNm de luciferasa con caperuza con S-ARCA en células HC11

5 También se determinó la eficiencia traduccional en células cultivadas para ARNm de luciferasa con caperuza con S-ARCA. Esto implicó dos mediciones realizadas a diversos tiempos tras la nucleoporación - actividad de luciferasa mediala mediante luminometría en lisados celulares aclarados, y niveles de Luc-A₆₀ medialos mediante PCR en tiempo real. La actividad de luciferasa se normalizó mediante la cantidad de ARNm de luciferasa que se ha suministrado a las células. Para determinar la cantidad de ARN presente en las células en un momento 10 inmediatamente después de la nucleoporación, es decir, antes de que haya ocurrido cualquier decaimiento, las células se recogieron en diversos tiempos entre 2 a 8 h tras la nucleoporación, y se extrajo el ARN citoplásmico. La cantidad de ARNm de luciferasa se midió mediante PCR en tiempo real usando cebadores que amplifican secuencias cerca del extremo 5'. El ARNm de luciferasa restante en cada punto de tiempo se representó 15 gráficamente como log₁₀ ([RNA]) frente al tiempo, para determinar t₂. La curva se extrapoló a 0 h, y se calculó la cantidad de ARN suministrado a las células. Se definieron las condiciones en las que la acumulación de luciferasa fue lineal con el tiempo, después de un período de demora inicial de ~ 30 min. para el reclutamiento de ARNm a los ribosomas, completando la primera cadena polipeptídica, y la liberación de luciferasa en el citosol.

20 Un ARNm de Luc-A₆₀ con caperuza con m₂^{7,2'-O}Gpp_spG (D1) y m₂^{7,2'-O}Gpp_spG (D2) se tradujo 2,8 y 5,1 veces más eficientemente que ARNm con caperuza con m⁷Gp₃G, respectivamente (figura 8 y Tabla 2). Para la traducción libre de células en el sistema de lisado de reticulocito de conejo, los ARNm de Luc-A₆₀ con caperuza con m₂^{7,2'-O}Gpp_spG (D1) y m₂^{7,2'-O}Gpp_spG (D2) se tradujeron sólo 2,3 veces más eficientemente que ARNm de Luc-A₆₀ con caperuza con m⁷Gp₃G (datos no mostrado). Esta diferencia sugirió que el incremento en la eficiencia traduccional en células cultivadas estaba relacionada con una mayor estabilidad del ARNm (que no es un factor para los sistemas de traducción libres de células), puesto que sólo el ARNm con caperuza con análogos resistentes a hDcp2 se tradujeron más eficientemente.

Tabla 2

30

Eficiencia traduccional y estabilidad de los ARNm de luciferasa con análogos de caperuza de fosforotioato en células HC11

N٥	Tipo de Caperuza en ARNm de Luc-A ₆₀	Caperuza - eIF4E K _{AS} [M ⁻⁶] ^a	Susceptibilidad a Dcp2 ^b	Semivida de ARNm (min) ^c	Eficiencia traduccional relativa ^d
1	m′Gp₃G	$9,4 \pm 0,8$	ND	86 ± 1*	1,00
2	m ₂ ^{7,2'-0} Gp ₃ G	$10,8 \pm 0,3$	100	155 ±9	$2,1 \pm 0,2$
3	m2 ^{7,2'-0} Gppp _s G (D1)	34,3 ± 1,3	96	169 ± 19	$2,5 \pm 0,8$
4	m2 ^{7,2'-0} Gppp _s G (D2)	$12,9 \pm 0,9$	98	164 ± 1	$1,8 \pm 0,4$
5	m2 ^{7,2'-0} Gpp _s pG (D1)	42,1 ± 1,6	71	185 ± 22	$2,8 \pm 0,3$
6	m2 ^{7,2'-0} Gpp _s pG (D2)	18,3 ± 3,4	6	257 ± 4*	$5,1 \pm 0,5$
7	m2 ^{7,2'-0} Gp _s ppG (D1)	19,3 ± 1,8	84	149 ± 9	$2,0 \pm 0,1$
8	m2 ^{7,2'-0} Gp _s ppG (D2)	$15,4 \pm 0,5$	91	139 ± 6	$1,9 \pm 0,1$

^a Constantes de asociación en el equilibrio para la interacción de elF4E de ratón (aminoácidos 28-217) con diversos análogos de caperuza a 20°C. Se expresó elF4E de ratón (restos 28-217) en *E. coli*, y se llevaron a cabo valoraciones de la fluorescencia sincronizada en el tiempo, como se describe en J. Zuberek et al., "Phosphorylation of elF4E attenuates its interaction with mRNA cap analogs by electrostatic repusion: Intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein", RNA, vol. 9, p. 52-61 (2003) y A. Niedzwiecka et al., "Biophysical studies of elF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of elF4G and 4E-BP1 proteins", J. Mol. Biol., vol. 319, p. 615-635 (2002).

^b Los datos de la Figura 4 se usaron para estimar la susceptibilidad de oligonucleótidos con caperuza con diversos análogos a la hidrólisis por hDcp2. Las radioactividades en los picos que eluyen a 44 min. (caperuza sin digerir) y 38 min. (pGp*) se corrigieron para la radioactividad de fondo, y se suman para representar la radioactividad total en la caperuza. La susceptibilidad a Dcp2 se da mediante la radioactividad en pGp* expresada como porcentaje del total. (ND) No determinado.

^c La degradación de las secuencias 5'-terminales en los ARNm de Luc-A₆₀ con caperuza con los análogos indicados se determinó mediante PCR en tiempo real con cebadores dirigidos contra el extremo 5' de los ARNm de luciferasa. ^d Se muestra la eficiencia traduccional de los ARNm de Luc-A₆₀ con caperuza con análogos de caperuza indicados

^o Se muestra la eficiencia traduccional de los ARNm de Luc-A₆₀ con caperuza con análogos de caperuza indicados en células HC11. La actividad de luciferasa se normalizó mediante la cantidad de ARN de luciferasa en las células. La eficiencia traduccional relativa se calculó como se describe por J. Jemielity et al., "Novel "anti-reverse" cap analogues with superior translational properties" RNA, vol. 9, p. 1108-1122 (2003).

* Se indican las semividas que son significativamente diferentes (p < 0,05) de aquella del ARNm con caperuza con $m_2^{7,2-O}Gp_3G$.

Ejemplo 21

El ARNm de luciferasa con caperuza con S-ARCAs fue reclutado más eficientemente a polisomas en células HC11

5 Se usó un método independiente para validar la observación de que los ARNm con caperuza con m2^{7,2'-O}GppspG se tradujeron más eficientemente, a saber, su distribución polisómica (figuras 9A - 9E). Un incremento en la velocidad de iniciación con respecto al alargamiento o terminación da como resultado un desplazamiento del ARNm desde liposomas más ligeros hacia liposomas más pesados. Véase H. Lodish, "Model for the regulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis", Nature, vol. 251, p. 385-388 (1974). No se espera que el tipo de estructura de caperuza afecte a la velocidad del alargamiento. De este modo, un desplazamiento hacia liposomas más grandes indica una iniciación más rápida.

El ARNm de Luc- A_{60} con caperuza con m⁷Gp₃G, m₂^{7,2-O}Gp₃G o m₂^{7,2-O}Gpp_spG (D2) se electroporó en células HC11. Estas células se depositaron 4 h tras la electroporación, y los sobrenadades aclarados se depositaron sobre un gradiente

- 15 de sacarosa para separar polisomas a partir de complejos de iniciación. El ARNm de luciferasa estaba predominantemente presente en polisomas (figuras 9A y 9B, *fracción 6-11*), aunque también existió algo en la región de los complejos de iniciación (*fracción 3-5*). Había poco ARNm de luciferasa en el conjunto de complejos de ribonucleoproteínas mensajeras no traducidas (RNPm) (Figs. 9A y 9B, *fracción 1-2*). El ARNm con caperuza con un ARCA estándar, m₂^{7,2-O}Gp₃G, se desplazó hacia polisomas más grandes (figura 9C). Sin embargo, el ARNm con caperuza con m₂^{7,2-O}Gpp₉pG (D2) se desplazó a polisomas incluso más grandes, y se perdió simultáneamente de la
- 20 caperuza con m₂^{7,2-O}Gpp_spG (D2) se desplazó a polisomas incluso más grandes, y se perdió simultáneamente de la región de RNPm (figura 9D). En las mismas condiciones experimentales, ARNm de GAPDH endógeno se tradujo eficientemente (figura 9E), aunque también sedimentó algo en la región de los complejos de iniciación. En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de m₂^{7/2-O}Gpp_spG (D2) en el extremo 5' de transcritos de luciferasa incrementó su velocidad de iniciación, confirmando los resultados basados en la acumulación de actividad de 25 luciferasa.

30

Ejemplo 22

La combinación de mayor estabilidad y mayor eficiencia traduccional de ARNm de luciferasa con S-ARCA produce una expresión proteica más global en células HC11

También se determinó la acumulación global de luciferasa, según se mide mediante su actividad enzimática, como una función del tiempo para los ARNm con caperuza con m₂^{7,2-0}Gp₃G, m₂^{7,2-0}Gpp_spG (D1), y m₂^{7,2-0}Gpp_spG (D2). Se nucleoporaron células HC11 y después se lisaron en varios momentos hasta 10 h. La actividad de luciferasa

- 35 medida en el sobrenadante se normalizó para la cantidad de Luc-A₆₀ suministrada a las células. Como se muestra en la figura 10, la actividad de luciferasa en las células HC11 alcanzó un máximo a 3 h, y después disminuyó 10 veces a lo largo de 10 h. Las cinéticas de expresión fueron consistentes con la semivida de la proteína luciferasa, que es de aproximadamente 180 min. (véase J. Thompson et al., "Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation", Gene, vol. 103, p. 171-177 (1991)), y la semivida de los diversos ARNm de luciferasa,
- 40 que son 155, 185, y 257 min., respectivamente. La mayor luciferasa se acumuló para Luc-A₆₀ con caperuza con m₂^{7,2-O}Gpp_spG (D2), que tuvo tanto la mayor eficiencia traduccional como la mayor estabilidad. Se predice que el incremento en la expresión proteica global a partir de los ARNm con caperuza con este análogo es incluso mayor para proteínas con semividas más largas.

45 Ejemplo 23

Afinidades de unión para eIF4E

Los valores de K_{AS} y las energías libres de unión (∆G⁰) de los S-análogos se presentan en la Tabla 3, junto con los mismos datos para sus compuestos progenitores no modificados. Sorprendentemente, no sólo la presencia del resto de fosforotioato no reduce la afinidad de unión por elF4E, sino que en algunos casos, la afinidad aumenta significativamente. Los valores de K_{AS} dependen fuertemente tanto de la posición de la modificación de fosforotioato como de la configuración absoluta alrededor del centro P asimétrico. De forma interesante, en cada par de diastereómeros, el miembro D1 se une a elF4E con una afinidad que es 2,3 a 4,5 veces mayor que el miembro D2 o

diastereómeros, el miembro D1 se une a elF4E con una afinidad que es 2,3 a 4,5 veces mayor que el miembro D2 o el análogo progenitor. Por ejemplo, K_{AS} para el isómero D1 de $m_2^{7,2-0}$ GpspG es 3 veces mayor que para D2 o $m_2^{7,2-0}$ GpppG. De forma similar, K_{AS} para el isómero D1 de $m_2^{7,2-0}$ GppspG, es 2 veces mayor que para D2, y 4,5 veces mayor que para $m_2^{7,2-0}$ GpppG. Las mayores diferencias en las afinidades de unión entre los diastereómeros D1/D2 se observaron para los análogos γ -modificados. Por otro lado, las mayores diferencias entre los pares modificados y no modificados se observaron para análogos β -sustituidos.

	Análogo de capucha	<i>K</i> _{AS} μM ⁻¹	∆G° Kcal/mol
	m′GpppG	$9,4 \pm 0,4$	-9,35 ± 0,02
1a	m ⁷ Gppp₅G (D1)	23,6 ± 0,8	-9,88 ± 0,02
1b	m ⁷ GpppsG (D2)	13,1 ± 0,8	$-9,54 \pm 0,03$
2a	m ⁷ Gpp₅pG (D1)	45,0 ± 1,1	-10,26 ± 0,01
2b	m ⁷ Gpp₅pG (D2)	$23,0 \pm 0,4$	-9,87 ±
3a	m ⁷ Gp _s ppG (D1)	$30,8 \pm 0,5$	-10,04 ±
3b	m ⁷ Gp₅ppG (D2)	$10,0 \pm 0,2$	$-9,39 \pm 0,01$
	m ^{7,2-0} GpppG	$10,8 \pm 0,3$	-9,43 ±
4a	m ^{7,2-0} Gppp₅G (D1)	19,2 ± 0,8	-9,76 ±
4b	m ^{7,2'-0} Gppp _s G (D2)	$15,0 \pm 0,6$	-9,62 ±
5a	m ^{7,2-0} Gpp _s pG (D1)	43,1 ± 1,4	-10,23 ± 0,02
5b	m ^{7,2-0} Gpp _s pG (D2)	19,3 ± 2,2	-9,77 ±
6a	m ^{7,2'-0} Gp₅ppG (D1)	35,2 ± 1,1	-10,12 ±
6b	m ^{7,2-0} Gp₅ppG (D2)	$12,9 \pm 0,4$	-9,53 ±
	m ^{7,2-0} GppppG	$99,8 \pm 6,0$	

Tabla 3. Constantos do asociación on ol oquilibrio (K.a) y onorgías libros do unión (AG9) para la unión do olE4E murina (28

Ejemplo 24 5

Susceptibilidad a hidrólisis enzimática por DcpS humana y de C. elegans.

La nueva serie de S-análogos se sometió a hidrólisis enzimática in vitro catalizada por DcpS procedente tanto de 10 fuentes humanas como de C. elegans. En todos los experimentos, el análogo de caperuza no modificado correspondiente se usó como un control positivo, es decir, m⁷GpppG para S-análogos que no son ARCA y m₂^{7,2} $^{
m O}$ GpppG para S-ARCA. La cantidad de enzima DcpS se optimizó para proporcionar la degradación completa del sustrato de control en 40-90 min. Las muestras recogidas a partir de mezclas de reacción a diversos intervalos de tiempo se analizaron mediante RP HPLC (como se describe en Materiales y Métodos).

15

En la Tabla 4, los análogos de caperuza, a una concentración de 4 µM, se sometieron a digestión enzimática mediante DcpS en condiciones que conduzcan a la degradación completa del compuesto progenitor no modificado (*es decir*, m⁷GpppG para S-análogos que no son ARCA y m₂^{7,2-0}GpppG para S-ARCAs) en 40-90 min. Las muestras recogidas a partir de las mezclas de reacción a diversos intervalos de tiempo se analizaron mediante RP HPLC con

- detección mediante UV a 260 nm, como se describe en Materiales y Métodos. En la Tabla 4, los análogos asignados 20 como resistentes permanecieron completamente sin digerir en las condiciones aplicadas, mientras que los análogos asignados como hidrolizados fueron hidrolizados por DcpS con una eficiencia comparable al compuesto progenitor no modificado respectivo. Se descubrió que los S-análogos modificados en la posición γ son resistentes a la hidrólisis, independientemente de la configuración absoluta del centro P (Tabla 4). El resultado no cambió incluso si
- el tiempo de reacción se prolongó hasta 24 h, se usaron diversas cantidades de enzima, y se modificó la 25 composición del tampón de reacción. Todos los otros S-análogos fueron hidrolizados por hDcpS con eficiencias comparables al análogo progenitor no modificado. No se observaron diferencias significativas para la hidrólisis de Sanálogos mediante DcpS procedente de fuentes humana y de C. elegans.
- 30 El análisis de los productos de la degradación por DcpS de los análogos modificados en la posición a nos permitió determinar su configuración absoluta alrededor de los centros P asimétricos. Se descubrió que la hidrólisis de $m^{7}Gppp_{s}G$ (D1) o $m^{7}Gppp_{s}G$ (D2) por DcpS conduce a $m^{7}GMP$ y al isómero D1 o D2 de 5'-O-(1-tiodifosfato) de guanosina (GDP α S), mientras que la hidrólisis de $m_{2}^{7,2'-O}Gppp_{s}G$ (D1) o $m_{2}^{7,2'-O}Gppp_{s}G$ (D2) conduce a $m_{2}^{7,2'-O}GMP$ y al isómero D1 o D2 de GDPaS (datos no representados).

	Resistencia a la hidrólisis enzimática por DcpS (humana y de <i>C. elegans</i>)										
	Análogo de capucha Análogo de capucha										
	m ⁷ GpppG	hidrolizado		m ₂ ^{7,2-0} GpppG	hidrolizado						
1a	m ⁷ Gppp₅G (D1)	hidrolizado	4a	m₂ ^{7,2′0} Gppp₅G (D1)	hidrolizado						
1b	m ⁷ Gppp₅G (D2)	hidrolizado	4b	m2 ^{7,2'0} Gppp _s G (D2)	hidrolizado						
2a	m ⁷ Gpp₅pG (D1)	hidrolizado	5a	m₂ ^{7,2′0} Gpp₅pG (D1)	hidrolizado						
2b	m ⁷ Gpp₅pG (D2)	hidrolizado	5b	m2 ^{7,2'0} Gpp _s pG (D2)	hidrolizado						
3a	m ⁷ Gp₅ppG (D1)	resistente	6a	m₂ ^{7,2′0} Gp₅ppG (D1)	resistente						
3b	m ⁷ Gp _s ppG (D2)	resistente	6b	m2 ^{7,2'0} Gp _s ppG (D2)	resistente						

Tabla 4 Susceptibilidad de los S-análogos a la hidrólisis enzimática por DcpS (procedente de ser humano y de C. elegans) in vitro.

5 Ejemplo 25

Análogos de caperuza como inhibidores de la traducción dependiente de la caperuza

La capacidad de los nuevos S-análogos para inhibir la traducción dependiente de la caperuza se evaluó en un sistema de lisado de reticulocito de conejo programado con ARNm de globina de conejo natural. De los 12 S-análogos, se seleccionaron dos que se modificaron en la posición γ, m⁷Gp_sppG (D1) y m⁷Gp_sppG (D2), puesto que se encontró que son resistentes frente a DcpS, y puesto que son potencialmente más estables *in vivo*. Los datos para la inhibición de la traducción se ajustaron con una curva teórica que describe la traducción dependiente de la caperuza como una función de un inhibidor competitivo de la unión de ARNm (Cai et al. 1999). Esto nos permitió determinar *K*₁, la concentración del análogo de caperuza a la que la traducción dependiente de la caperuza es inhibida en un 50% (Tabla 5). Se descubrió que ambos S-análogos son mejores inhibidores de la traducción dependiente de la caperuza que m⁷GpppG, lo que constituye pruebas adicionales de que el resto de fosforotioato estabiliza generalmente la interacción caperuza-eIF4E. Además, m⁷Gp_sppG (D1) fue significativamente más inhibidor que su contraparte D2 (*K*₁ = 4,1 ± 0,2 μM frente a *K*₁ = 12,1 ± 3,2 μM), lo que está de acuerdo con su mayor

20 afinidad de unión por elF4E ($K_{AS} = 30.8 \pm 0.5$ frente a $K_{AS} = 10.0 \pm 0.2$).

25	Constantes inhibidoras (K) p modificados en	ara la inhibición de la traducción dependiente o en un sistema de traducción de lisado de retio	de la caperuza por S-análogos culocito de conejo.	
		Análogo de capucha	<i>K</i> 1 μΜ ⁻¹	
		m ⁷ GpppG	17,1 ± 2,5	
	3a	m ⁷ Gp₅ppG (D1)	$4,1 \pm 0,2$	

Tabla 5

Ejemplo 26

3b

Fragmentos de ARNm con caperuza con S-ARCA como inhibidores *in vivo* de la traducción dependiente de la 30 caperuza

m[']Gp_sppG (D2)

 $12,1 \pm 3,2$

Una aplicación futura de los S-ARCA, especialmente los trifosfatos en los que la modificación de fosforotioato se produce en la posición γ (gamma), tales como los compuestos 6a y 6b en el Ejemplo 17, sería como inhibidores de la traducción dependiente de la caperuza. Está bien documentado que la traducción dependiente de la caperuza está

- 35 aumentada en células cancerosas, y que la disminución de elF4E invierte el fenotipo maligno. Los fragmentos que resultan de la degradación 3' \rightarrow 5' de los ARNm con caperuza deben ser desprovistos de caperuza cuando alcanzan una longitud menor que 25 nt antes de que pueda ocurrir la degradación completa a nucleótidos. Se espera que tales fragmentos con caperuza con S-ARCAs de trifosfato que contienen la modificación de fosforotioato en la posición γ (gamma) sean resistentes a DcpS, similar a lo que se mostró para los propios dinucleótidos de
- 40 caperuza (Tabla 4, anterior). Por lo tanto, se espera que se acumulen en la célula y compitan con los ARNm normales por el reclutamiento a la maquinaria traduccional. Se introducirán los ARNm o fragmentos de ARNm con caperuza con S-ARCA de trifosfato sustituidos en la posición γ (compuestos 6a y 6b en el Ejemplo 17) en células cultivadas. Entonces se medirá la traducción dependiente de la caperuza frente a la traducción independiente de la caperuza, usando constructos informadores. Es de esperar que la primera esté preferentemente inhibida. Se debería
- 45 señalar que la modificación con ARCA es necesaria para la orientación correcta de estos S-ARCAs en la

incorporación en el ARNm, puesto que de otro modo el resto de fosforotioato no estaría en la posición correcta para hacer al fragmento de ARNm resistente a DcpS.

En una materia similar, se analizan los S-ARCA de tetrafosfato como inhibidores potenciales de la traducción
 dependiente de la caperuza. Se espera que los S-ARCA de tetrafosfato, especialmente los que contienen un grupo δ-fosforotioato, no serán hidrolizados por DcpS en condiciones fisiológicas, e inhibirán la traducción dependiente de la caperuza.

Ejemplo 27

10

Las reivindicaciones especifican todas las combinaciones de modificación de fosforotioato de dinucleótidos de análogos de caperuza de trifosfato y de tetrafosfato, similares a los enumerados a continuación. Una modificación del resto de ribosa de m⁷Guo es 2'-desoxi, 3'-desoxi, arabinosa, 2'-O-etilo, y 3'-O-etilo. Una modificación de los sustituyentes de G en 7 es metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo, bencilo sustituido, naftilmetilo, naftilmetilo sustituido, y otros grupos alifáticos o aromáticos de C1 a C10 sustituidos o no sustituidos. Una modificación del resto de guanina es usar adenina, uridina, citosina, o m⁷G. Estas diversas modificaciones se pueden sintetizar como se describe en la presente solicitud y se pueden adaptar a partir de métodos de otro modo conocidos en la técnica, por ejemplo la publicación de solicitud de patente US 2003/0194759.

n	Compuesto	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	m₂ ^{7,R} Gp₅ppG	S	0	0	-
1	m₂ ^{⁊,R} Gpp₅pG	0	S	0	-
1	m₂ ^{7,R} Gp₅ppG	0	0	S	-
1	m ^{27,R} Gp _s pp _s G	S	0	S	-
1	m ₂ ^{7,R} Gpp _s p _s G	S	S	0	-
1	m ^{27,R} Gp _s pp _s G	0	S	S	-
1	m ₂ ^{7,R} Gp _s p _s p _s G	S	S	S	-
2	m ₂ ^{7,R} Gp _s pppG	S	0	0	0
2	m₂ ^{7,R} Gp₅pppG	0	S	0	0
2	m ₂ ^{7,R} Gp _s pppG	0	0	S	0
2	m ^{2^{7,R}Gp_spppG}	0	0	0	S
2	m ₂ ^{7,R} Gp _s p _s ppG	S	S	0	0
2	m ₂ ^{7,R} Gp _s pp _s pG	S	0	S	0
2	m₂ ^{7,R} Gp₅ppp₅G	S	0	0	S
2	m ₂ ^{7,R} Gpp _s p _s PG	0	S	S	0
2	m₂ ^{7,R} Gpp₅pp₅G	0	S	0	S
2	m₂ ^{7,R} Gppp₅p₅G	0	0	S	S
2	m ₂ ^{7,R} Gp _s p _s p _s pG	S	S	S	0
2	m ₂ ^{7,R} Gp _s p _s pp _s G	S	S	0	S
2	m ₂ ^{7,R} Gp _s pp _s p _s G	S	0	S	S
2	m ₂ ^{7,R} Gpp _s p _s p _s G	0	S	S	S
2	m2 ^{7,R} GpspspspsG	S	S	S	S

20

40

Las siguientes publicaciones son del trabajo de los propios inventores, que no resulta técnica anterior para la presente solicitud: 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, p. 1119-1131 (2008); E. Grudzien-Nogalska et al., "Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and

25 increase translational efficiency in mammalian cells", RNA, vol. 13, p. 1745-1755 (2007); y E. Darzynkiewicz et al., "Methylene and phosphorothioate cap dinucleotides: useful tools to study decapping and translantion", un resumen y póster presentado en el RNA Meeting, Seattle, Washington, 20-25 de junio de 2006. En el caso de un conflicto de otro modo irreconciliable, sin embargo, debería prevalecer la presente memoria descriptiva.

30 Listado de secuencias

<110> Board of supervisors of Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College Jemielity, jacek Grudzien-Nogalska, Ewa M.

35 Kowalska, Joanna

Darzynkiewicz, Edward Rhoads, Robert E.

<120> Síntesis y uso de análogos de fosforotioato antiinversos de la caperuza de ARN mensajero

<130> Jemielity 07S01W

<140> PCT/US2008/ _____

	<141> 2008-06-19		
F	<150> 60/944,842 <151> 2007-06-19		
5	<160>4		
	<170> PatentIn version 3.3		
10	<210> 1 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Cebador sintético. <400> 1 cgttcggttg gcagaagcta	20	
20	<210>2 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> cebador sintético. <400> 2 actgttgagc aattcacgtt catt		24
30	<210>3 <211>21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético. <400> 3		
35	caatgtgtcc gtcgtggatc t	21	
40	<210>4 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético. <400> 4 gaagagtggg agttgctgtt ga		22

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que presenta una de las estructuras siguientes:





10

25

У

5



en las que:

15 cada Y se selecciona de entre el grupo que consiste en O y S; los diversos Y pueden ser iguales o diferentes; y por lo menos un Y es S;

R1 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, OH, OCH₃, y OCH₂CH₃;

20 R2 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, OH, OCH₃, y OCH₂CH₃;

n es 3 o 4;

si R1 es OH, entonces R2 no es OH;

B se selecciona de entre el grupo que consiste en guanina, adenina, uridina, citosina; y

X se selecciona de entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo, bencilo sustituido, naftilmetilo, naftilmetilo sustituido, y otros grupos alifáticos o aromáticos de C1 a C10 sustituidos y no sustituidos; los diversos X pueden ser iguales o diferentes.

5

2. Compuesto según la reivindicación 1, que presenta la estructura



10 3. Compuesto según la reivindicación 1, que presenta la estructura



en la que B se selecciona de entre el grupo que consiste en

15



4. Compuesto según la reivindicación 1, que presenta la estructura



5. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de entre el grupo que consiste en $m_2^{7,2}$ Gpp_spG; $m_2^{7,3}$ Gpp_spG; $m_2^{7,2}$ Gpp_sp_spG; $m_2^{7,2}$ Gpp_sp_spG; $m_2^{7,2}$ Gpp_sp_sp_sG; $m_2^{7,2}$ Gpp_sp_sP_sG; m

6. Compuesto según cualquiera o más de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto consiste esencialmente en un único estereoisómero.

- 10 7. Compuesto según cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto es una mezcla de al menos dos diastereómeros, un primer diastereómero y un segundo diastereómero; en el que dichos primer y segundo diastereómeros son por lo demás idénticos, a excepción de que dichos primer y segundo diastereómeros presentan unas diferentes configuraciones estereoquímicas en un átomo de fósforo quiral; en el que dicho átomo de fósforo quiral es un átomo de fósforo que está unido a un átomo de azufre.
- 15

5

8. Molécula de ARN cuyo extremo 5' incorpora un compuesto según cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 5.

9. Método para sintetizar una molécula de ARN según la reivindicación 8 *in vitro*; comprendiendo dicho método hacer reaccionar ATP, CTP, UTP, GTP, un compuesto como se ha mencionado, y un molde polinucleotídico, en presencia de una ARN polimerasa, en condiciones que conduzcan a la transcripción por la ARN polimerasa del molde polinucleotídico en una copia de ARN; incorporando así algunas de las copias de ARN el compuesto como se ha mencionado.

- 10. Método para sintetizar una proteína o péptido *in vitro*, comprendiendo dicho método traducir una molécula de
 ARN según la reivindicación 8 en un sistema de síntesis proteica libre de células, en el que la molécula de ARN comprende un marco abierto de lectura, en condiciones que conduzcan a traducir el marco abierto de lectura de la molécula de ARN en la proteína o péptido codificados por el marco abierto de lectura.
- 11. Método para sintetizar una proteína o péptido *in vivo*, comprendiendo dicho método introducir una molécula de 30 ARN según la reivindicación 8 en células, en el que la molécula de ARN comprende un marco abierto de lectura, en condiciones que conduzcan a traducir el marco abierto de lectura de la molécula de ARN en la proteína o péptido codificados por el marco abierto de lectura.
- 12. Compuesto según cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que n es 3 y dicho compuesto contiene
 un grupo β-fosforotioato, o en el que n es 4 y dicho compuesto contiene un grupo γ-fosforotioato; y en el que dicho compuesto no es hidrolizado por Dcp2 en condiciones fisiológicas.

13. Compuesto según cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que n es 3 y dicho compuesto contiene un grupo γ-fosforotioato; o en el que n es 4 y dicho compuesto contiene un grupo δ-fosforotioato; y en el que dicho compuesto no es hidrolizado por DcpS en condiciones fisiológicas, y dicho compuesto inhibe la traducción dependiente de la caperuza.

14. Método para sintetizar una proteína o péptido *in vivo*, comprendiendo dicho método introducir en células una molécula de ARN cuyo extremo 5' incorpora un compuesto según la reivindicación 12, en el que la molécula de ARN comprende un marco abierto de lectura, en condiciones que conduzcan a traducir el marco abierto de lectura de la molécula de ARN en la proteína o péptido codificados por el marco abierto de lectura; en el que la velocidad de traducción *in vivo* que se obtendría a partir de un método por lo demás idéntico en el que cada Y es un átomo de oxígeno, y en el que ningún Y es un átomo de azufre.



Fig. 1



Fig. 2

•



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

ES 2 500 515 T3



ES 2 500 515 T3



Fig. 7



Fig. 8

ES 2 500 515 T3





Fig. 10