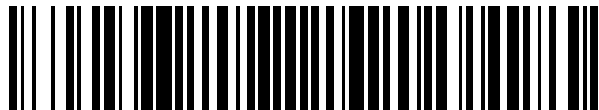


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 002**

51 Int. Cl.:

C07H 1/04 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2012 PCT/EP2012/055520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12130886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012 E 12710950 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2691410**

54 Título: **Purificación de oligonucleótidos trifosforilados empleando marcadores de captura**

30 Prioridad:

28.03.2011 EP 11160032

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

**RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN (100.0%)
Regina-Pacis-Weg 3
53113 Bonn, DE**

72 Inventor/es:

**LUDWIG, JANOS;
GOLDECK, MARION y
SPROAT, BRIAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 623 002 T3

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

DESCRIPCIÓN

Purificación de oligonucleótidos trifosforilados empleando marcadores de captura

La presente invención se refiere a un método para preparar oligonucleótidos trifosfato modificados empleando un marcador de captura, como se define en las reivindicaciones. El método permite la síntesis y la purificación de oligonucleótidos trifosfato modificados en un rendimiento alto y pureza adecuada para aplicaciones farmacéuticas.

Antecedentes de la invención

Schlee et al., *Immunity*, 2009, 31, 25-34 describe ARNs bicatenarios de punta roma que transportan un resto 5'-O-trifosfato en una de las hebras que actúan como potentes estimuladores del sistema inmune mediante unión a la helicasa RIG-I. Por tanto, existe la necesidad de proporcionar un método simple y eficaz para preparar oligonucleótidos trifosfato modificados de alta pureza, adecuados para aplicaciones farmacéuticas.

El acoplamiento de los grupos trifosfato o análogos de los mismos al grupo 5'-OH de los compuestos nucleosídicos es bien conocido en la técnica. Ludwing J. et al., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-635 divulga un método de trifosforilación de la disolución para preparar 5'-O-trifosfatos de nucleósidos y análogos utilizando 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona como el agente de fosforilación. Gaur R.K. et al., 1992, *Tetrahedron Letters*, 33, 3301-3304 describe la utilización de dicho método en una fase sólida para la síntesis del 2'-O-metilribonucleósido 5'-O-trifosfatos y sus análogos P α -thio. La Patente de EE.UU 6.900.308 B2 divulga la síntesis en fase sólida de 5'-O-trifosfatos de nucleósido modificado como potenciales compuestos antivirales y las Patentes de EE.UU 7.285.658, 7.598.230 y, 7.807.653 divulgan trifosfatos análogos de nucleósidos, con modificaciones en el azúcar, nucleobase y en la identidad trifosfato.

WO96/40159 describe un método para producir moléculas de ARN seleccionadas o análogas de ARN, en donde un ARN u oligonucleótido análogo de ARN, se hace reaccionar con un agente fosforilante tal como 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona o un derivado sustituido del anillo del mismo. El intermedio resultante se hace reaccionar con un fosfato o pirofosfato o sal del mismo, oxidado o hidrolizado. El ARN di- o trifosforilado o análogo de ARN, se selecciona haciéndolo reaccionar con un m⁷G tri-, di- o monofosfato o análogo.

WO 2009/060281 describe análogos de oligoribonucleótidos estimuladores del sistema inmune que contienen fracciones de oligofosfato modificados y métodos para la preparación de tales compuestos. Este método incluye la síntesis del oligonucleótido en un soporte sólido, haciendo reaccionar un nucleótido en un extremo 5' del oligonucleótido con un agente fosforilante, tal como 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona en un disolvente adecuado y en presencia de una base, haciendo reaccionar el oligonucleótido fosforilado con un pirofosfato o análogo de pirofosfato, oxidando el oligonucleótido con un agente oxidante y desprotegiendo el oligonucleótido para proporcionar un trifosfato o un oligonucleótido modificado análogo de trifosfato.

El gel de electroforesis de poliacrilamida como se emplea en la Patente WO 96/40159 es aplicable sólo para separaciones a pequeña escala. El poder de resolución de la cromatografía de intercambio iónico para productos 5'-mono-, di-, trifosforilados de oligoribonucleótidos más largos es limitado. Las condiciones de desnaturalización requeridas hacen de la separación un proceso tedioso (Sproat, 1999; Zlatev et al., *Organic Letters*, 2010, vol. 12(10), 2190-2193; WO 2009/060281), por otra parte, los productos se contaminan normalmente con secuencias n-1, n-2 y sus mono- y difosfatos, dando como resultado una pureza insuficiente. Dada la sensibilidad para estructuras terminales precisas de los ligandos RIG-I, estos métodos de purificación son subóptimos para aplicaciones farmacológicas.

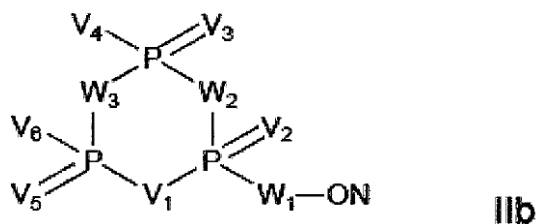
Las estrategias de etiquetado duales (siARN y ligando RIG) requieren métodos de purificación de secuencias generales independientes.

Compendio de la invención

La invención se define en el apéndice de las reivindicaciones.

Es altamente deseable producir a gran escala oligonucleótidos 5'-O-trifosforilados y sus análogos para uso clínico potencial, y un método de preparación conveniente sería altamente deseable. En la presente solicitud se muestra que el intermedio 5'-O-ciclotrifosfato de una fase sólida que se une completamente al oligonucleótido protegido (véase la Figura 1) puede ser un anillo abierto con un marcador de captura, por ejemplo decilamida, para proporcionar especies marcadas Py lineales que son estables para la desprotección del ARN. La naturaleza del marcador es tal como para impartir una retención específica de las especies trifosfato con marcadores de captura para un reactivo de marcaje de captura específico, facilitando una fácil separación de las impurezas que no contienen el marcador. El marcador se puede eliminar posteriormente si se desea. El método se puede extender para abarcar análogos del resto trifosfato, por ejemplo, análogos que contienen por ejemplo β,γ -metileno, fluorometileno, difluorometileno, y grupos imino que reemplazan un átomo de oxígeno.

en donde $V_1, V_3, V_5, V_4, V_6, W_1, W_2, W_3$, y ON son como se definió anteriormente, con un agente oxidante para obtener un compuesto de fórmula (IIb)



en donde $V_1, V_3, V_5, V_2, V_4, V_6, W_1, W_2, W_3$, y ON son como se definió anteriormente,

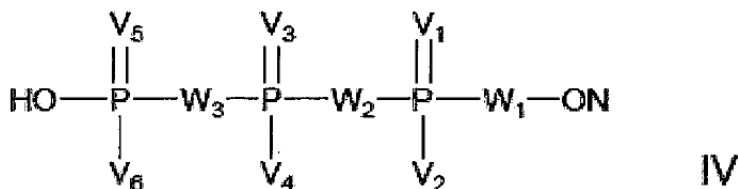
- 5 (b) hacer reaccionar el compuesto oxidado con un agente marcador de captura de fórmula (III),



en donde X, Z e Y son como se describió anteriormente, para obtener un producto de reacción que comprende el oligonucleótido de fórmula (I), y

- 10 (c) poner en contacto el producto de reacción de la etapa (b) con un reactivo capaz de interactuar con el marcador de captura, en donde el reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en una fase sólida de una cromatografía de fase inversa estándar, tal como RP-HPLC, un material cromatográfico con afinidad por grupos hidrofóbicos, un material cromatográfico con afinidad por grupos fluorados, tal como un soporte de afinidad por flúor, un reactivo de captura que contiene un resto alquinilo, y un reactivo de captura que contiene un resto azido, en donde el contacto tiene lugar bajo condiciones que permiten la separación del oligonucleótido (I) de las otras especies contenidas en dicho producto de reacción.
- 15

Opcionalmente, el método comprende además la etapa (d) de eliminar el marcador de captura para obtener un oligonucleótido de fórmula (IV),



- 20 en donde $V_1, V_3, V_5, V_2, V_4, V_6, W_1, W_2, W_3$, y ON son como se describió anteriormente. Esta etapa se lleva a cabo bajo condiciones que no causan degradación del resto trifosfato, por ejemplo, como se describe en detalle más abajo.

En otras realizaciones, el marcador de captura no se elimina completamente. En estas realizaciones, el oligonucleótido marcado como tal puede tener utilidad, por ejemplo, utilidad como agente farmacéutico.

- 25 El término "oligonucleótido" en el contexto de la presente solicitud abarca a compuestos que comprenden una pluralidad, por ejemplo, al menos 4 nucleótidos o componentes análogos de nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende de 6-100 componentes, por ejemplo de 20-40. El nucleótido o componentes análogos de nucleótidos pueden comprender un nucleósido o subunidades de un análogo de nucleósido conectado mediante uniones entre subunidades. Las subunidades nucleósidas incluyen subunidades desoxirribonucleósidas, subunidades ribonucleósidas y/o análogos de los mismos, particularmente, análogos de nucleósidos modificados en la nucleobase y/o el azúcar. Además, los oligonucleótidos pueden comprender componentes no nucleotídicos y/o otras modificaciones de la cadena terminal y/o lateral.
- 30

- En las subunidades modificadas en el azúcar preferidas, el 2'-OH de la subunidad ribonucleósida, se reemplaza por un grupo que se selecciona de OR, R, halógeno, SH, SR, NH_2 , NHR, NR_2 o CN, en donde R es un alquilo de C_{1-6} , alqueno de C_{2-6} o alquinilo de C_{2-6} y el halógeno es F, Cl, Br o I. En otras subunidades modificadas en el azúcar preferidas, la ribosa se puede sustituir, por ejemplo, por otro azúcar, por ejemplo una pentosa tal como arabinosa. Esta modificación del azúcar se puede combinar con modificaciones del 2'-OH como se describen anteriormente, tal como en subunidades 2'-fluoroarabinonucleósido. Otras subunidades modificadas en el azúcar aún más preferidas incluyen nucleósidos bloqueados (LNA) o 2',3'-seco-nucleósidos (UNA). En componentes nucleosídicos modificados en la nucleobase preferidos, se utiliza una nucleobase no estándar, por ejemplo aparece una nucleobase no natural, en lugar de una nucleobase estándar. Ejemplos de nucleobases no-estándar son uracilos o citosinas modificadas en la posición 5, por ejemplo 5-(2-amino)propil uracilo o 5-
- 35
- 40

bromouracilo; hipoxantina; 2,6-diaminopurina; adeninas o guaninas modificadas en la posición 8, por ejemplo 8-bromoguanina; deazanucleósidos, por ejemplo, 7-deazaguanina o 7-deazaadenina; o nucleobases alquiladas en O- y N-, por ejemplo N⁶-metiladenina, o N⁶,N⁶-dimetiladenina. Se pueden seleccionar además análogos adecuados de la nucleobase entre análogos de nucleobase universales, tales como 5-nitroindol.

5 La unión entre las subunidades puede ser una unión fosfodiéster o una unión modificada, por ejemplo un fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, boranofosfato, u otra unión modificada conocida por un experto en la técnica.

10 El oligonucleótido se puede seleccionar entre desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y análogos de oligonucleótido. Los análogos de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos pueden comprender al menos una subunidad de desoxirribonucleósido o ribonucleósido y, al menos una subunidad nucleosídica modificada y/o al menos una unión entre subunidades modificadas, por ejemplo, como se describen anteriormente. Los oligonucleótidos análogos pueden consistir también en su totalidad de subunidades nucleosídicas modificadas.

15 El oligonucleótido puede ser una molécula monocatenaria o una molécula bicatenaria. Los oligonucleótidos bicatenarios pueden comprender hebras complementarias completa o parcialmente. Las moléculas bicatenarias pueden ser de punta roma o comprender al menos un saliente, por ejemplo, un saliente 5'- o 3'-. Si se presentan los salientes, se localizan preferiblemente en el extremo distal de la molécula (con respecto al grupo análogo trifosfato/trifosfato). Los oligonucleótidos bicatenarios pueden comprender también una estructura en horquilla, en donde el dúplex se cierra mediante un bucle en el extremo distal del mismo (con respecto al grupo análogo trifosfato/trifosfato). El bucle puede comprender un nucleótido y/o componentes no nucleotídicos, por ejemplo componentes basados en diol, tal como fracciones de etilenglicol, por ejemplo tri(etilen)glicol o hexa(etilen)glicol; propano-1,3-diol; dodecano-1,12-diol; o 3,12-dioxa-7,8-ditiatetradecano-1,14-diol.

20 En una realización preferida, las moléculas bicatenarias son de punta roma, particularmente en el extremo proximal del mismo (con respecto al grupo análogo trifosfato/trifosfato).

25 El oligonucleótido puede comprender además modificaciones en la cadena terminal y/o lateral, por ejemplo, entidades de marcaje de células específicas unidas covalentemente al mismo. Estas entidades pueden promover la absorción celular o celular-específica e incluyen, por ejemplo, lípidos, vitaminas, hormonas, péptidos, oligosacáridos y análogos de los mismos. Las entidades de marcaje se pueden unir, por ejemplo, a nucleobases modificadas o componentes no-nucleotídicos mediante métodos conocidos por el experto en la técnica.

30 El oligonucleótido de fórmula (I) o (IV) comprende un grupo análogo trifosfato/trifosfato. En este grupo, V₁, V₃ y V₅ se seleccionan independientemente entre O, S y Se. Preferiblemente, V₁, V₃ y V₅ son O. V₂, V₄ y V₆ se seleccionan independientemente en cada caso entre OH, OR¹, SH, SR¹, F, NH₂, NHR¹, N(R¹)₂ y BH₃M⁺. Preferiblemente, V₂, V₄ y V₆ son OH. R¹ puede ser un alquilo de C₁₋₆, alqueno de C₂₋₆, alquino de C₂₋₆, acilo de C₂₋₆ o un grupo cíclico, por ejemplo un grupo alquilo (hetero)ciclo de C₃₋₈, un grupo alqueno (hetero)ciclo de C₃₋₈, o un grupo fenilo o heteroarilo de C₅₋₆, en donde los heteroátomos se seleccionan entre N, O y S. Además, dos R¹ pueden formar un anillo, por ejemplo, un anillo 5 ó 6 miembros junto con un átomo de N unido al mismo. R¹ puede comprender también sustituyentes tales como halógeno, por ejemplo, F, Cl, Br o I, O(halo) alquilo de C₁₋₂ y - en el caso de los grupos cíclicos - (halo) alquilo de C₁₋₂. M⁺ puede ser un catión inorgánico u orgánico, por ejemplo, un catión de metal alcalino o un catión amonio o amino.

40 W₁ puede ser O o S. Preferiblemente, W₁ es O. W₂ puede ser O, S, NH o NR². Preferiblemente, W₂ es O. W₃ puede ser O, S, NH, NR², CH₂, CHHal o C(Hal)₂. Preferiblemente, W₃ es O, CH₂ o CF₂. R² se puede seleccionar entre grupos como los que se describen para R¹ anteriormente. Hal puede ser, F, Cl, Br o I.

45 El grupo análogo de trifosfato/trifosfato se une preferiblemente a un extremo del oligonucleótido. Preferiblemente, el grupo se une al extremo 5' del oligonucleótido, particularmente al grupo 5'-OH del azúcar 5'-terminal del mismo.

50 La etapa (a) del método de la invención comprende la reacción de especies cíclicas P(V)-P(V)-P(III) de fórmula (IIa) con un agente oxidante. El compuesto de fórmula (IIa) se puede obtener según los métodos estándar como se describen por Ludwig et al., 1989, supra y Gaur et al., 1992, supra, concretamente al hacer reaccionar el grupo OH 5'-terminal de un oligonucleótido con un agente fosforilante trifuncional, por ejemplo, 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona, bajo condiciones adecuadas, por ejemplo, en presencia de una base (piridina o diisopropilmetilamina) en un disolvente adecuado, tal como dioxano o diclorometano, y posterior reacción con pirofosfato (W₃=O) o un pirofosfato modificado (W₃ es diferente de O, por ejemplo, CH₂, CCl₂, NH o CF₂). Preferiblemente, se usa una sal tri-n-butilamonio del pirofosfato o pirofosfato modificado en DMF. El intermedio P(III)-P(V) cíclico resultante (IIa) se oxida después bajo condiciones anhidras, por ejemplo, con un peróxido, tal como hidroperóxido de terc-butilo, hidroperóxido de cumeno, (10-canforsulfonilo)oxaziridina. Alternativamente, se pueden emplear fenilacetildisulfuro (V₂=S), o complejo borano-diisopropiletilamina (V₃=BH₃) respectivamente, para proporcionar el correspondiente análogo 5'-trofosfato/trifosfato cíclico de fórmula (IIb). También se hace referencia en este contexto en WO 96/40159 o WO 2009/060281.

La reacción de la etapa (a) puede tener lugar con un oligonucleótido en disolución o con un oligonucleótido unido a una fase sólida, por ejemplo, una resina o vidrio orgánico, tal como CPG (vidrio de poro controlado). El oligonucleótido puede comprender además grupos protectores, por ejemplo, grupos protectores del azúcar o de la nucleobase, que son bien conocidos por el experto en la técnica. Ejemplos preferidos de grupos de protección son 2-cianoetilo para el internucleósido fosfodiéster o fosfortioato, tert-butildimetilsilil (TBDMS), triisopropilsiloximetilo o bis(acetoxietoxi)metilo para el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa, 4-t-butilfenoxiacetilo o fenoxiacetilo, acetilo, isobutirilo, benzoilo para los grupos amino exocíclicos de las nucleobases. Más preferiblemente, la etapa (a) se lleva a cabo con una fase sólida unida al oligonucleótido.

Según la etapa (b) del método de la invención, el compuesto (IIb) reacciona con un agente marcador de captura de fórmula (III)



en donde X es un grupo que se selecciona entre NH, NR³, O o S. R³ se define como se describe anteriormente para R¹. Preferiblemente, X es NH o S.

El marcador de captura se define funcionalmente más abajo mediante una serie de Ejemplos aceptables. Una regla general puede ser:

Z tiene que permitir una purificación conveniente, y debería eliminarse bajo condiciones que sean compatibles con los requerimientos de estabilidad para pppARN.

Y representa una unión o ligando químico, por ejemplo, un alquileo, preferiblemente un ligando alquileo de C₁₋₆, más preferiblemente un ligando alquileo de C₂₋₅, o un ligando aralquileo, que comprende opcionalmente heteroátomos o grupos que contienen un heteroátomo tal como O, S, NH, C=O o C=S, y/o que opcionalmente comprende uniones C=C o C≡C.

En otra realización preferida el ligando es un óxido de polialquileo, preferiblemente un óxido poli-alquileo de C₂₋₆, más preferiblemente un óxido poli-alquileo de C₂₋₃. El peso molecular promedio del ligando puede estar en el intervalo de 30-800 g/mol, preferiblemente de 40-450 g/mol, más preferiblemente de 40-250 g/mol. El ligando puede ser [-CH₂CHR⁴-O]_n, con n = 1-10, preferiblemente n = 1-7, más preferiblemente n = 2-5, e incluso más preferiblemente n = 3. R⁴ puede ser H o alquilo de C₁₋₆.

En una realización preferida R⁴ es H.

En una realización especialmente preferida el ligando tiene la fórmula -CH₂-CH₂-[(O-CH₂CH₂)]₃-.

La etapa de reacción (b) puede tener lugar con un oligonucleótido en disolución o con un oligonucleótido unido a una fase sólida, por ejemplo, una resina o vidrio orgánico. El oligonucleótido puede comprender además grupos protectores como se describe anteriormente. Más preferiblemente, la etapa (b) se lleva a cabo con un oligonucleótido unido a una fase sólida.

El marcador de captura Z según la presente invención es un resto como se define en las reivindicaciones, capaz de interactuar covalente o no covalentemente con un reactivo de captura bajo condiciones que permitan la separación de los compuestos que comprenden el marcador de captura, por ejemplo, el oligonucleótido (I) de otras especies, que no contienen el marcador de captura. Preferiblemente, el reactivo de captura es un reactivo inmovilizado o un reactivo capaz de ser inmovilizado, como se define en las reivindicaciones.

Marcadores de captura adecuados son, por ejemplo de cadena larga, por ejemplo, de C₈-C₂₄, preferiblemente restos de alquilo alifático alquileo de C₁₃-C₂₄, tales como decilo u octadecilo u otros restos lipídicos/lipofílicos, tales como por ejemplo, colesterol o tocoferol. En este caso, la entidad trifosfato marcada se puede capturar y purificar en una fase sólida mediante cromatografía en fase inversa estándar, por ejemplo RP-HPLC, o mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, de sus siglas en inglés). El marcador de captura puede ser también una entidad de perfluoroalquilo, por ejemplo un resto 4-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)benzilo o un resto 3-(perfluoroocetil)propilo para la captura específica del oligo-trifosfato modificado en un soporte de Afinidad a Flúor, tal como el disponible comercialmente de Fluorous Technologies, Inc.

El marcador de captura además de Z, puede ser un primer compañero de un par de unión no-covalente de alta afinidad, tal como biotina, o un análogo de biotina tal como destiobiotina, un hapteno o un antígeno, que tiene una alta afinidad (por ejemplo una constante de unión de 10⁶ l/mol o menos) con el reactivo de captura, el cual es un acompañante complementario secundario del par de unión de alta afinidad, por ejemplo, una estreptavidina o un anticuerpo.

En otra realización, el marcador de captura puede ser un primer acompañante del par de unión covalente, el cual puede formar un enlace covalente con el reactivo de captura, que es un acompañante complementario secundario del par de unión covalente, en donde el enlace covalente puede ser un enlace reversible o irreversible. En esta realización, el componente marcador de captura Z puede ser una entidad química reactiva,

tal como una azida o grupo alquinilo capaz de reaccionar covalentemente con un reactivo de captura que contiene un grupo reactivo complementario, por ejemplo un resto alquinilo o azido, respectivamente, en el caso de la reacción de Huisgen de cicloadición 3+2 (la también llamada "reacción-click" que es catalizada por Cu(I) o una variante del mismo que se produce sin iones Cu(I) a través de la liberación de un tipo de anillo, por ejemplo, derivados de ciclooctino). Un ejemplo específico para Z-Y-X en tal caso sería propargilamino.

Otro componente marcador de captura puede ser aparte de Z, una entidad química que contiene un grupo nucleofílico adicional, por ejemplo un grupo amino secundario en un reactivo tipo $\text{NH}_2\text{-Y-XH}$. Después se puede utilizar un reactivo electrofílico adecuado de amplio rango, tal como colesterol, cloroformiato o ésteres activos de biotina N-hidroxi succinimida, para introducir el grupo marcador mientras que el oligonucleótido se une a la fase sólida, extendiendo por tanto significativamente el alcance de la reacción de marcaje.

En la presente invención, el marcador de captura Z es un resto alquilo de cadena larga, una entidad perfluoroalquilo, una azida o un grupo alquinilo.

Por otra parte, Y puede contener opcionalmente un enlace disulfuro capaz de recuperar el oligonucleótido trifosforilado modificado con un resto sulfhidrilo conectado a través de parte del ligando por medio de X al fósforo- γ .

En otra realización de la presente invención, el oligonucleótido puede llevar un segundo marcador de captura en una posición diferente, por ejemplo, en el extremo 3'. El primer y el segundo marcadores de captura se seleccionan preferiblemente como para permitir la purificación mediante dos métodos ortogonales que sean capaces de recuperar el material de pureza extremadamente alta. Por ejemplo, el primer marcador de captura puede ser un grupo lipofílico, que interacciona con un soporte cromatográfico adecuado y, el segundo marcador de captura puede ser biotina, que interacciona con estreptavidina.

El marcador de captura se puede introducir convenientemente mediante realización de la síntesis empleando un CPG modificado para síntesis del oligonucleótido.

La etapa (c) del método de la presente invención comprende poner en contacto el producto de reacción de la etapa (b), con un reactivo de captura capaz de interactuar con el marcador de captura Z, bajo condiciones que permitan la separación del marcador de captura que contiene oligonucleótido (I) de las otras especies contenidas en el producto de reacción. Antes de la etapa (c), el oligonucleótido (I) unido a la fase sólida, se separa y desprotege de la fase sólida, es decir, los grupos de protección se eliminan parcial o completamente. El reactivo de captura se inmoviliza preferiblemente en un soporte adecuado, por ejemplo, un soporte cromatográfico. Para proporcionar la separación del marcador de captura que contiene oligonucleótido (I) de las especies que no contienen el marcador de captura, los productos de reacción de la etapa (b) se separan y desprotegen de la fase sólida, si es necesario, y se someten a un procedimiento de separación, preferiblemente un procedimiento de separación cromatográfica basado en la interacción del marcador de captura Z con el reactivo de captura. Durante la etapa de separación, la pureza del oligonucleótido (I), que está generalmente en el intervalo de 25-70% para el material en bruto dependiendo de la longitud y la complejidad de la secuencia, se puede incrementar hasta 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más. Para los estudios de toxicidad es deseable una pureza > 85%, mientras que en estudios clínicos de etapa posterior, la pureza debería estar en el intervalo de al menos 90-95%. Por tanto, la presente invención proporciona un medio para obtener un pppARN de alta pureza, como se requiere para los ensayos clínicos en seres humanos.

En la etapa (c), el marcador de captura y el reactivo de captura capaz de interactuar con él, se seleccionan preferiblemente de (i) un grupo hidrofóbico o fluorado y un material cromatográfico con afinidad por los grupos hidrofóbicos o fluorados, por ejemplo, un material de fase inversa o un soporte de afinidad por flúor; (ii) un primer acompañante de un par de unión de alta afinidad covalente y un segundo acompañante complementario de un par de unión de alta afinidad no covalente, (iii) un primer acompañante de un par de unión covalente y un segundo acompañante complementario de un par de unión covalente, donde el primer y segundo acompañantes forman enlaces covalentes.

Después de la etapa de purificación (c), se puede separar el marcador de captura Z del oligonucleótido trifosfato modificado en otra etapa (d) dando como resultado un oligonucleótido normalizado (IV).

La etapa (d) tiene que ser compatible con los requerimientos de estabilidad del trifosfato del producto final y con los requerimientos de estabilidad del enlace entre ribonucleótidos. Puede comprender la separación mediante condiciones ligeramente ácidas cuando X es NH, separación con iones plata cuando X es S, separación mediante un tiol, tal como ditiotreitól, conduciendo a la eliminación del tirano cuando Y-X-P contiene $-\text{S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P}$.

En otras realizaciones, el marcador de captura permanece completa o parcialmente en el oligonucleótido trifosfato modificado, particularmente cuando el oligonucleótido marcado es adecuado para aplicaciones farmacéuticas. En estas realizaciones, el reactivo Z-Y-XH se tiene que seleccionar de un subgrupo de restos Z, que son compatibles funcionalmente con los requerimientos estructurales del sensor RIG-I. Por ejemplo, la combinación Z=decil-octadecilo, Y=ligando, XH=NH se conoce por cumplir todos estos requerimientos.

- (A) reacción bruta mixta que contiene 65% de n-decil-NH-pppARN (pico a 14 minutos);
- (B) n-decil-NH-pppARN aislado;
- (C) pppARN; el pH=3,8 60 minutos de hidrólisis del producto de B

En la Figura 2 el eje-x indica el tiempo [minutos] y el eje-y indica la absorbancia a 260 nm [mAu].

- 5 El pico general a 10 minutos de tiempo de retención en A contiene el 24-mer no fosforilado tardío, menor síntesis de secuencias insuficientes, el menor producto de hidrólisis pppARN y el derivado 5'-H-fosfonato del 24-mer. La inserción muestra la posición del pppARN y 5'-OH ARN en este sistema.

Columna: Hamilton PRP-1 4,1 x 250 mm, 10 µm

Gradiente: 1-100 % B en 18 minutos, A= 0,05 M TEAB; B= 80% Metanol 0,05 M TEAB

- 10 La Figura 3 muestra el espectro MALDI – TOF (eje-x: masa [Da]) correspondiente a las marcas HPLC de A, B y C en la Figura 2 respectivamente.

(A) espectro registrado de la mezcla de reacción en bruto después de desalinizar mostrando la presencia del n-decil-NH-ppp ARN (24d), pppARN (24c), 5'-H-fosfonato ARN(24b) y 5'-OH-ARN(24a) y menor síntesis de secuencias insuficientes indicadas como picos 12-23;

- 15 (B) espectro registrado del HPLC de n-decil-NHpppARN (B) aislado,

(C) espectro del pppARN puro obtenido de la precipitación directa de EtOH del producto de hidrólisis de pH=3,8 del n-decil-NH-pppARN

La Fig. 4 muestra un esquema de reacción que explica la generación de los productos secundarios 24 a-c

- 20 La Figura 5 muestra el transcurso de tiempo para la conversión de n-decil-NH-pppARN a pppARN a través de la hidrólisis del enlace fosforamidato.

La Figura 6 muestra el espectro MALDI típico (eje-x: masa [Da]) de los productos pppARN 21-mer, 24-mer, 27-mer, obtenidos después de eliminar el marcador de captura y la precipitación de EtOH como sal Na+. El pico de masa correcto se observa a m/z 6911,6 (A), m/z 7828 (B), m/z 8808,1 (C) y los picos a m/z 3462 (A), m/z 3918 (B), 4408 (C) son debidos al pppARN doblemente cargado, respectivamente. Se han obtenido espectros de calidad similar en más de 50 ejemplos con una variedad de secuencias que contienen análogos de nucleósidos y modificaciones en 3' en el intervalo de 15-42 mer.

- 25 La Figura 7A muestra la escala de semipreparación de la purificación HPLC en fase inversa de una magnitud de reacción de 1 µmol de decil-NHpppARN 21 mer en una columna Hamilton PRP-1 de 7 mm

Columna: Hamilton PRP-1 7 x 250 nm, 10 µm Velocidad de flujo 3 mL/min.

- 30 Gradiente: 1-80% B en 50 minutos, A=0,1M TEAB; B=80% Metanol 0,1 M TEAB

La Figura 7B y la Figura 7C muestran la magnitud de semipreparación de las purificaciones HPLC en fase inversa, mostrando en particular cómo el método de la invención es capaz de enfrentarse a síntesis sub-óptima y/o condiciones de 5'-fosforilación.

En todas las figuras el eje-x es el volumen [ml] y el eje-y es la absorbancia a 260 nm [mAu].

- 35 La Figura 8 muestra oligonucleótidos modificados de fórmula (I) especialmente preferidos.

La Figura 9 muestra la síntesis de los compuestos F-TAG-pppARN y N3-TAG-pppARN (A), y la estrategia para la inmovilización covalente reversible utilizando N3-TAG ARN (B)

La Figura 10 muestra el espectro MALDI de F-TAG-pppARN (A) y N3-TAG-pppARN (B)

- 40 La Figura 11 muestra el análisis RP-HPLC de pppARN y n-alkil-NH-pppARNs con restos alquilo de longitud de cadena creciente:

- A. pppARN, RT=9,3 minutos
- B. n-decil-NH-pppARN, RT=13,8 minutos
- C. n-dodecil-NH-pppARN, RT=15,5 minutos
- D. n-tetradecil-NH-pppARN, RT=17,3 minutos

E. n-octadecil-NH-pppARN, RT=19,7 minutos

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Preparación de un oligonucleótido 5'-trifosfato modificado empleando una etapa de purificación con un marcador de captura de decil amina

En la Figura 1 se muestra un resumen del esquema de reacción descrito en el Ejemplo 1.

Etapa 1: Disolver 203 mg (1 mmol) de 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona en 1 mL de dioxano seco en un vial de 10 mL bajo argón.

10 Etapa 2: Secar la columna de síntesis que contiene todo el ARN protegido que se ha detritilado y lavarlo minuciosamente con acetonitrilo, a vacío durante 12 horas. Lavar completamente los contenidos de la columna mediante la elaboración repetida y echando 2 mL de una disolución de dioxano anhidro/piridina, 3:1 (v/v) en una atmósfera de argón.

15 Etapa 3: Añadir primero dentro de un vial, 2 mL de piridina/dioxano 3:1 v/v, seguido de 100 µL de 2-cloro-4H-1,3,2,-benzodioxafosforin-4-ona 1 M en dioxano seco para proporcionar una disolución 50 mM del reactivo fosfitilante, por ejemplo, 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-2-ona, en dioxano/piridina, 3:1 (v/v). Homogeneizar la disolución mediante agitación suave. Comenzar la reacción haciendo pasar la disolución de 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona a través de la columna de síntesis del vial.

20 Durante la reacción, extraer y echar repetidamente el 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona que contiene la disolución por la columna de síntesis, para permitir la puesta en contacto y el buen mezclado con el ARN soportado por la fase sólida. Un tiempo de reacción de 30 minutos proporciona normalmente una reacción cuantitativa cercana al grupo 5'-OH libre del oligómero unido al soporte en el intervalo de 20-40 nt.

25 Etapa 4: Después de un tiempo de reacción de 30 minutos echar la disolución de dioxano/piridina que contiene el exceso del agente fosfitilante en un contenedor de residuos, llenar una nueva jeringa con una mezcla agitada de 1 mL de pirofosfato (Bu₃NH)₂ 0,5 M en DMF seco y 238 µL (1 mmol) de Bu₃N para proporcionar una disolución pirofosfato (Bu₃N)₄ 0,5 M. Hacer pasar esta disolución a través de la columna, reemplazando de esta manera la disolución de dioxano/piridina. El gran exceso del pirofosfato asegura una conversión cuantitativa del intermedio al anhídrido cíclico Ila P(III)-P(V).

Etapa 5: Lavar la columna con 3 mL de CH₃CN para eliminar el DMF y el exceso de PPI, y llenar el reactor de la columna con CH₃CN seco.

30 Etapa 6: Disolver 300 µL de t-BuOOH (disolución 5,5 M en decano, Sigma Aldrich) en 2 mL de CH₃CN anhidro para proporcionar una disolución homogénea de aproximadamente 0,7 M. Poner en contacto el soporte de síntesis con la disolución durante 15 minutos para obtener el anhídrido oxidado cíclico IIb P(V).

Etapa 7: Lavar la columna con 3 mL de CH₃CN seco para eliminar el exceso de peróxido y llenarlo con CH₃CN.

35 Etapa 8: Disolver 300 µL de decilamina seca en 1 mL de CH₃CN seco bajo argón y facilitar a la disolución ponerse en contacto con el soporte de la columna. Mover la disolución de decilamina a través del soporte. El tiempo de contacto del CPG con la disolución de amina debe ser de 3 minutos.

Etapa 9: Lavar la columna minuciosamente con 9 mL de acetonitrilo, después secar los contenidos de la columna enjuagándolos con argón.

40 Etapa 10: Primera etapa de la desprotección: Hacer pasar 1 mL de la disolución de desprotección (40% metilamina acuosa/amoniaco acuoso concentrado 1:1 v/v. reactivo AMA) a través del soporte durante 2-3 veces. Después de un contacto de 30 minutos, transferir la disolución en un nuevo vial. Lavar el soporte con el mismo volumen de la disolución de desprotección AMA y combinar los lavados. Calentar la disolución combinada y lavar durante 10 minutos a 65°C. Después enfriar con hielo, concentrar la disolución hasta un volumen de 300-500 µL, evaporar después hasta desecar.

45 Etapa 11: Eliminación de los grupos de protección 2'-O-TBDMS: Secar el residuo por adición y coevaporación de 300 µL de EtOH seco, añadir 1 mL de TBAF seco 1 M (fluoruro de tetra-n-butilamonio) en THF, cerrar bien y poner en un agitador durante 16 horas. Terminar la reacción con 1 mL de TEAB (bicarbonato de trietilamonio) acuoso estéril 1 M, y desalinizarla en una columna NAPTM-25 (Purificación de Ácido Nucleico, de sus siglas en inglés) usando agua estéril como eluyente. En esta etapa puede ser necesaria la filtración a través de un filtro estéril de 2 µm. Combinar y evaporar las fracciones absorbentes-UV hasta un volumen de 150 µL, añadir 100 µL de TEAB 1 M a pH8 y almacenar la disolución congelada a -20°C hasta que se pueda realizar la purificación por HPLC. El producto decil-NHpppARN es estable a -20°C durante semanas a pH 7-8.

50

Etapa 12: Purificación por HPLC: El producto de reacción a partir de una mezcla de reacción de 1 μ mol de magnitud de la etapa 11, se cargó en una columna PRP-1 (Hamilton) 7x25 mm. La purificación se realizó utilizando un tampón de gradiente lineal B de 0 a 80% en 50 minutos a una velocidad de flujo de 3 mL/min. El tampón A es TEAB 100 mM y el tampón B es TEAB 100 mM en metanol/agua 8:2 v/v. En la Figura 7A se muestra un ejemplo típico de una purificación 27-mer.

Se recogieron las fracciones 5 y 6, se evaporaron en un evaporador rotatorio y se desalinizaron mediante varias coevaporaciones con metanol seco. El residuo (aproximadamente 200-250 nmol de decil-NHpppARN) se disolvió en agua y se transfirió a un vial Eppendorf con tapón de rosca.

Etapa 13: Eliminación del marcador decilamina: Se disolvieron 100 nmol de decil-NHpppARN en 400 μ L de un tampón de desprotección a pH 3,8 en un tubo Eppendorf de 2 mL, y el tubo cerrado se calentó a 60°C durante 70 minutos. Estas condiciones dieron como resultado una eliminación cuantitativa del enlace fosforamidato sin degradación del resto trifosfato. La mezcla de reacción se enfrió después en hielo y se añadieron 25 μ L de una disolución estéril de NaCl 5 M y 1,2 mL de EtOH absoluto. Después de mezclar, la disolución se mantuvo a -20°C durante la noche para precipitar el pppARN. Se recogió el precipitado mediante centrifugación, se lavó con etanol frío, se secó en un SpeedVac, a continuación se disolvió en 500 mL de agua estéril y se almacenó congelado a -20°C.

Tabla 1: Compendio de las condiciones de reacción para la introducción del resto decil-NHppp en el extremo 5'.

Columna de síntesis de 1 μ L de magnitud que contiene ARN detritilado unido al soporte

↔ movimientos bidireccionales de los reactivos,

→ etapa de lavado unidireccional

Etapa	Reactivo	Tiempo	
1	3 mL dioxano/piridina, 3:1 v/v	lavar	→
2	50 mM 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona en 2 mL de dioxano/piridina, 3:1 v/v	30 minutos	↔
3	1 mL de 0,5 M (Bu ₃ NH) ₂ PP _i en DMF más 238 μ L de Bu ₃ N	10 minutos	↔
4	3 mL de acetonitrilo seco	lavar	→
5	300 μ L de t-BuOOH (5,5 M en decano) en 2 mL de CH ₃ CN	15 minutos	↔
6	3 mL de acetonitrilo seco	lavar	→
7	300 μ L de n-decilamina en 1 mL de acetonitrilo seco (decilamina 1,1 M)	3 minutos	↔
8	10 mL de acetonitrilo	lavar	→

De una manera análoga, también se sintetizó y purificó un oligonucleótido modificado 5'-trifosfato usando un octadecilo o un marcador de captura de colesterol.

Ejemplo 2

25 Preparación de oligonucleótidos trifosfato usando marcadores de captura no-lipolíticos

(F-TAG-pppARN y N₃-TAG-pppARN)

Para demostrar la utilidad de la interacción no-lipolítica en base a estrategias de purificación, se prepararon los derivados pppARN F-TAG-pppARN y N₃-TAG-pppARN (véase la Figura 9). Todas las etapas de la síntesis son idénticas al del procedimiento descrito en el Ejemplo 1, excepto que en la etapa 8 de la Figura 1 se usaron 1,2 mL de una disolución 0,1 M de 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoroundecilamina en acetonitrilo anhidro para abrir el anillo de la fase sólida unido a ciclotrifosfato, con un tiempo de reacción aumentado en 3 horas, para proporcionar F-TAG-ARN; y se usaron 2 mL de una disolución 0,1 M de 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amina en acetonitrilo seco durante 3 horas, para proporcionar N₃-TAG-pppARN. Las siguientes etapas de desprotección son idénticas a las que se han proporcionado en la descripción detallada para DecNHpppARN en el Ejemplo 1.

35 Datos analíticos de F-TAG-pppARN y N₃-TAG-pppARN (véase la Figura 10):

(La secuencia de ARN en estos ejemplos es 5'-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU)

	Tiempo de retención del HPLC	Masa Calculada, Da	Masa medida por MALDI, Da	Tiempo requerido para completar la separación P-N a pH 3,8 a 60°C
F-TAG-pppARN	15,1 minutos	8287,74	8290,30	70 minutos
N ₃ -TAG-pppARN	11 minutos	8033,20	8033,92	70 minutos

*columna PRP-1, 0-100% B en 20 minutos (A = 100 mM bicarbonato de trietilamonio (TEAB), B = 100 mM TEAB 80% MeOH)

5 Los oligonucleótidos pppARN que contienen los marcadores de flúor (F-TAG-pppARN) se pueden purificar utilizando cartuchos de "flúor" comercial, o columnas HPLC de flúor que son capaces de aprovechar la fuerte interacción no covalente entre las cadenas alquilo perfluoradas. Los derivados pppARN modificados con azida gamma (N₃-TAG-pppARN) se pueden unir covalentemente a fases sólidas modificadas con propina disponibles comercialmente, mediante versiones de ARN compatibles con la reacción de cicloadición azida-alquino catalizada con cobre (I) (química click). Este procedimiento permite la purificación de secuencias de pppARN altamente estructuradas, ya que la resina de unión en condiciones de desnaturalización se puede aplicar para eliminar los productos no-trifosforilados.

10 Tanto en la hidrólisis ácida de F-TAG-ARN como de N₃-TAG-ARN, el producto pppARN final se libera con cinéticas comparables a la alquilamida P-N simple, como se describe en la Figura 5.

Ejemplo 3

15 Variación de la posición del marcador pppARN por elución RP-HPLC mediante marcadores de captura de cadena de longitud creciente

Además del marcador n-decilo descrito en el Ejemplo 1, también se pueden utilizar restos n-alquilo con cadenas de gran longitud (C₁₂, C₁₄, C₁₈) para incrementar el tiempo de retención del producto Marcador-pppARN durante la purificación RP-HPLC facilitando una separación eficaz de las impurezas que no contienen el marcador.

20 N-dodecil-NH-pppARN, n-tetradecil-NH-pppARN y n-octadecil-NH-pppARN se pueden preparar siguiendo el procedimiento que se describe en el Ejemplo 1 mediante la variación de la etapa 8: se prepara una disolución 0,1 M de n-alquilamina (n-dodecilamina, n-tetradecilamina o n-octadecilamina) en CH₂Cl₂ y 2 mL de la disolución se ponen en contacto con el soporte de la columna. La disolución de alquilamina se pas de un lado a otro a través del soporte. Después de un tiempo de contacto de 3 horas se requiere de una etapa de lavado adicional con 2 mL de CH₂Cl₂ antes de continuar con las siguientes etapas.

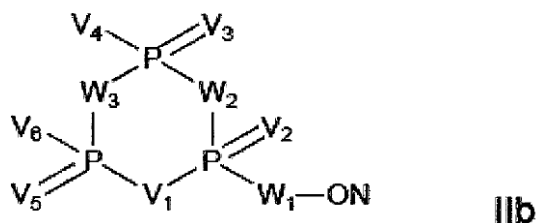
25 Datos analíticos:

	Tiempo de retención RP-HPLC* (minutos)	Masa Calculada (Da)	Masa medida por MALDI	Tiempo para completar la separación P-N a pH 3,8 a 60°C
C ₁₂ -NH-pppARN	15,5	7995,7	7999,2	70 minutos
C ₁₄ -NH-pppARN	17,3	8023,7	8028,1	70 minutos
C ₁₈ -NH-pppARN	19,7	8079,8	8082,2	70 minutos proporciona >80% de producto

*PRP-1 columna 0-100% B en 20 minutos (A= 100 nM de Bicarbonato de trietilamonio, B= 100 mM TEAB 80% MeOH)

La Figura 11 muestra el análisis RP-HPLC de pppARN y n-alquil-NH-pppARNs con restos alquilo de longitud creciente de la cadena.

30



en donde V₁, V₃, V₅, V₂, V₄, V₆, W₁, W₂, W₃, y ON son como se definió anteriormente,

(b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (IIb) con un agente marcador de captura de fórmula (III),



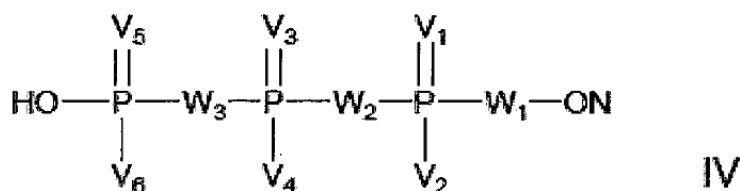
5 en donde X, Z e Y son como se describió anteriormente, para obtener un producto de reacción que comprende el oligonucleótido de fórmula (I), y

10 (c) poner en contacto el producto de reacción de la etapa (b) con un reactivo de captura capaz de interactuar con el marcador de captura, en donde el reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en una fase sólida de una cromatografía de fase inversa estándar, tal como RP-HPLC, un material cromatográfico con afinidad por grupos hidrofóbicos, un material cromatográfico con afinidad por grupos fluorados, tal como un soporte de afinidad por flúor, un reactivo de captura que contiene un resto alquililo, y un reactivo de captura que contiene un resto azido, en donde el contacto tiene lugar bajo condiciones que permiten la separación del oligonucleótido (I) de las otras especies contenidas en dicho producto de reacción.

15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el grupo análogo trifosfato/trifosfato se une al extremo 5' del oligonucleótido, particularmente al grupo 5'-OH del extremo 5' del azúcar del mismo.

3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además la etapa:

(d) eliminar el marcador de captura para obtener un oligonucleótido de fórmula (IV):



en donde V₁, V₃, V₅, V₂, V₄, V₆, W₁, W₂, W₃, y ON son como se definió en la reivindicación 1.

20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el oligonucleótido se selecciona entre desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y análogos de oligonucleótidos.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el oligonucleótido es monocatenario o bicatenario.

25 6. El método de la reivindicación 5, en donde el oligonucleótido es bicatenario y se dobla mediante un bucle en el extremo distal del mismo, en donde el bucle comprende componentes nucleótidos y/o no nucleótidos.

7. El método de la reivindicación 5 ó 6, en donde el oligonucleótido es bicatenario y se dobla por el extremo como proximal del mismo.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el oligonucleótido comprende una entidad de marcaje celular específica unida covalentemente al mismo.

30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el oligonucleótido (I) o (IV) es un activador del RIG-1.

10. El uso de un kit para preparar un nucleótido de fórmula (I)

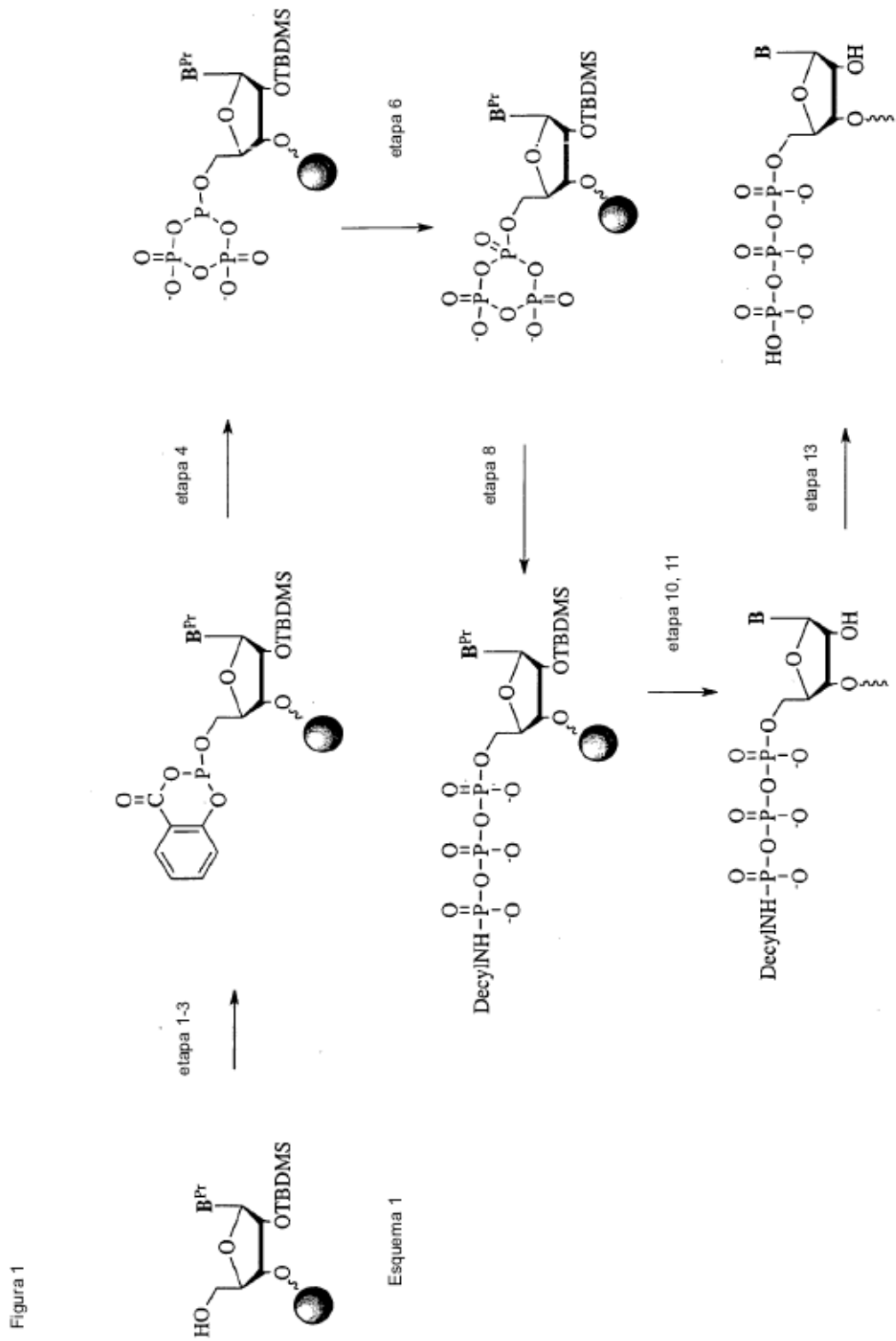


Figura 2A

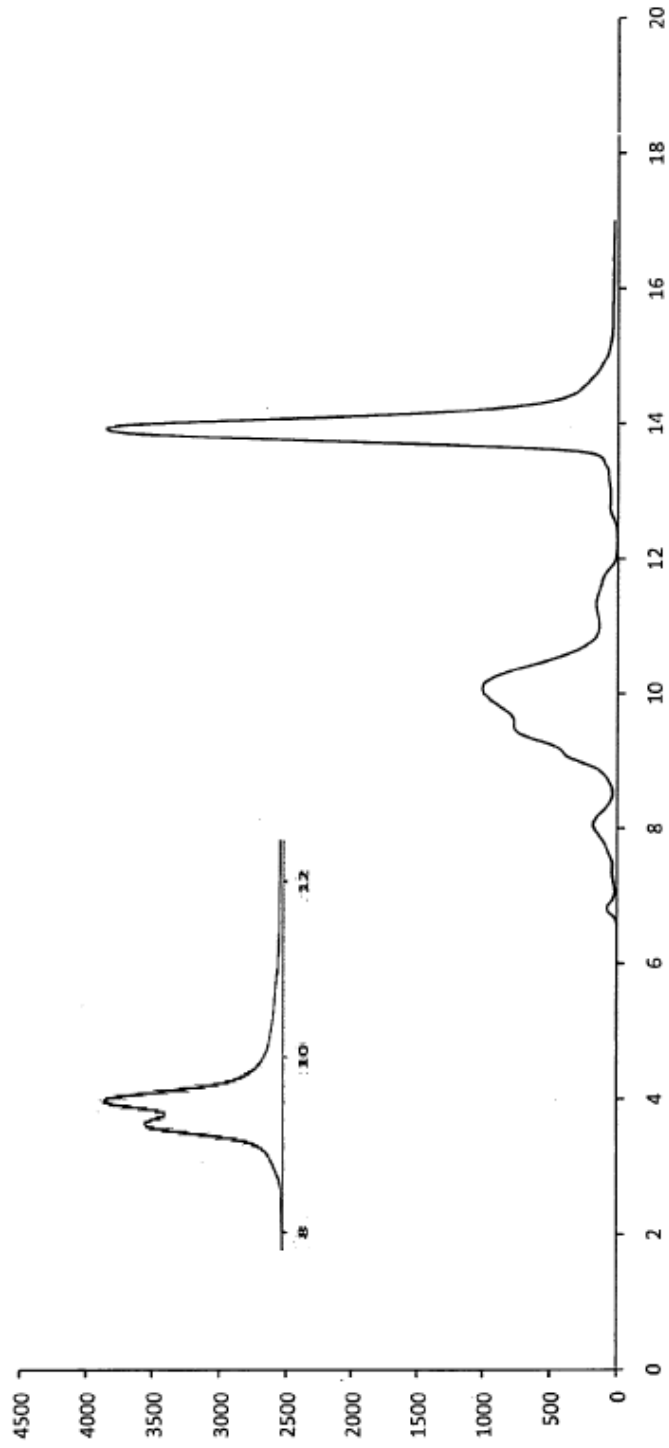


Figura 2B

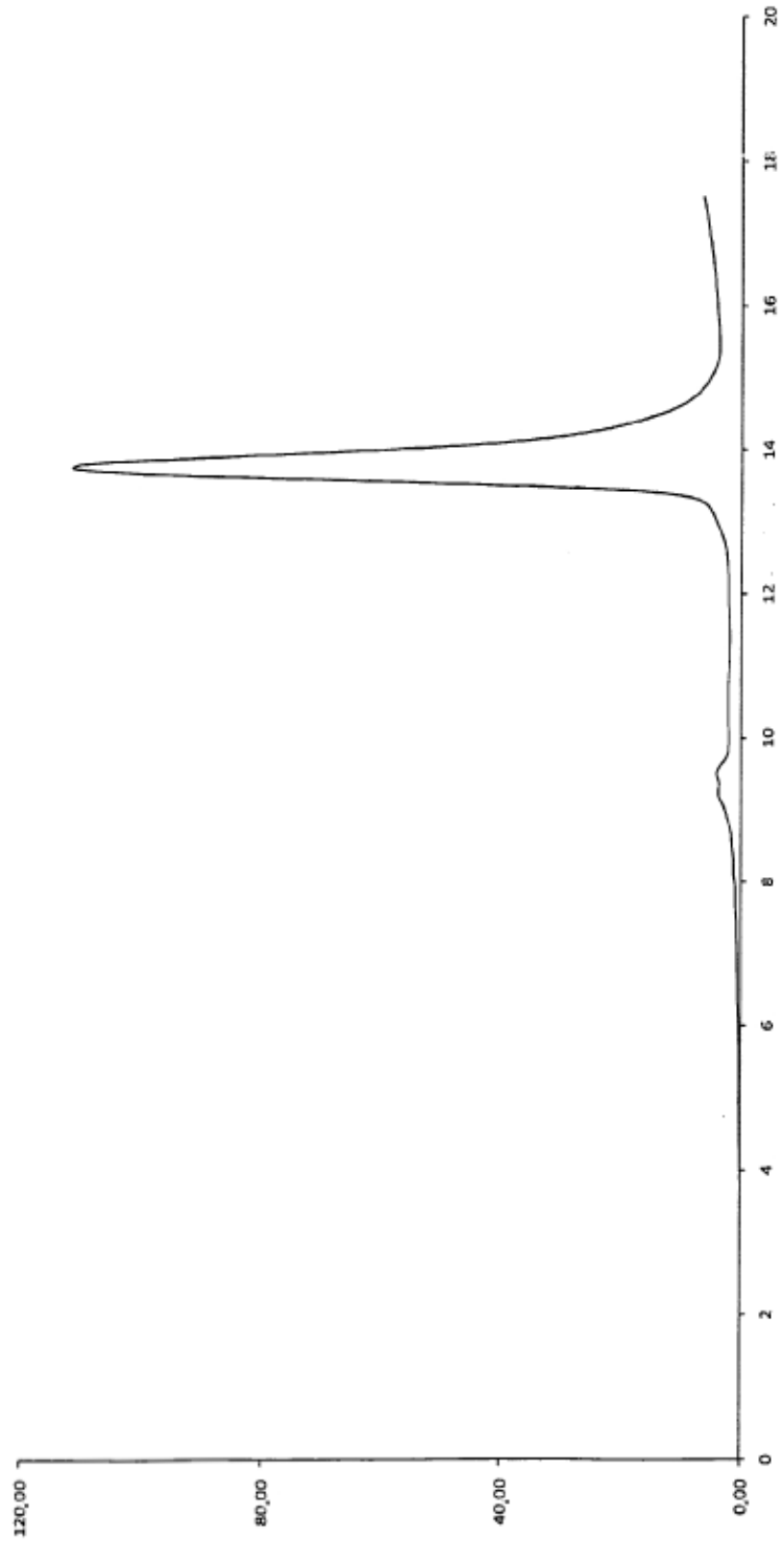


Figura 2C

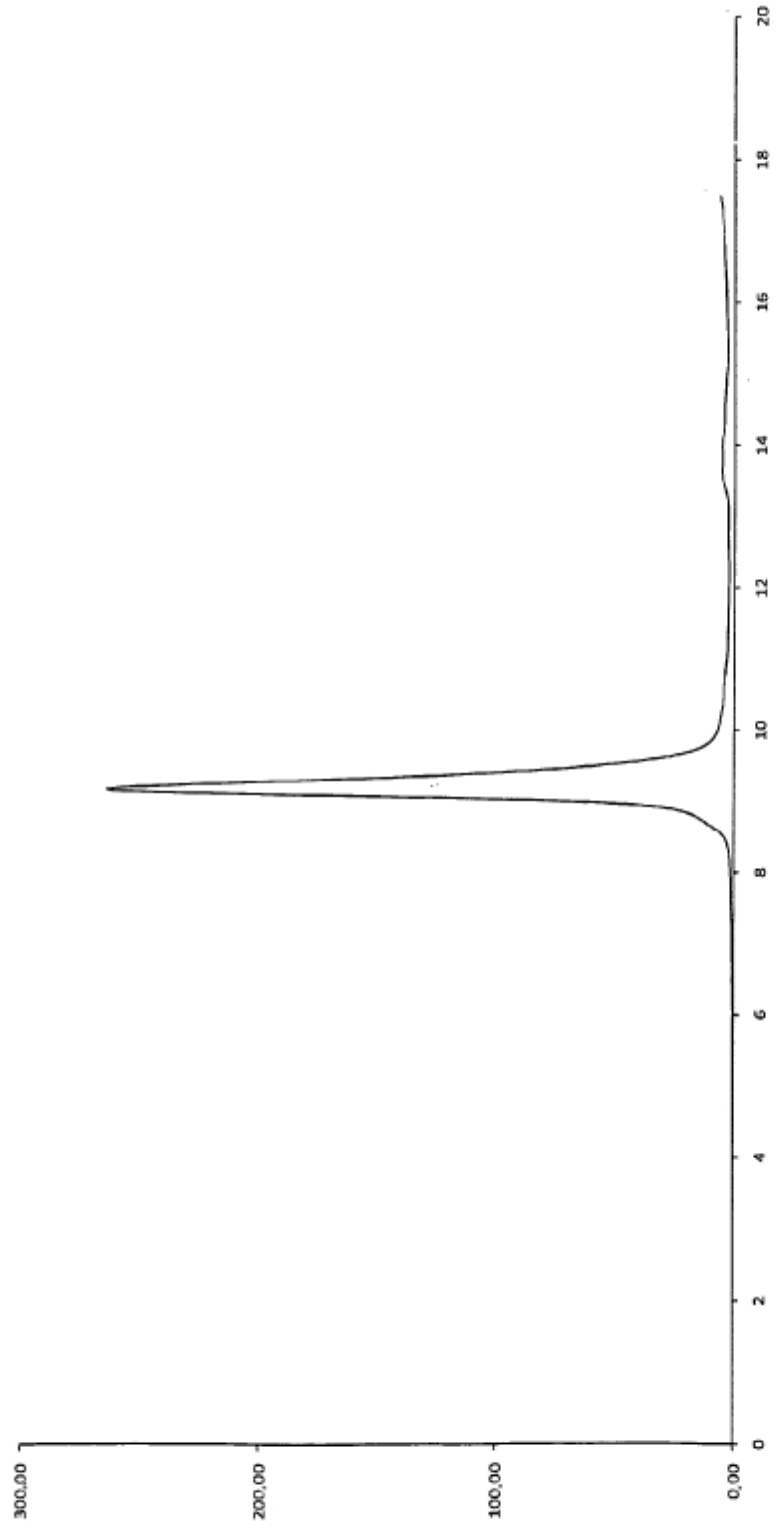
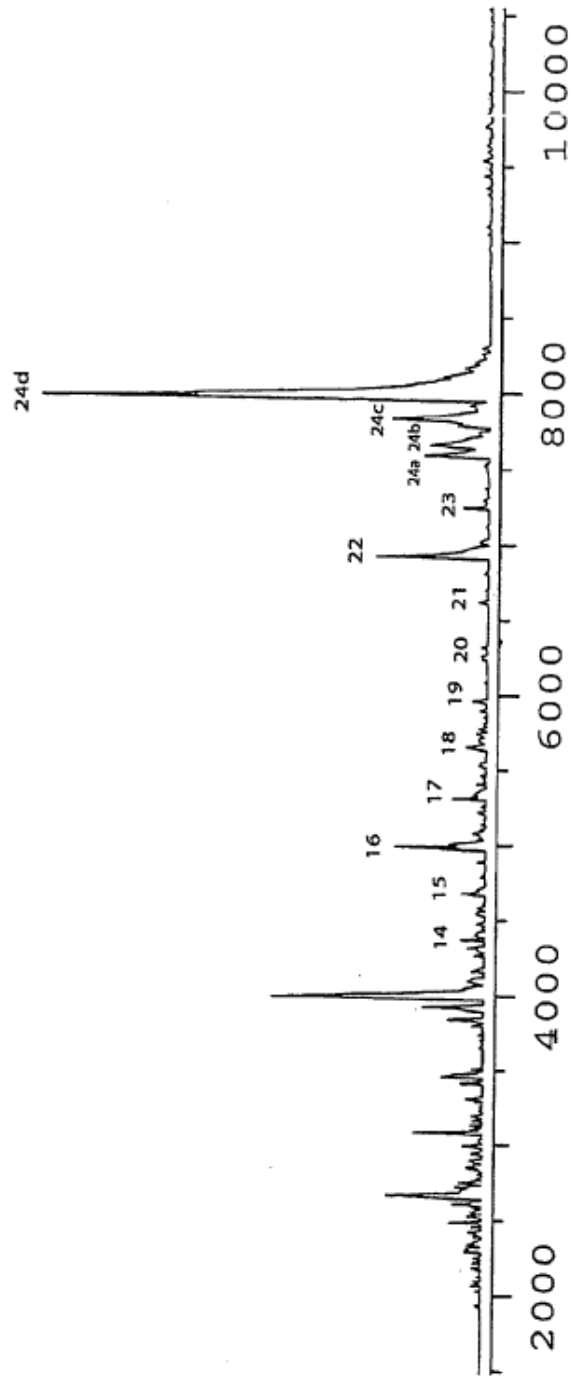


Figura 3A



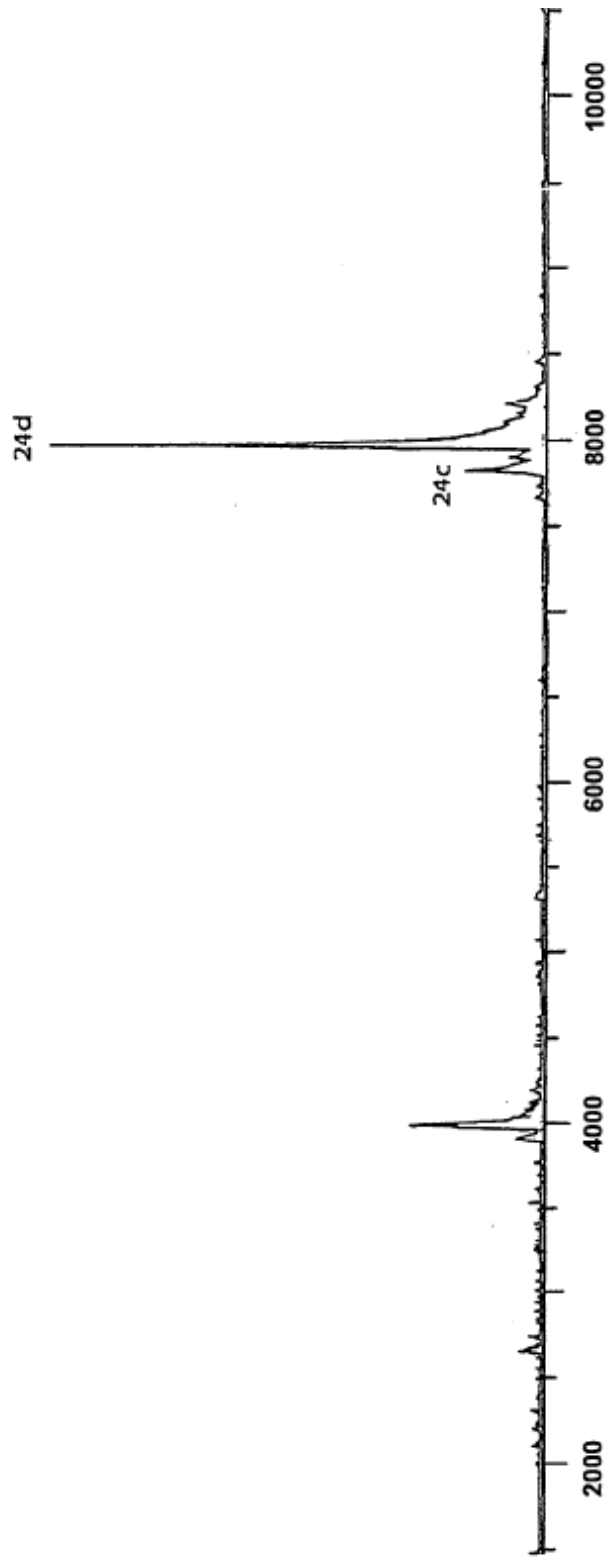
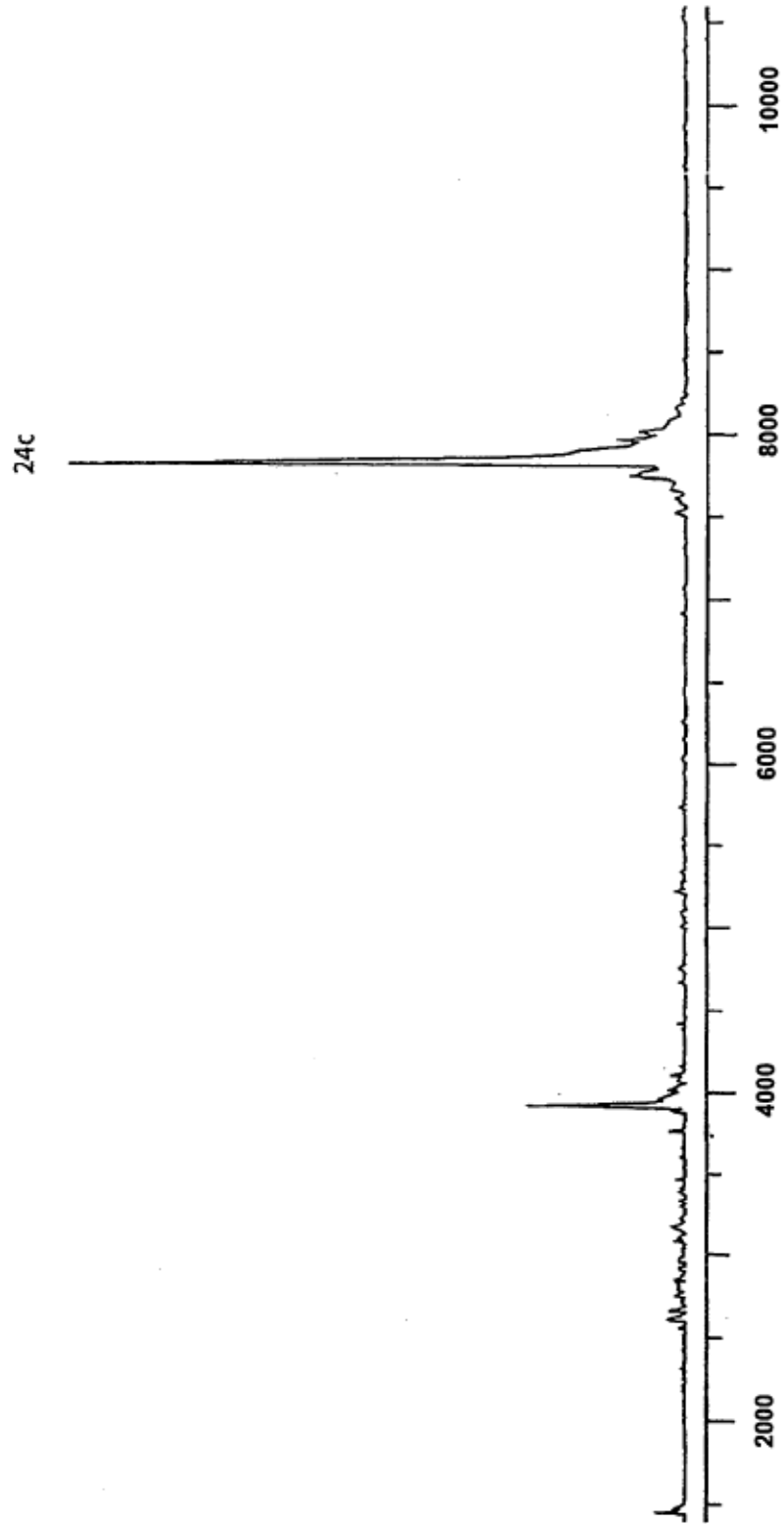


Figura 3B

Figura 3C



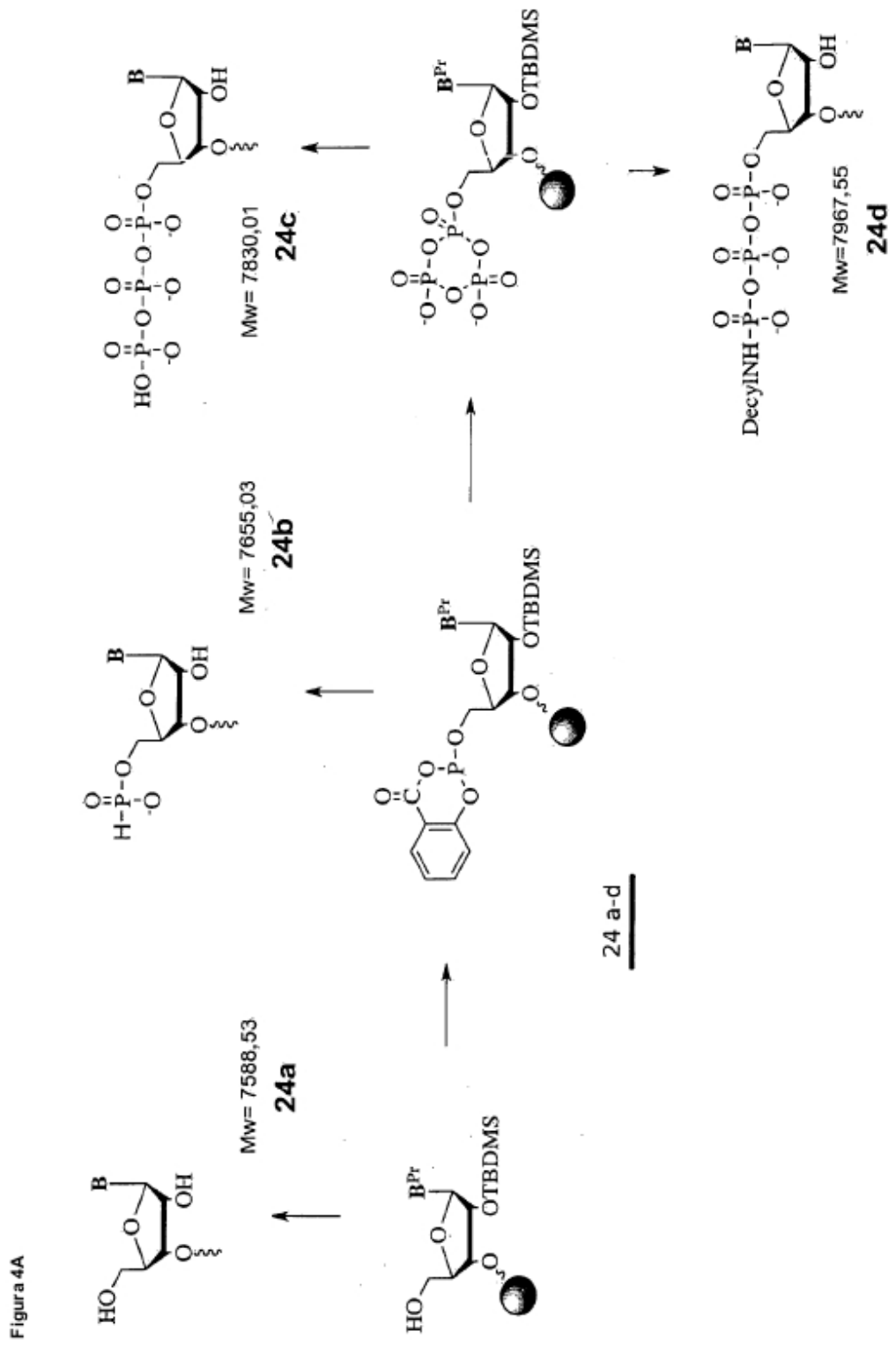
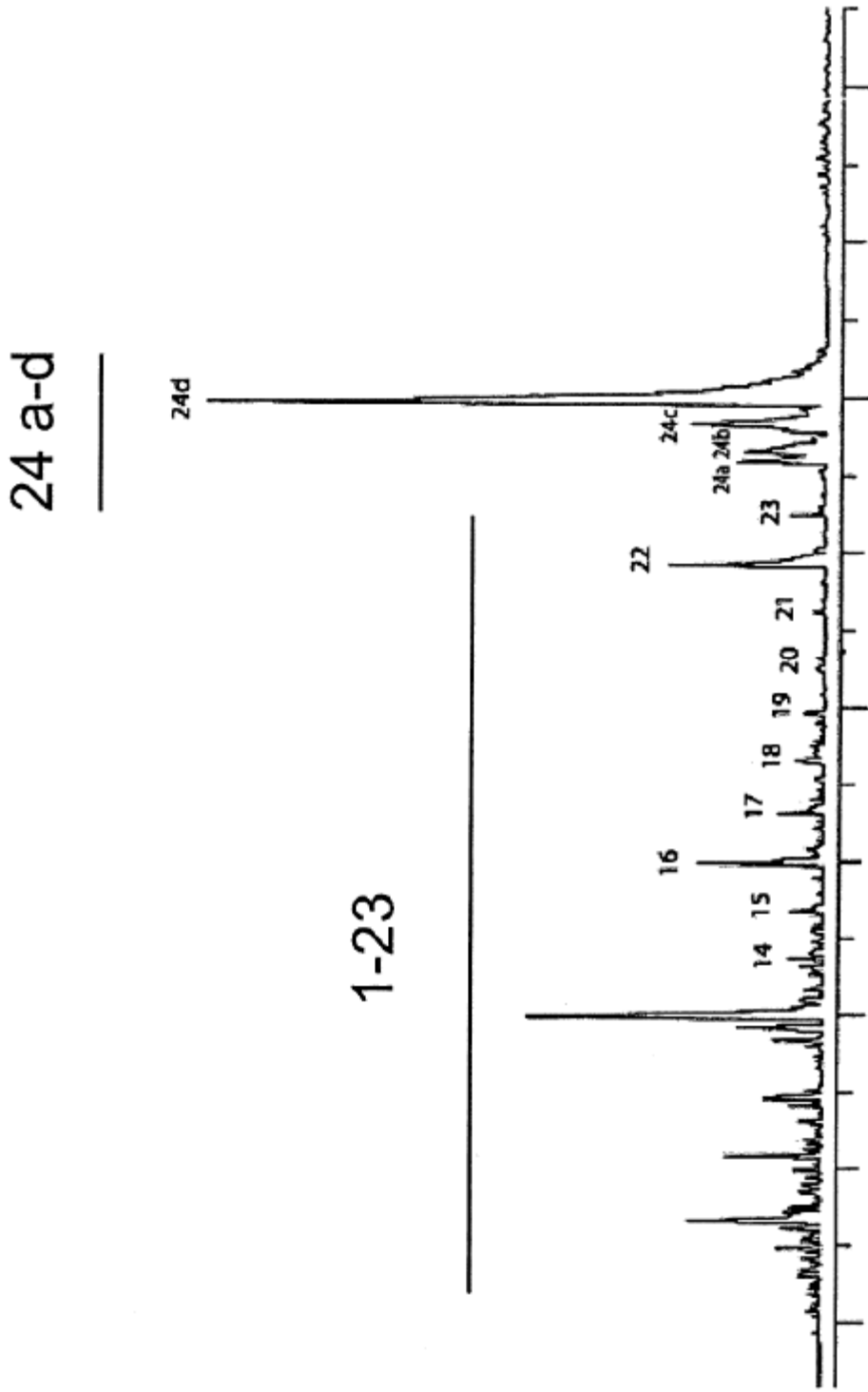


Figura 4B



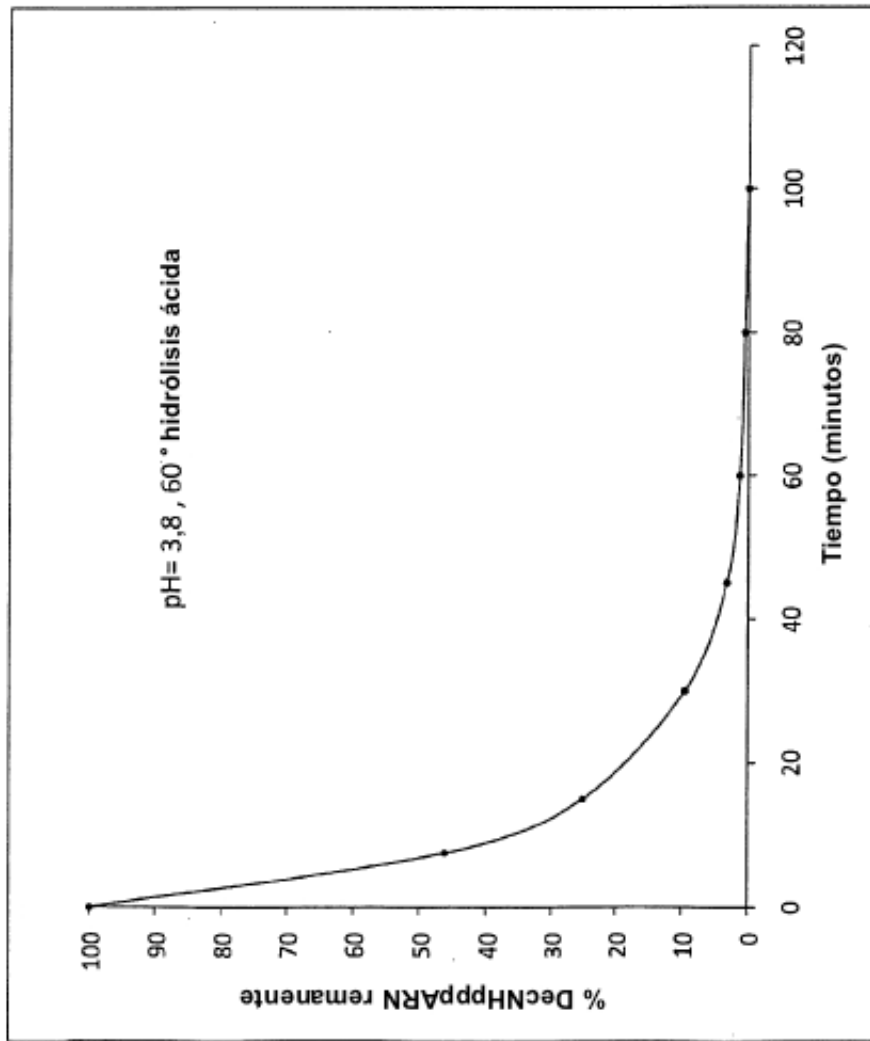


Figura 5

Figura 6A

pppARN 21 mer

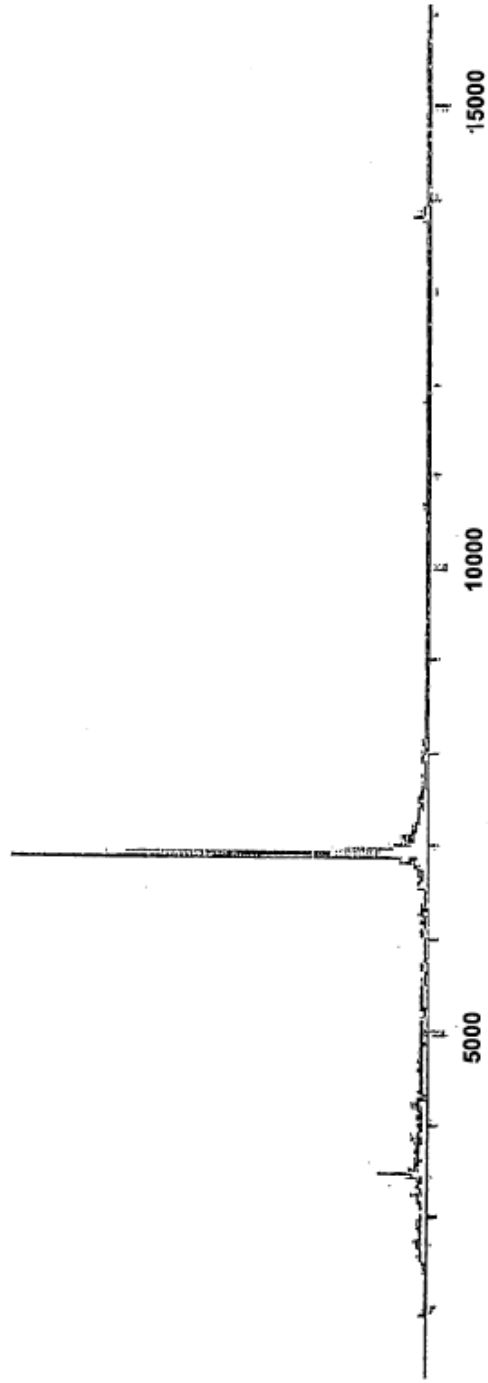


Figura 6B

pppARN 24 mer

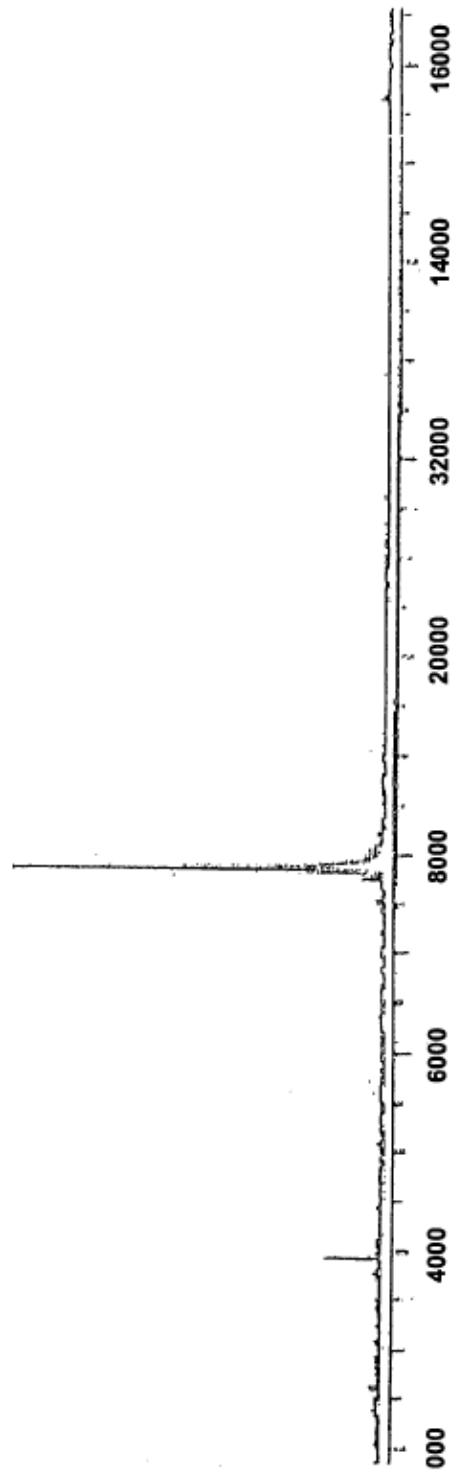
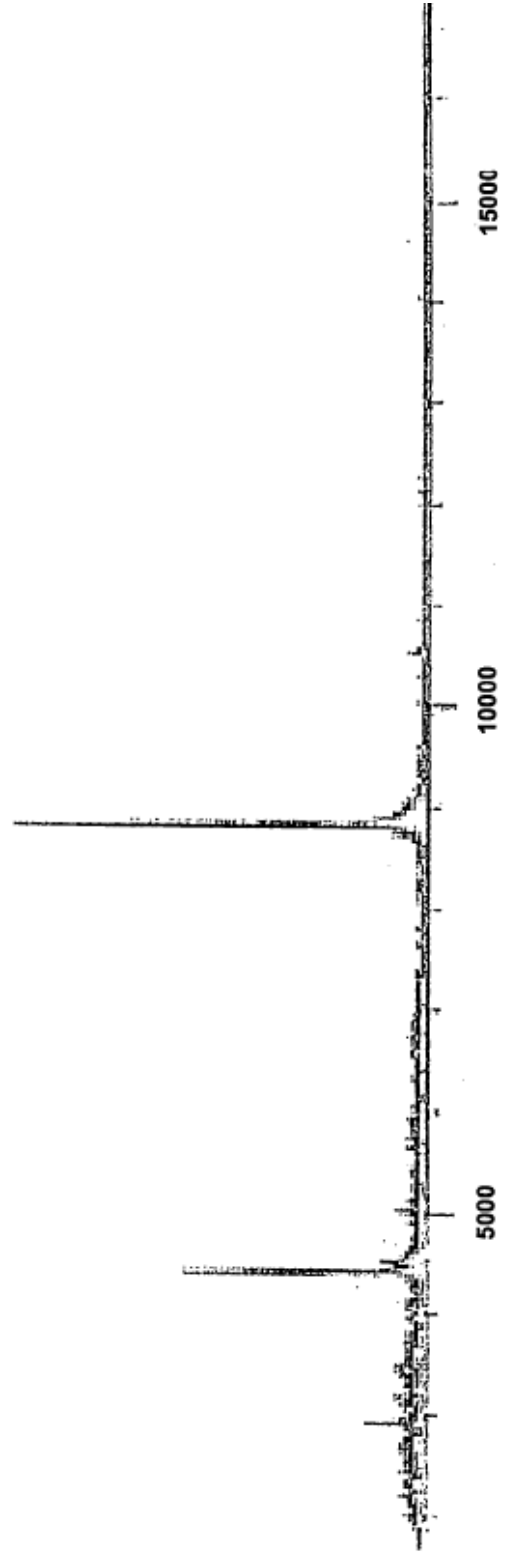


Figura 6C

pppARN 27 mer



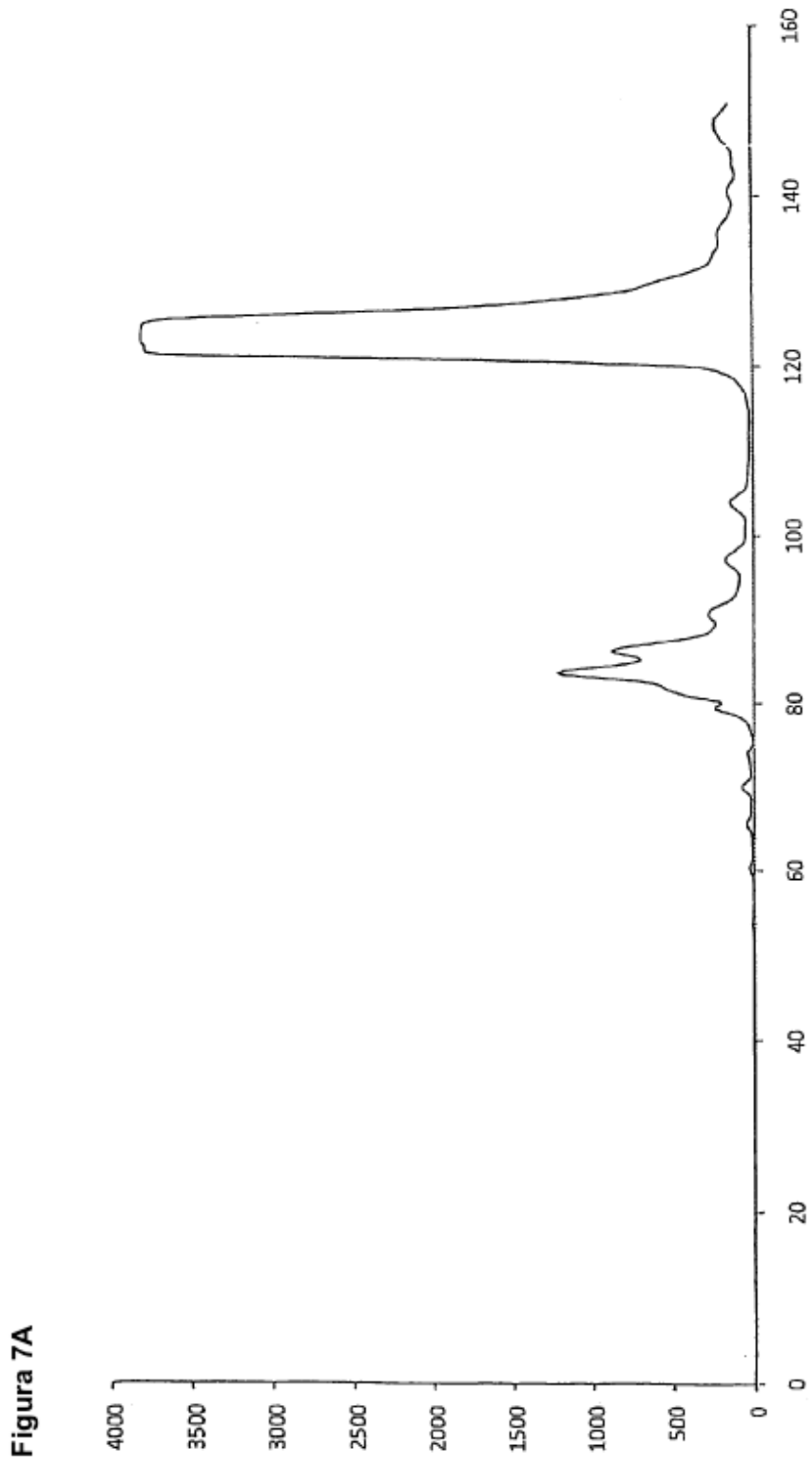


Figura 7B

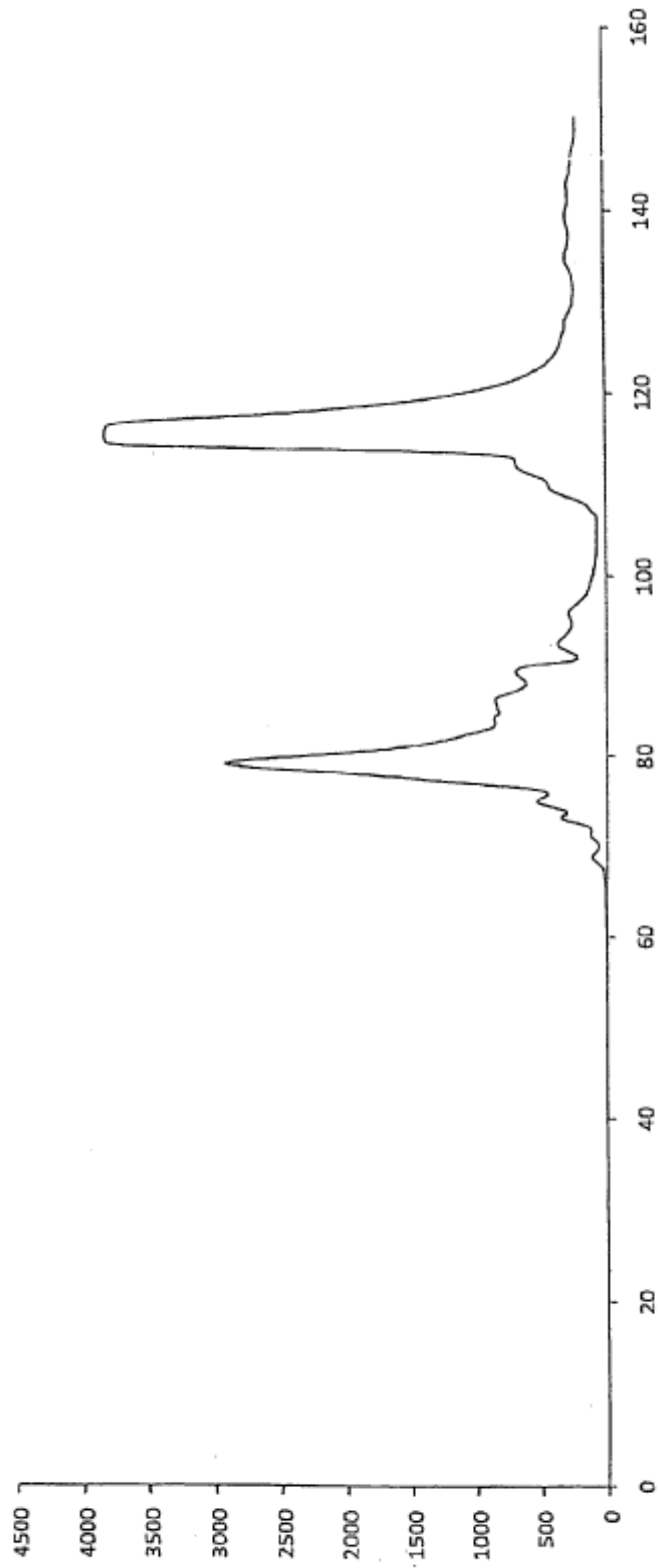


Figura 7C

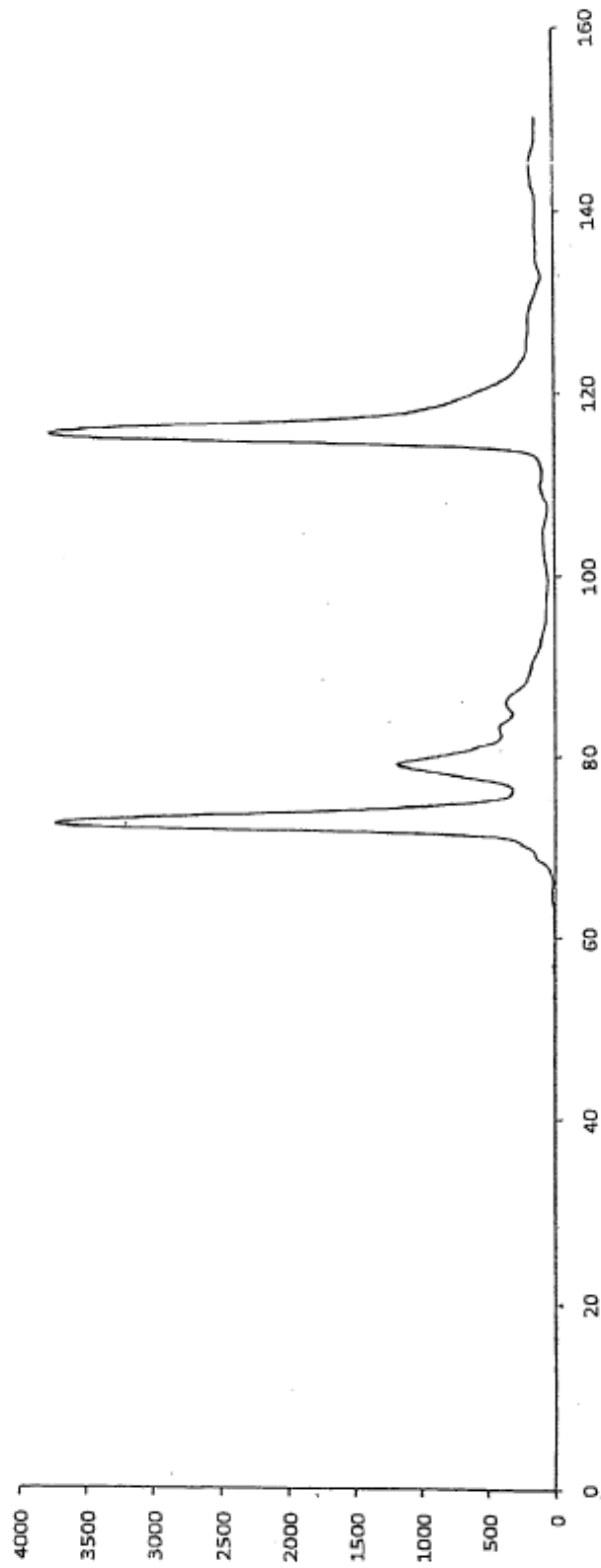
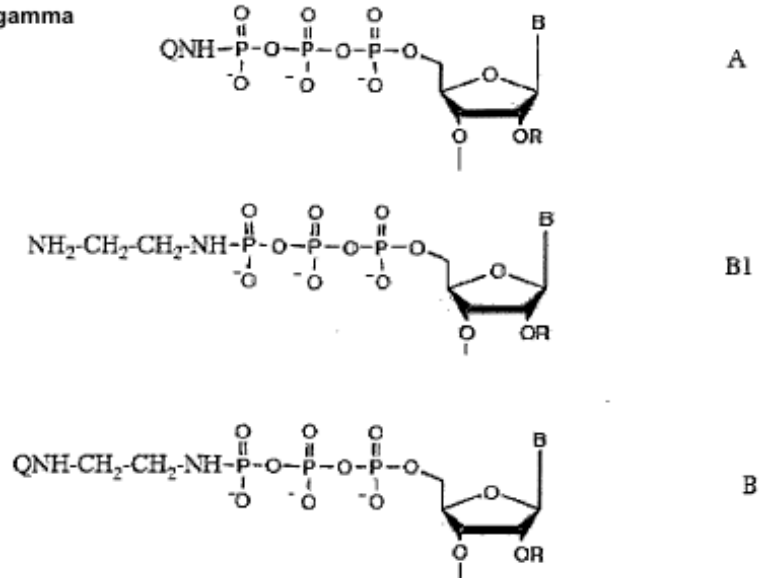


Figura 8

modificación gamma



Q=alquilo R>12, aminoácidos, péptidos, aminoácidos análogos, lípidos, fosfolípidos

cadena extendida

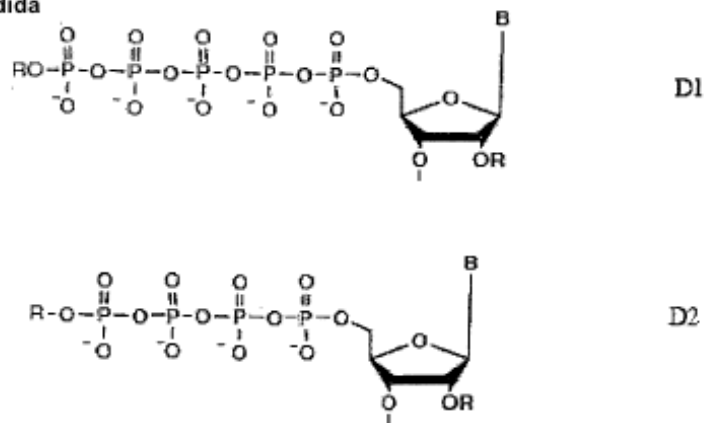
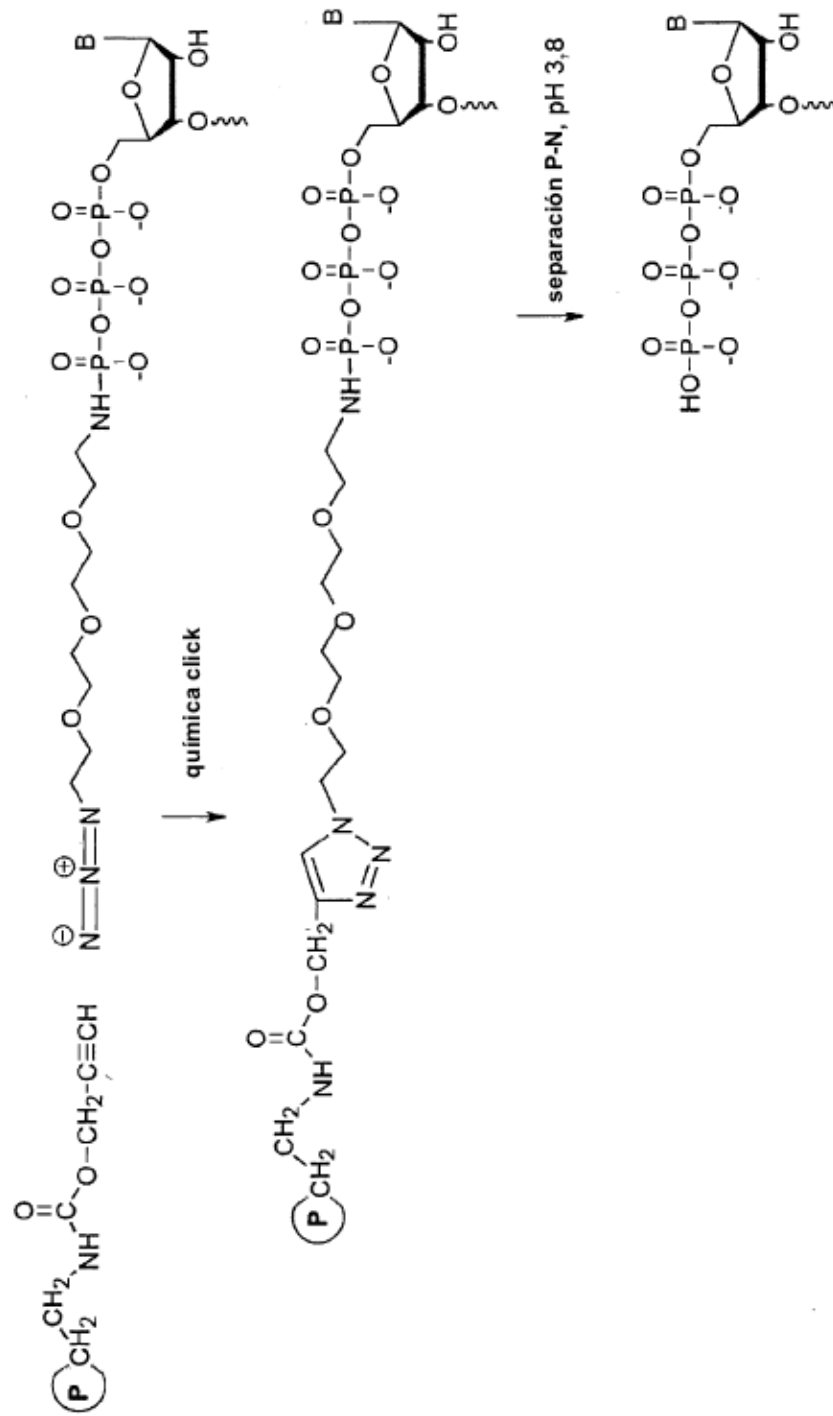
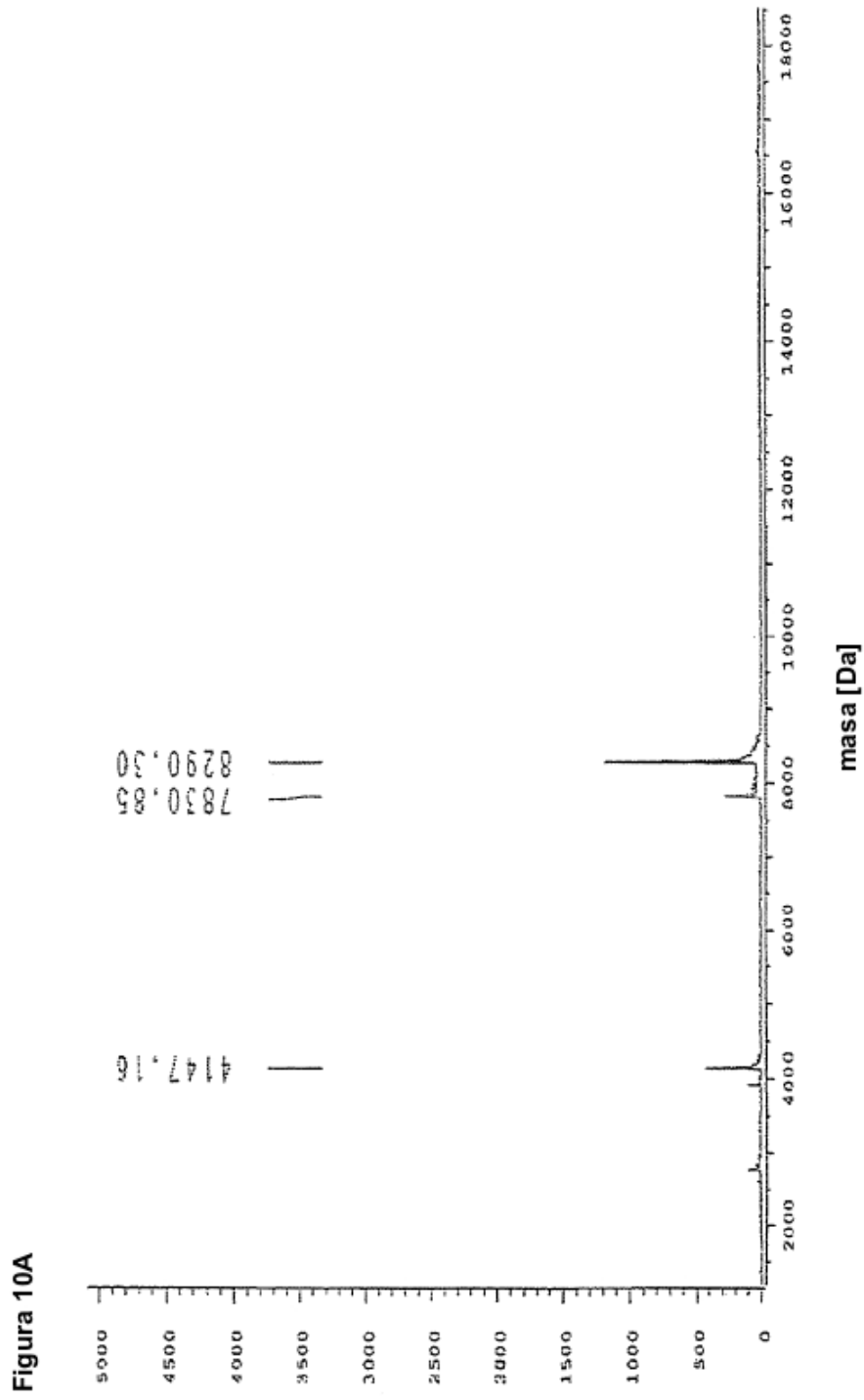


Figura 9B





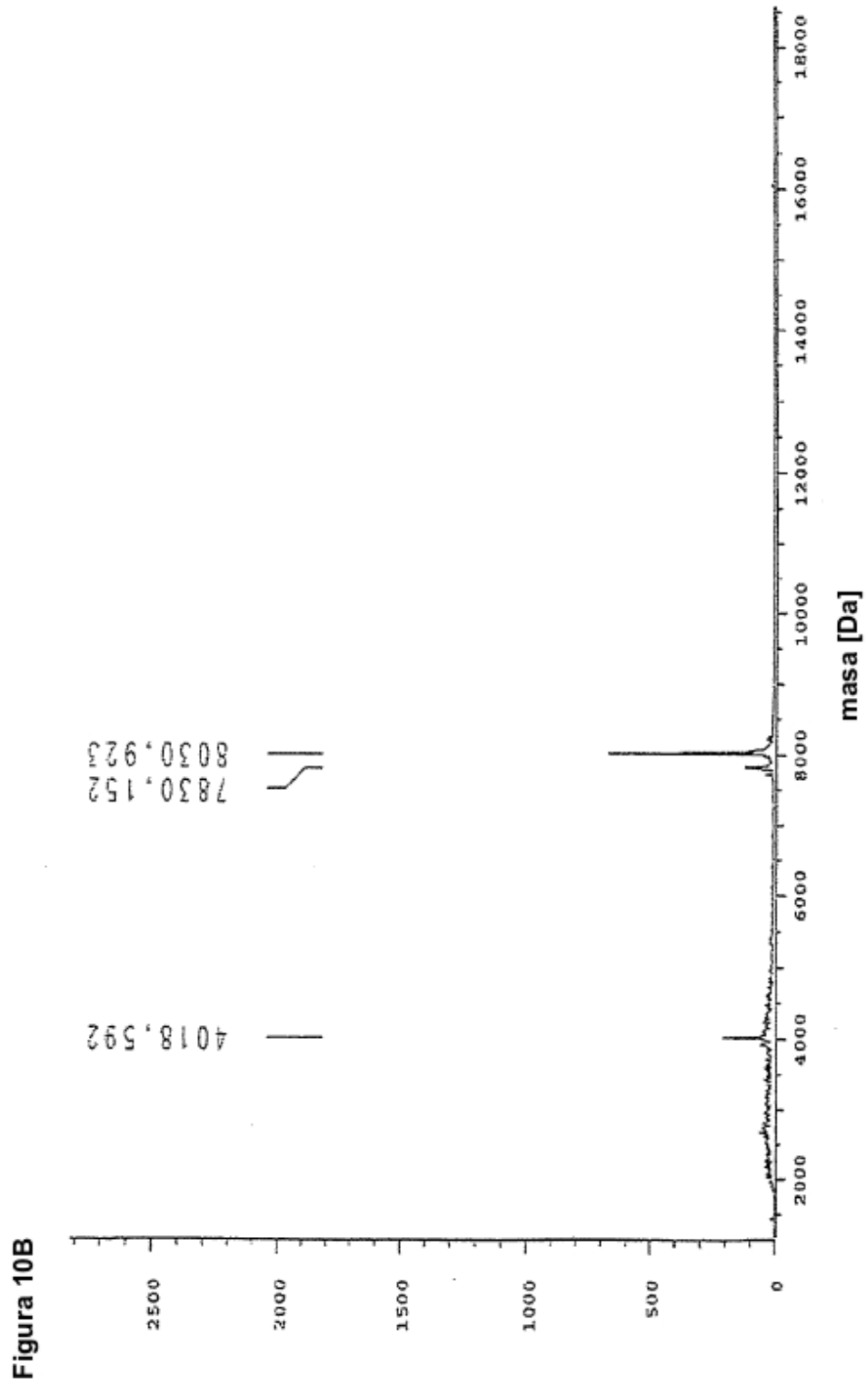


Figura 11

