

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 373**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013** **PCT/EP2013/070117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014** **WO14049079**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013** **E 13774100 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018** **EP 2903997**

54 Título: **Nuevos ligandos de RIG-I y métodos para producirlos**

30 Prioridad:

27.09.2012 EP 12186444

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

24.08.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOLDECK, MARION;
VAN DEN BOORN, JASPER;
LUDWIG, JÁNOS y
SCHUBERTH-WAGNER, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 679 373 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

Nuevos ligandos de RIG-I y métodos para producirlos

La presente invención se refiere a nuevos oligonucleótidos modificados con trifosfato que podrían actuar como ligandos de RIG-I, así como una composición farmacéutica que comprende los mismos, tal y como está definido en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

Schlee et al., en *Immunity*, 2009, 31, 25-34 y *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17, 781-787, describen ARN bicatenarios con extremos romos que llevan un resto 5'-O-trifosfato en una de las hebras y que actúan como estimulantes potentes del sistema inmunitario al fijarse a la helicasa RIG-I. Así pues, existe la necesidad de dar a conocer un método simple y eficaz para preparar oligonucleótidos modificados con trifosfato de gran pureza, idóneos para las aplicaciones farmacéuticas.

Se conoce bien en la técnica el acoplamiento de grupos trifosfato o de análogos de los mismos al grupo 5'-OH de compuestos nucleosídicos. Ludwig J. et al., en *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-635, describen un método de trifosforilación en solución para la preparación de los 5'-O-trifosfatos de nucleósidos y análogos mediante el uso de la 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona como agente fosfitilante. Gaur R. K. et al., en 1992, *Tetrahedron Letters*, 33, 3301-3304, describen el uso de dicho método en fase sólida para la síntesis de los 5'-O-trifosfatos de 2'-O-metilribonucleósido y sus análogos P_α-tio. En la patente de los EE. UU. 6.900.308 B2 se describe la síntesis en fase sólida de los 5'-O-trifosfatos de nucleósido modificados como posibles compuestos antivíricos, y en las patentes de los EE. UU. n.ºs 7.285.658, 7.598.230 y 7.807.653 se describen trifosfatos de análogos de nucleósidos con modificaciones en el azúcar, en la nucleobase y en la entidad del trifosfato.

En la solicitud de patente internacional WO 96/40159 se describe un método para producir ARN con caperuza o moléculas análogas al ARN, en donde un ARN u oligonucleótido con análogos al ARN se hace reaccionar con un agente fosfitilante, tal como la 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona o un derivado de la misma con sustituciones en el anillo. El intermedio resultante se hace reaccionar con un fosfato o pirofosfato o sal del mismo, oxidado o hidrolizado. Al ARN di- o trifosforilado o el análogo de ARN se le añade la caperuza al hacerlo reaccionar con un tri-, di- o monofosfato o análogo de m⁷G activada.

En la solicitud de patente internacional WO 2009/060281 se describen análogos de oligorribonucleótidos inmunoestimulantes que contienen restos de oligofosfatos modificados y métodos para preparar tales compuestos. Este método incluye la síntesis del oligonucleótido en un soporte sólido, la reacción de un nucleótido en un extremo en 5' del oligonucleótido con un fosfitilante, tal como la 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona en un solvente idóneo y en presencia de una base, la reacción del oligonucleótido fosfitilado con un pirofosfato o análogo de pirofosfato, la oxidación del oligonucleótido con un oxidante, y la desprotección del oligonucleótido para dar un oligonucleótido modificado con trifosfato o con análogo de trifosfato.

La electroforesis en gel de poliacrilamida, tal y como se empleó en la solicitud de patente internacional WO 96/40159, es aplicable sólo a las separaciones a pequeña escala. El poder de resolución de la cromatografía de intercambio iónico es insuficiente para los productos 5'-mono-, di- o trifosforilados de los oligorribonucleótidos más largos. Las condiciones de desnaturalización necesarias hacen que la separación sea una tarea tediosa (Sproat, 1999; Zlatev et al. *Organic Letters* 12 (10): 2190-2193 (2010); solicitud de patente internacional WO 2009/060281), además, los productos suelen estar contaminados con secuencias de longitud n - 1 y n - 2, y sus mono- y difosfatos, lo que hace que no estén suficientemente puros. Dada la sensibilidad por las estructuras terminales precisas de los ligandos de RIG-I, estos métodos de purificación son subóptimos para las aplicaciones farmacológicas.

Los documentos WO 2011/02818 A1 y WO 2012/130886 y EP 2508530 A1 describen oligonucleótidos 5'-trifosforilados, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos oligonucleótidos, así como la síntesis de dichos oligonucleótidos 5'-trifosforilados.

Así pues, son muy necesarios nuevos oligonucleótidos trifosforilados y análogos de los mismos, en particular que tengan selectividad por RIG-I, así como los métodos para preparar tales compuestos.

La presente invención se refiere a nuevos oligonucleótidos 5'-trifosforilados que se pueden producir a gran escala para el posible uso clínico.

Más en concreto, la presente invención hace referencia a un oligonucleótido que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde el oligonucleótido comprende

una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos

5' GACGCUG_fACCCUGAA_mGUUCAUC_{PTO}U_{fPTO}U 3'; y

una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos

3' CUG_mCGACUGGGAC_fUUCAAGUAG_{PTO}A_{PTO}A 5'; o

una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos

5' G_{PTO}A_{PTO}CGCUG_fACCCUGAA_mGUUCAUC_{PTO}U_{fPTO}U 3'; y

una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos

3' CUG_mCGACUGGGAC_fUUCAAGUAG_{PTO}A_{PTO}A 5'; o

en donde

el nucleótido con subíndice m está 2'-O-metilado;

10 el nucleótido con subíndice f es 2'-fluoro; y

el subíndice PTO entre dos nucleótidos indica que dichos dos nucleótidos están conectados por un enlace de fosfotioato; y

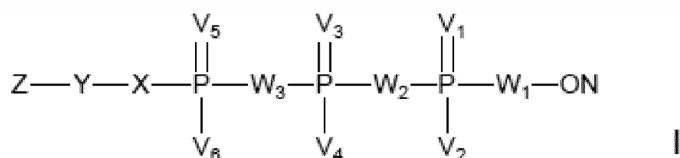
en donde la hebra sentido comprende un trifosfato en el extremo 5'.

En una realización preferida de la presente invención, el oligonucleótido es un ligando de RIG-I.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de la presente invención. La composición farmacéutica se podría administrar sistémicamente, p. ej., por vía intraperitoneal, intramuscular o intravenosa, o localmente, tal como por vía intranasal, subcutánea, intradérmica o intratecal. En una realización preferida, la composición farmacéutica es para la administración intradérmica, tal como mediante tatuaje, micropunción y/o parches con microagujas.

20 También se describe un método de preparación cómodo para tales oligonucleótidos. Además, se describen modificaciones de oligonucleótidos que instauran, mantienen y/o mejoran la selectividad por RIG-I que tienen los oligonucleótidos, o que mejoran su estabilidad química.

Así pues, la presente descripción hace referencia a un oligonucleótido modificado de fórmula (I)



25 en donde V₁, V₃ y V₅ se seleccionan independientemente en cada caso de O, S y Se;

V₂, V₄ y V₆ se seleccionan independientemente en cada caso de OH, OR¹, SH, SR¹, F, NH₂, NHR¹, N(R¹)₂ y BH₃M⁺,

W₁ es O o S,

W₂ es O, S, NH o NR²,

W₃ es O, S, NH, NR², CH₂, CHHal o C(Hal)₂,

30 R¹, R² y R³ se seleccionan de alquilo(C₁₋₆), alqueno(C₂₋₆), alquino(C₂₋₆), acilo(C₂₋₆) o un grupo cíclico, cada uno optativamente sustituido,

o en donde dos R¹ podrían formar un anillo junto con un átomo de N fijado a ellos,

M⁺ es un catión,

X es NH, NR³, O o S,

35 Z representa una etiqueta de captura o H,

Y representa un enlace o un conector que conecta la etiqueta de captura a X, y

ON representa un oligonucleótido que comprende al menos 4 elementos fundamentales nucleotídicos o de análogos de nucleótidos.

El término «oligonucleótido» en el contexto de la presente descripción abarca los compuestos que comprenden numerosos, p. ej., al menos 4, elementos fundamentales nucleotídicos o de análogos de nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende de 6 a 100, p. ej., de 20 a 40 elementos fundamentales. los elementos fundamentales nucleotídicos o de análogos de nucleótidos podrían comprender subunidades nucleosídicas o de análogos de nucleósidos conectadas por enlaces entre subunidades. Las subunidades nucleosídicas incluyen subunidades de desoxirribonucleósidos, subunidades de ribonucleósidos y/o análogos de los mismos, en concreto análogos nucleosídicos modificados en el azúcar y/o en la nucleobase. Además, los oligonucleótidos podrían comprender elementos fundamentales no nucleotídicos y/o otras modificaciones de los extremos y/o de las cadenas laterales.

En las subunidades con el azúcar modificado preferidas, el 2'-OH de una subunidad ribonucleosídica está remplazada por un grupo seleccionado de OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR² o CN, en donde R es alquilo(C₁₋₆), alquenilo(C₂₋₆) o alquinilo(C₂₋₆), y halo es F, Cl, Br o I. En otras subunidades con el azúcar modificado preferidas, la ribosa podría estar sustituida, p. ej., por otro azúcar, por ejemplo, una pentosa, tal como arabinosa. Esta modificación del azúcar se podría combinar con modificaciones del 2'-OH tal y como está descrito más arriba, tal como en las subunidades de 2'-fluroarabinonucleósido. Aún otras subunidades con el azúcar modificado preferidas incluyen nucleósidos bloqueados (ANB) o 2',3'-seco-nucleósidos (AND). En los elementos fundamentales nucleosídicos con la nucleobase modificada preferidos, se utiliza una nucleobase no estándar, p. ej., nucleobase que que no aparece en la naturaleza, en vez de una nucleobase estándar. Ejemplos de nucleobases no estándares son los uracilos o las citosinas modificados en la posición 5, p. ej., 5-(2-amino)propiluracilo o 5-bromouracilo; hipoxantina; 2,6-diaminopurina; adeninas o guaninas modificadas en la posición 8, p. ej., 8-bromoguanina; desazanucleósidos, p. ej., 7-desazaguanina o 7-desazaadenina; o nucleobases O- y N-alquiladas, p. ej., N⁶-metiladenina o N⁶,N⁶-dimetiladenina. Otros análogos de nucleobases idóneos se podrían seleccionar de análogos de nucleobases universales, tales como 5-nitroindol.

El enlace entre las subunidades podría ser un enlace fosfodiéster o un enlace modificado, p. ej., un fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, boranofosfato u otro enlace modificado que sea conocido por el experto en la técnica.

El oligonucleótido se podría seleccionar de análogos de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y oligonucleótidos. Los análogos de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/u oligonucleótidos podrían estar modificados químicamente en el nucleósido y/o la subunidad de ribosa del análogo, desoxirribonucleótido, ribonucleótido y/u oligonucleótido. Los análogos de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos podrían comprender al menos una subunidad de desoxirribonucleósido o de ribonucleósido y al menos una subunidad nucleosídica modificada y/o al menos un enlace entre subunidades modificado, p. ej., tal y como está descrito más arriba. Los análogos de oligonucleótidos podrían también consistir en su totalidad en subunidades nucleosídicas modificadas.

El oligonucleótido podría ser una molécula monocatenaria o una molécula bicatenaria. Los oligonucleótidos bicatenarios podrían comprender hebras completa o parcialmente complementarias. Las moléculas bicatenarias podrían tener los extremos romos o comprender al menos una protuberancia, p. ej., una protuberancia en 5' o 3'. Las protuberancias, si están presentes, están preferiblemente localizadas en el extremo distal de la molécula (con respecto al grupo trifosfato/análogo de trifosfato). Los oligonucleótidos bicatenarios podrían también comprender una estructura en horquilla, en donde el dúplex está cerrado por un lazo en el extremo distal del mismo (con respecto al grupo trifosfato/análogo de trifosfato). El lazo podría comprender elementos fundamentales nucleotídicos y/o no nucleotídicos, por ejemplo, elementos fundamentales con dioles, tales como restos de etilenglicol, p. ej., tri(etilén)glicol o hexa(etilén)glicol; propano-1,3-diol; dodecano-1,12-diol o 3,12-dioxa-7,8-ditiatetradecano-1,14-diol.

En una realización preferida, las moléculas bicatenarias tienen los extremos romos, en concreto en el extremo proximal de las mismas (con respecto al grupo trifosfato/análogo de trifosfato).

Según una realización especialmente preferida, el oligonucleótido es bicatenario, en donde cada hebra de la doble cadena tiene una longitud de al menos 19 nucleótidos. Se prefiere en especial un oligonucleótido bicatenario con extremos romos de tal longitud. Según otra realización preferida, cada hebra del oligonucleótido tiene una longitud de al menos 19 a 50 nucleótidos, de 19 a 30 nucleótidos, de 20 a 30 nucleótidos, de 22 a 28 nucleótidos, se prefieren especialmente de 22 a 26 nucleótidos.

El oligonucleótido podría comprender otras modificaciones en los extremos y/o de las cadenas laterales, p. ej., la unión covalente de entidades que actúan selectivamente sobre una célula. Estas entidades podrían promover la captación celular o la captación específica de célula, e incluyen, por ejemplo, lípidos, vitaminas, hormonas, péptidos, oligosacáridos y análogos de los mismos. Las entidades que actúan selectivamente podrían estar, p. ej., unidas a los elementos fundamentales con nucleobases modificadas o no nucleotídicos mediante los métodos conocidos por el experto en la técnica.

Según una realización preferida, las modificaciones instauran y/o realzan la selectividad del oligonucleótido por una

diana dada. En una realización particularmente preferida, se instaure o se mejore la selectividad por RIG-I que tiene el oligonucleótido. Los métodos para determinar la selectividad por RIG-I que tiene un oligonucleótido dado se describen en la presente memoria con detalle (consúltense los ejemplos) y/o los conoce el experto en la técnica.

- 5 Según otra realización preferida, las modificaciones químicas mantienen o mejoran la estabilidad química del oligonucleótido. El experto en la técnica conoce los métodos para determinar la estabilidad química de un oligonucleótido dado. Tales métodos están descritos también, p. ej., en los ejemplos.

Según una realización preferida, las modificaciones químicas del oligonucleótido se seleccionan independientemente del grupo que comprende halogenación, en concreto, F-halogenación, 2'-O-alquilación, en concreto, 2'-O-metilación y/o modificaciones con fosforotioato de los enlaces entre nucleótidos. En concreto, la F-halogenación y las
10 modificaciones con fosforotioato incrementan la estabilidad del oligonucleótido, mientras que la 2'-O-metilación instaure o incremente la selectividad por RIG-I que tiene el oligonucleótido. Las 2'-O-metilaciones también son capaces de modificar la inmunogenia del ARN. En una realización preferida, un oligonucleótido sólo comprende una o dos 2'-O-metilaciones por hebra, más preferiblemente una 2'-O-metilación por hebra.

- 15 La sustitución 2'-F es particularmente preferida. En la posición 2' de la ribosa, el grupo hidroxilo está sustituido por fluoro. Las sustituciones 2'-F en los ARN dan lugar, en particular, a una mejora de la estabilidad frente a la digestión por las nucleasas. En otra realización, una 2'-fluoro-sustitución podría aumentar en particular una inmunoestimulación dependiente de RIG-I.

En la presente memoria, los compuestos con fosforotioato hacen referencia en general a modificaciones con fosforotioato de los enlaces entre los nucleótidos.

- 20 Se prefieren en especial los compuestos modificados con fosforotioato que tienen una modificación en el extremo terminal del oligonucleótido. Durante la modificación con fosforotioato, el átomo de oxígeno sin fijar del fosfato puente se sustituye por un átomo de azufre en el esqueleto de un ácido nucleico. Esta sustitución reduce significativamente la capacidad de escisión de esta posición por la acción de las nucleasas, y da lugar a una mayor estabilidad de la hebra del ácido nucleico.

- 25 En una realización especialmente preferida, un oligonucleótido de acuerdo con la presente invención muestra F-halogenación, metilación, en particular 2'-O-metilación, así como modificaciones con fosforotioato, en particular en un extremo terminal del oligonucleótido.

Los patrones de identificación de un oligonucleótido dado dependen de la secuencia y de la longitud de un oligonucleótido y se pueden determinar para cada oligonucleótido dado. El experto en la técnica conoce
30 perfectamente cómo llevar a cabo esta determinación.

Tal y como ya está explicado más arriba, en la presente descripción se describen con detalle tales métodos para determinar la selectividad por RIG-I y/o la estabilidad de un oligonucleótido dado.

- El oligonucleótido de la fórmula (I) o (IV) comprende un grupo trifosfato/análogo de trifosfato. En este grupo, V_1 , V_3 y V_5 se seleccionan independientemente de O, S y Se. Preferiblemente, V_1 , V_3 y V_5 son O. V_2 , V_4 y V_6 en cada caso se
35 seleccionan independientemente de OH, OR^1 , SH, SR^1 , F, NH_2 , NHR^1 , $N(R^1)_2$ y BH_3M^+ . Preferiblemente, V_2 , V_4 y V_6 son OH. R^1 podría ser alquilo(C_{1-6}), alqueniilo(C_{2-6}), alquiniilo(C_{2-6}), acilo(C_{2-6}) o un grupo cíclico, p. ej., un grupo ciclo(hetero)alquilo(C_{3-8}), un grupo ciclo(hetero)alqueniilo(C_{3-8}), fenilo o un grupo heteroarilo(C_{5-6}), en donde los heteroátomos se seleccionan de N, O y S. Además, dos R^1 podrían formar un anillo, p. ej., un anillo de 5 o 6 miembros junto con un átomo de N unido a ellos. R^1 también podría comprender sustituyentes, tales como halo, p.
40 ej., F, Cl, Br o I, O(halo)alquilo(C_{1-2}) y, en el caso de los grupos cíclicos, (halo)alquilo(C_{1-2}). M^+ podría ser un catión orgánico o inorgánico, p. ej., un catión de metal alcalino o un amonio o un catión de amina.

W_1 podría ser O o S. Preferiblemente, W_1 es O. W_2 podría ser O, S, NH o NR^2 . Preferiblemente, W_2 es O. W_3 podría ser O, S, NH, NR^2 , CH_2 , $CHHal$ o $C(Hal)_2$. Preferiblemente, W_3 es O, CH_2 o CF_2 . R^2 podría seleccionarse de grupos como los descritos para R^1 más arriba. Hal podría ser F, Cl, Br o I.

- 45 De acuerdo con una realización especialmente preferida, V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , V_5 , V_6 , W_1 , W_2 y W_3 son O.

El grupo trifosfato/análogo de trifosfato está preferiblemente unido a un extremo del oligonucleótido. Preferiblemente, el grupo está unido al extremo 5' del oligonucleótido, en particular al grupo 5'-OH del azúcar del extremo 5' del mismo.

- 50 Tal y como se define en la presente memoria, Z representa una etiqueta de captura o H. La etiqueta de captura Z puede definirse funcionalmente mediante una serie de ejemplos verosímiles, tal y como se presentan más abajo. Una regla general podría ser: Z tiene que permitir una purificación cómoda y se debe poder retirar en las condiciones que son compatibles con los requisitos de estabilidad del pppARN. Un experto en la técnica es capaz de determinar sin mayor esfuerzo si una etiqueta dada cumple la definición funcional o no. Así pues, un experto en la técnica conoce perfectamente tales etiquetas de captura, en particular con respecto a los ejemplos detallados que se

ofrecen en la presente solicitud.

De acuerdo con una realización preferida, la etiqueta de captura Z se selecciona de un resto alifático de cadena larga, un compañero de una pareja de fijación no covalente de gran afinidad, una entidad química reactiva, Q o NHalquilo(C₂-C₂₄), en donde Q se selecciona preferiblemente de H, aminoácidos, análogos de aminoácidos, alquilo(C₁-C₂₄), preferiblemente alquilo(C₁₂-C₂₄), péptidos y lípidos. Sin embargo, según una realización especialmente preferida, Z es decilo, a saber, alquilo(C₁₀).

La etiqueta de captura Z es un resto capaz de interaccionar de manera covalente o no covalente con un reactivo de captura en las condiciones que permiten la separación para los compuestos que comprenden la etiqueta de captura, p. ej., el oligonucleótido (I) a partir de otras especies que no contienen la etiqueta de captura. Preferiblemente, el reactivo de captura es un reactivo inmovilizado o un reactivo capaz de ser inmovilizado.

Las etiquetas de captura idóneas son, por ejemplo, restos de alquilo alifático de cadena larga, p. ej., de C8-24, preferiblemente C13-24, más preferiblemente C13-C14, tales como octadecilo, u otros restos lipídicos/lipófilos, tales como, p. ej., colesterilo, tocoferilo o tritilo, y derivados de los mismos. Sin embargo, de acuerdo con una realización especialmente preferida, Z es un resto de decilo. En este caso, la entidad de trifosfato etiquetada se puede capturar y purificar en una fase sólida mediante cromatografía en fase inversa estándar, p. ej., RP-HPLC, o mediante cromatografía de interacción hidrófoba (CIH). La etiqueta de captura también podría ser una entidad de perfluoroalquilo, p. ej., un resto de 4-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)bencilo o 3-(perfluorooctil)propilo para la captura específica del oligonucleótido modificado con trifosfato en un soporte Fluorous Affinity, tal como el disponible comercialmente de Fluorous Technologies, Inc.

La etiqueta de captura podría ser un primer componente de una pareja de fijación no covalente de gran afinidad, tal como biotina, o un análogo de biotina, tal como destiobiotina, un hapteno o un antígeno, que tiene una gran afinidad (p. ej., una constante de fijación de 10⁻⁶ l/mol o menos) por el reactivo de captura, que es un segundo componente complementario de la pareja de fijación de gran afinidad, p. ej., una estreptavidina, una avidina o un anticuerpo.

La etiqueta de captura podría ser un primer componente de una pareja de fijación covalente, que podría formar un enlace covalente con el reactivo de captura, que es un segundo componente complementario de la pareja de fijación covalente, en donde el enlace covalente podría ser un enlace reversible o irreversible. En esta realización, el componente de la etiqueta de captura Z podría ser una entidad química reactiva, tal como una azida o un grupo alquinilo, que permite la reacción covalente con un reactivo de captura que contiene un grupo reactivo complementario, p. ej., un resto alquinilo o azido, respectivamente, en el caso de la reacción de la cicloadición de Huisen 3+2 (la mal llamada «reacción clic» que está catalizada por Cu(I) o una variante del mismo que transcurre sin iones de Cu(I) a través de la liberación de la fuerte tensión del anillo en, p. ej., derivados de ciclooctina). Un ejemplo específico para Z-Y-X en tal caso sería propargilamino.

El componente de la etiqueta de captura podría ser una entidad química que contiene un grupo nucleófilo adicional, por ejemplo, un segundo grupo amino en un reactivo de tipo NH₂-Y-XH. Se podrían usar entonces un amplio abanico de reactivos Z electrófilos e idóneos, tales como colesterol, clorofornato o ésteres activos de *N*-hidroxisuccinimida de biotina para introducir el grupo etiquetador mientras que el oligonucleótido está unido a la fase sólida, lo que extiende significativamente el alcance de la reacción de etiquetado.

En una realización preferida, la etiqueta de captura es un resto de alquilo de cadena larga, una entidad de perfluoroalquilo, una azida, o un grupo alquinilo.

El oligonucleótido podría llevar una segunda etiqueta de captura en una posición diferente, p. ej., en el extremo 3'. La primera y la segunda etiquetas de captura se seleccionan preferiblemente para permitir la purificación mediante dos métodos ortogonales para permitir la recuperación de material con una pureza extremadamente alta. Por ejemplo, la primera etiqueta de captura podría ser un grupo lipófilo que interacciona con un soporte cromatográfico idóneo, y la segunda etiqueta de captura podría ser biotina, que interacciona con la estreptavidina.

La segunda etiqueta de captura se podría introducir con comodidad al llevar a cabo la síntesis con un SVC (soporte de vidrio controlado) modificado para la síntesis de oligorribonucleótidos.

Y representa un enlace químico o un conector, p. ej., un alquilenio, preferiblemente un conector alquilenio(C₁₋₆), más preferiblemente un conector alquilenio(C₂₋₅) o un conector aralquilenio, que comprende optativamente heteroátomos o grupos que contienen heteroátomos, tales como O, S, NH, C=O o C=S, y/o que comprende optativamente enlaces C=C o C≡C. De acuerdo con una realización especialmente preferida, Y es un enlace.

En otra realización preferida, el conector es un óxido de polialquilenio, preferiblemente un óxido de polialquilenio(C₂-C₆), más preferiblemente un óxido de polialquilenio(C₂-C₃). El valor medio de la masa molecular del conector podría estar en el margen de 30 a 800 g/mol, preferiblemente de 40 a 450 g/mol, más preferiblemente de 40 a 250 g/mol. El conector podría ser [-CH₂CHR⁴-O]_n con n = 1-10, preferiblemente n = 1-7, más preferiblemente n = 2-5, e incluso más preferiblemente n = 3. R⁴ podría ser H o alquilo(C₁₋₆). Otras realizaciones preferidas de Y se muestran en la figura 4. En una realización preferida, R⁴ es H.

De acuerdo con una realización especialmente preferida,

X es NH u O,

Y es $-K-((CHR_1)_m-CH_2-O)_n-R-$, o

$(O-(CHR_3)_m-CH_2)_{n1}-(O-(CHR_2)_m-CH_2)_{n2}-(CHR_1)_{m1}-CH_2)_{n3}-$, y

5 K es O o NH,

m, m_1 , m_2 y m_3 son independientemente de 1 a 12, preferiblemente de 1 a 8, más preferiblemente de 1 a 5, e incluso más preferiblemente de 1 a 3,

n, n_1 , n_2 y n_3 son independientemente de 0 a 20, preferiblemente de 0 a 10, más preferiblemente de 0 a 5, e incluso más preferiblemente de 0 a 3, y

10 R_1 , R_2 y R_3 es independientemente H, alquilo(C_{1-6}), alqueno(C_{2-6}), alquino(C_{2-6}), acilo(C_{2-6}) o un grupo cíclico, cada uno optativamente sustituido, y

R es alquilo(C_{1-6}), alqueno(C_{2-6}), alquino(C_{2-6}), acilo(C_{2-6}) o un grupo cíclico, cada uno optativamente sustituido. Preferiblemente, R es CH_2CH_2 .

15 De acuerdo con una realización especialmente preferida en la que Y es tal y como está definido más arriba, R_1 y R_2 son H, n_1 es 0, y n_2 y n_3 son 1. Otras realizaciones preferidas se pueden tomar de la figura 4.

De acuerdo con otra realización preferida en la que Y es tal y como está definido más arriba, R_1 , R_2 y R_3 son H, y n_1 , n_2 y n_3 son 1.

De acuerdo con una realización preferida, X es NH, K es NH e Y es $(CH_2CH_2O)_n$ con n tal y como está definido más arriba, en donde K está sustituido además con colesterol-C(O)-, tritilo o derivados de los mismos.

20 De acuerdo con una realización especialmente preferida del oligonucleótido de acuerdo con la fórmula (I), X es NH u O, Y es un enlace y Z es alquilo(C_{1-24}) o H, preferiblemente C_{10} , Q o NHalquilo(C_{2-24}), en donde Q se selecciona de H, aminoácidos, análogos de aminoácidos, alquilo(C_{1-24}), preferiblemente alquilo(C_{12-24}), péptidos y lípidos, y V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , V_5 , V_6 , W_1 , W_2 y W_3 son O.

25 De acuerdo con otra realización preferida del oligonucleótido de la fórmula (I), X es NH u O, Y es un enlace y Z es decilo o H, y V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , V_5 , V_6 , W_1 , W_2 y W_3 son preferiblemente O.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido modificado, tal y como está definido en las reivindicaciones.

30 La composición farmacéutica según la invención podría además comprender vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El término «vehículo», cuando se utiliza en la presente memoria, incluye vehículos, excipientes y/o estabilizantes que no son tóxicos para la célula ni para el mamífero que se expone a ellos en las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, los vehículos fisiológicamente aceptables son liposomas o soluciones acuosas con el pH tamponado. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos (sin embargo, con respecto a la formulación de la presente invención, se prefiere un tampón de fosfato); los antioxidantes incluyen ácido ascórbico, polipéptidos de masa molecular baja (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros glúcidos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas, gelificantes tales como EDTA, azúcar, alcoholes tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietileno o polietilenglicol. De acuerdo con una
40 realización especialmente preferida, el compuesto de la invención se disuelve en agua desionizada estéril.

Tal composición y/o formulación de acuerdo con la invención se puede administrar a un sujeto que la necesita, en concreto a un paciente humano, en una dosis suficiente para el tratamiento de las condiciones específicas mediante los medios idóneos. Por ejemplo, la composición y/o formulación se podría formular como una composición farmacéutica con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La eficacia terapéutica y la
45 toxicidad se podrían determinar según los protocolos estándares. La composición farmacéutica se podría administrar de forma sistémica, p. ej., por vía intraperitoneal, intramuscular o intravenosa, o localmente, tal como por vía intranasal, subcutánea, intradérmica o intratecal. La dosis de la composición y/o formulación administrada dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar y del estado del sujeto, tal como el peso del sujeto, la edad del sujeto y el tipo e intensidad de la enfermedad o lesión a tratar, el modo de administración y el criterio del médico que lo trata.

50 En una realización preferida, la composición farmacéutica se administra por vía intradérmica. Se prefiere en especial que la composición se administre por vía intradérmica mediante tatuaje, micropunción y/o parches con microagujas.

Preferiblemente, los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención están disueltos y diluidos a la concentración deseada en agua desionizada y estéril (agua purificada), y a continuación se aplica en la piel desinfectada con etanol y afeitada mediante el uso de un dispositivo de pipeteo, y posteriormente se tatúa en la piel.

- 5 Para el tatuaje, por ejemplo, la composición farmacéutica en agua de acuerdo con la invención se inyecta por vía intradérmica en la piel, con el uso de un dispositivo de tatuaje (médico) al que se ajusta una punta (de un solo uso) de agujas para multipunción (tal como una punta de un solo uso con 9 agujas).

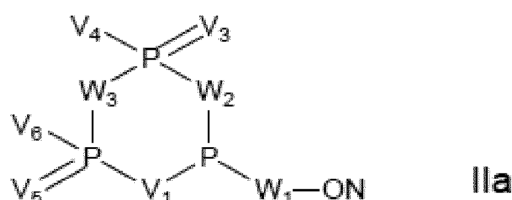
El procedimiento de tatuaje típico es el siguiente: después de que se pipetee la composición farmacéutica en agua sobre la piel afeitada y limpiada con etanol, se introduce en la punta con múltiples agujas de la máquina de tatuaje mediante la colocación de la punta con las agujas en funcionamiento (que funciona a una velocidad de, por ejemplo, 100 a 120 Hz, en particular a 100 Hz) con suavidad en la parte superior de la gota de la composición farmacéutica en agua. Una vez que la gota de la composición farmacéutica en agua se ha adsorbido completamente en la punta con las agujas en funcionamiento y de este modo se queda entre las agujas en funcionamiento, la punta en funcionamiento se mueve suavemente arriba y abajo sobre la piel, sosteniendo la punta con las agujas ahora llena en un ángulo de 90° exactos con la piel. Con este método, la composición farmacéutica en agua se tatúa completamente en la piel. Para 50-100 µl de la composición farmacéutica en agua, se tarda típicamente de 10 a 15 s sobre una zona de piel de 2 a 4 cm². El beneficio de este tratamiento sobre la inyección única en embolada intradérmica estándar es que la composición farmacéutica en agua se inyecta de modo uniforme por una superficie mayor de piel y se reparte de manera más uniforme y más precisa sobre el tejido diana: al utilizar una punta con 9 agujas a 100 Hz durante 10 s, este método garantiza 9000 inyecciones intradérmicas dispersas con uniformidad por la piel tratada.

Por supuesto, el experto en la técnica podría desviarse del procedimiento y reajustarlo en función del paciente o de la parte del cuerpo a tratar. El procedimiento de micropunciones se podría llevar a cabo en estrecha analogía con el procedimiento de tatuaje. Sin embargo, con la micropunción, la punta con las agujas de tatuaje se reemplaza por una punta con microagujas, lo que garantiza una administración intradérmica más superficial. La composición farmacéutica en agua se pipetea, en principio, sobre la piel afeitada y limpiada con etanol, y a continuación se administra por vía intradérmica con la punta con microagujas, en analogía con el procedimiento de tatuaje. El uso de microagujas no hace necesaria la adsorción previa de la composición farmacéutica entre las agujas para micropunción.

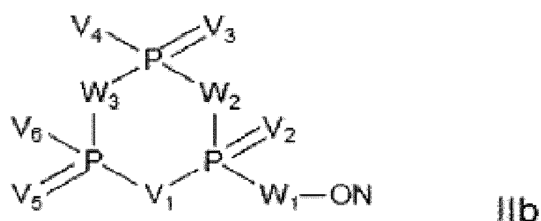
Además, se contempla que los parches con microagujas revestidos con, o que si no albergan, la composición farmacéutica se pueden utilizar para la administración transdérmica o intradérmica. Esto tiene la ventaja específica de que la administración intradérmica de la composición farmacéutica se puede llevar a cabo con seguridad por el propio destinatario sin necesidad de una visita al hospital ni la intervención del especialista médico en tatuaje/micropunción. Esto puede añadir una flexibilidad significativa a los esquemas de tratamiento, permite unas pautas de tratamiento muy personalizadas, disminuye el dolor asociado al tratamiento, y disminuye el coste del tratamiento. Estos parches pueden constar de, pero sin limitarse a ellos, parches con microagujas que disuelven o que no disuelven para una administración de la composición farmacéutica por vía transdérmica controlada en el tiempo, prolongada o en embolada.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un método para preparar un oligonucleótido, que comprende las etapas

- 40 (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IIa)



en donde V1, V3, V5, V4, V6, W1, W2, W3 y ON son como tal y como está definido más arriba, en donde ON está protegido mediante al menos un grupo protector, con un agente oxidante para obtener un compuesto de fórmula (IIb)



en donde V1, V3, V5, V2, V4, V6, W1, W2, W3 y ON son como tal y como está definido más arriba, en donde ON está protegido mediante al menos un grupo protector,

(b) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IIb) con un agente de etiqueta de captura de la fórmula (III),



- 5 en donde X, Z e Y son tal y como están definidos más arriba, en donde X es preferiblemente O, para obtener un producto de reacción que comprende el oligonucleótido de la fórmula (I), y

(c) desprotección de al menos un grupo protector ON, y

- 10 (d) poner en contacto el producto de reacción de la etapa (c) con un reactivo de captura capaz de interaccionar con la etiqueta de captura, en donde el contacto tiene lugar en las condiciones que permiten la separación del oligonucleótido (I) desde las otras especies contenidas en dicho producto de reacción.

Se prefiere especialmente una realización en donde X es O.

- 15 Durante el método, el oligonucleótido de ON comprende al menos un grupo protector. El uso de grupos protectores de acuerdo con la presente invención persigue, en concreto, proteger los grupos 2'-OH de la subunidad de ribosa del oligonucleótido aplicado. Un experto en la técnica sabe qué grupos protectores son idóneos para la síntesis, en especial una persona que trabaja en el campo de la síntesis de nucleótidos. Se prefieren los grupos protectores en la posición 2'-OH de la subunidad de ribosa del oligonucleótido. En una realización preferida de la presente invención en la posición 2' de la unidad de ribosa, se utilizan los grupos protectores con fluoruro inestable.

Son especialmente preferidos los grupos protectores 2'-O-TBDMS o 2'-O-TOM. En una realización particularmente preferida, se aplica el grupo protector TBDMS.

- 20 En particular, durante la síntesis de los compuestos con X = O, que tienen una estabilidad de fijación mejorada de Z-Y-X-PPP, un amplio espectro de condiciones de desprotección podría conducir a que se escindan los grupos protectores del 2'-OH.

Todos los reactivos de desprotección conocidos son idóneos para escindir el grupo protector TBDMS. En particular, se pueden aplicar los reactivos siguientes:

- 25 (a) trihidrofluoruro de trietilamina optativamente en combinación con un solvente polar,
 (b) triálquilamina, trihidrofluoruro de trietilamina y un solvente polar,
 (c) piridina-HF y otros aductos de hidrofuro de bases nitrogenadas orgánicas,
 (d) fluoruro de amonio,
 (e) fluoruro de tetra-*n*-butilamonio,
 30 (f) fluoruro de tetrametilamonio y otros fluoruros de tetraalquilamonio y combinaciones de los mismos.

La etapa (c) se lleva a cabo preferiblemente en las condiciones que no provocan la degradación del resto de trifosfato, p. ej., tal y como está descrito en detalle más adelante.

- 35 La etapa (a) del método comprende la reacción de las especies cíclicas P(V)-P(V)-P(III) de la fórmula (IIa) con un agente oxidante. El compuesto de fórmula (IIa) se podría obtener según los métodos estándares, tal y como describen Ludwig et al. en 1989, véase más arriba, y Gaur et al. en 1992, véase más arriba, es decir, al hacer reaccionar el grupo OH del extremo 5' de un oligonucleótido con un agente fosfitante trifuncional, p. ej., la 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona en las condiciones idóneas, p. ej., en presencia de una base (piridina o diisopropilmetilamina) en un solvente idóneo, tal como dioxano o diclorometano, y la posterior reacción con pirofosfato (W₃ = O) o un pirofosfato modificado (W₃ es diferente de O, p. ej., CH₂, CCl₂, NH o CF₂). Preferiblemente,
 40 se utiliza una sal de tri-*n*-butilamonio del pirofosfato o del pirofosfato modificado en DMF. A continuación, el intermedio P(III)P(V) cíclico resultante (IIa) se oxida en condiciones anhidras, p. ej., con un peróxido, tal como hidroperóxido de *t*-butilo, hidroperóxido de cumeno, (10-canforsulfonil)oxaziridina. Como alternativa, también se pueden emplear fenilacetildisulfuro (V₂ = S) o el complejo borano-diisopropiletilamina (V₂ = BH₃), respectivamente,
 45 para dar el correspondiente 5'-trifosfato/análogo de trifosfato cíclico de la fórmula (IIb). En este contexto, también se hace referencia a las solicitudes de patente internacional n.^{os} WO 96/40159 o WO 2009/060281.

La etapa de reacción (a) podría tener lugar con un oligonucleótido en solución o con un oligonucleótido fijado a una fase sólida, p. ej., una resina orgánica o vidrio, tal como SVC. El oligonucleótido podría además comprender grupos protectores, p. ej., grupos protectores de azúcar o de nucleobase que conoce bien el experto en la técnica. Ejemplos preferidos de grupos protectores son el 2-cianoetilo para el fosfodiéster o fosforotioato internucleosídico, *tert*-

butildimetilsililo, triisopropilsililoximetilo o bis(acetoxietoxi)metilo para el grupo 2'-hidroxilo de 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 un oligonucleótido fijado a fase sólida.

- 5 De acuerdo con la etapa (b) del método de la invención, el compuesto (IIb) se hace reaccionar con un agente de etiqueta de captura de la fórmula (III)



en donde X es un grupo seleccionado de NH, NR³, O o/y X e Y son tal y como está definido más arriba. R³ se define tal y como está descrito más arriba para R¹.

- 10 En particular, en el caso en que X sea O, se puede utilizar un agente de escasa nucleofilia, tal como el decanol, para la apertura del anillo (consúltase la figura 1, etapa 4). Tal etapa se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, p. ej., durante 48 horas, y permite la conversión del ciclotrifosfato en el γ-éster de trifosfato deseado.

De acuerdo con la etapa (c), se escinden los grupos protectores ON.

- 15 Durante la etapa (c), por ejemplo, los reactivos desprotectores (a) y (b) especificados más arriba podrían ir seguidos por la condición de desprotección con X = O durante un periodo de 20 min a 180 min, más preferiblemente de 60 min a aproximadamente 150 min, en concreto de aproximadamente 120 min, a 60-70 °C, en concreto aproximadamente a 65 °C. Si X = NH, tales reacciones quedan excluidas debido a la estabilidad de fijación diferente, o se pueden llevar a cabo solo con parámetros de reacción significativamente peores, p. ej., durante un periodo de 40 h a TA.

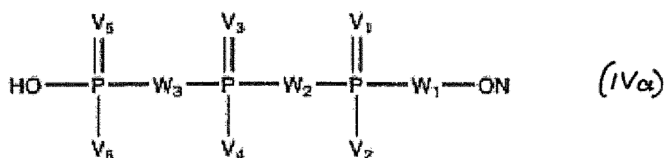
- 20 La etapa (d) del método comprende poner en contacto el producto de reacción de la etapa (b), con un reactivo de captura capaz de interaccionar con la etiqueta de captura Z en las condiciones que permiten la separación de la etiqueta de captura que contiene el oligonucleótido (I) a partir de las otras especies contenidas en el producto de reacción. Antes de la etapa (d), el oligonucleótido (I) fijado en la fase sólida se escinde de la fase sólida y se desprotege, a saber, los grupos protectores se retiran parcialmente o por completo. El reactivo de captura se inmoviliza preferiblemente en un soporte idóneo, p. ej., un soporte cromatográfico. Para proporcionar la separación del oligonucleótido (I) que contiene la etiqueta de captura a partir de las especies que no contienen la etiqueta de captura, los productos de reacción de la etapa (b) se escinden desde una fase sólida y se desprotegen, si es necesario, y se someten a un procedimiento de separación, preferiblemente un procedimiento de separación cromatográfica basado en la interacción de la etiqueta de captura Z con el reactivo de captura. Durante la etapa de separación, la pureza del oligonucleótido (I), que por lo general está en el margen del 25 al 70% para el material bruto en función de la longitud y de la complejidad de la secuencia, se podría incrementar al 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más. Para los estudios de toxicidad, es deseable una pureza de >85%, mientras que, en las últimas etapas de los ensayos clínicos, la pureza debería estar en el margen de al menos el 90-95%. Así pues, el método da a conocer un modo de obtener un pppARN de alta pureza que será necesario para los ensayos clínicos con humanos.

- 35 En la etapa (d), la etiqueta de captura y el reactivo de captura capaz de interaccionar con esta se seleccionan preferiblemente de (i) un grupo hidrófobo o fluorado y un material cromatográfico con afinidad por los grupos hidrófobos o fluorados, p. ej., un material de fase inversa o un soporte de afinidad fluorado; (ii) un primer componente de una pareja de fijación no covalente de gran afinidad y un segundo componente complementario de una pareja de fijación no covalente de gran afinidad; (iii) un primer componente de una pareja de fijación covalente y un segundo componente complementario de una pareja de fijación covalente, en donde el primer y segundo componentes forman enlaces covalentes.

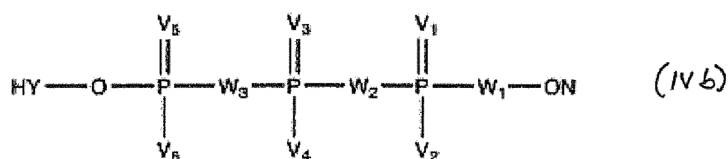
La etiqueta de captura está funcionalmente definida a continuación mediante una serie de ejemplos verosímiles. Una regla general podría ser:

- 45 Z tiene que permitir una purificación cómoda y debería poderse retirar en las condiciones que sean compatibles con los requisitos de estabilidad del pppARN.

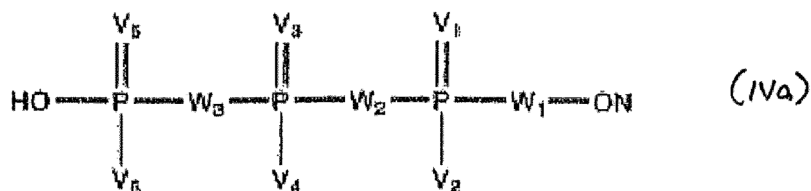
Además, el método podría comprender adicionalmente la etapa (e) de retirada de la etiqueta de captura para obtener un oligonucleótido de la fórmula (IV). De acuerdo con una realización preferida, para X = O, un compuesto de la fórmula (IV)a o (IV)b



o



y para X = NH, se obtiene un compuesto de la fórmula (IV)a



- 5 La etapa (e) tiene que ser compatible con los requisitos de estabilidad del trifosfato producido al final y con los requisitos de estabilidad del enlace entre los ribonucleótidos. Podría comprender la escisión en condiciones ácidas suaves cuando X es NH, la escisión con iones de plata cuando X es S, la escisión mediante un tiol, tal como ditiotretol, que conduce a la eliminación del tirano cuando Y-X-P contiene -S-S-CH₂-CH₂-O-P.

- 10 En otras realizaciones, la etiqueta de captura Z no se retira o no se retira completamente. En estas realizaciones, el oligonucleótido etiquetado como tal podría tener utilidad, p. ej., utilidad como agente farmacéutico.

En estas realizaciones, el reactivo Z-Y-XH se ha de seleccionar de un subgrupo de restos Z, que son funcionalmente compatibles con los requisitos estructurales del sensor RIG-I. Por ejemplo, la combinación Z = deciloctadecilo, Y = enlace, X = NH u O se sabe que cumple estos requisitos.

- 15 Los oligonucleótidos modificados con el trifosfato/análogo de trifosfato producidos de acuerdo con el método son particularmente idóneos para las aplicaciones farmacéuticas debido a su gran pureza. En una realización especialmente preferida, el oligonucleótido (I) o (IV) es un activador de la helicasa RIG-I. En Schlee et al., 2009, véase más arriba, se describen ejemplos específicos de activadores idóneos de RIG-I.

Leyenda de las figuras

- 20 En la figura 1 se muestra una visión general esquemática del método de síntesis para los derivados del oligonucleótido por éster con el trifosfato.

En la figura 2 se muestra el análisis por RP-HPLC y ESI-LC/MS de la síntesis de un decil-O-pppARN de 24 unidades (secuencia del ARN: 5'-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU)

(A) Perfiles de RP-HPLC de

- 25 a) mezcla de reacción bruta que contiene el decil-O-pppARN al 48% (TA = 14 min)
b) decil-O-pppARN puro

Columna: Hamilton PRP-1 4,1 × 250, 10 μm

Gradiente: B del 0 al 100% en 18 min, A = TEAB a 100 mM; B = metanol al 80%, TEAB a 100 mM

(B) Perfil de ESI-MS del decil-O-pppARN puro registrado con RP-LC/MS (masa molecular calculada: 7987, encontrada: 7968).

- 30 En la figura 3 se muestra una purificación por RP-HPLC a escala semipreparativa de una reacción a escala de 1 μmol de decil-O-pppARN: el etiquetado con decilo permite separar con eficacia el producto deseado (fracción 3) a partir de los subproductos sin etiquetar, que incluyen las secuencias fallidas de la síntesis, OH-RNA sin fosforilar de longitud completa y pppARN sin modificar.

Columna: Hamilton PRP-1 7 × 250 mm, 10 μm

- 35 Gradiente: B del 0 al 80% en 50 min, A = TEAB a 100 mM; B = metanol al 80%, TEAB a 100 mM.

Figura 4: Realizaciones especialmente preferidas de Y.

Figura 5: Una detección selectiva de 2'-O-metilaciones resuelve las posiciones para introducir la selectividad por RIG-I.

Figura 6: Las metilaciones convierten el dúplex en específico de RIG-I y muy activo.

Figura 7: Los fosforotioatos terminales aumentan la inmunogenia del dúplex selectivo.

- 5 Figura 8: Determinadas 2'-fluoro-sustituciones aumentan el potencial de activación de RIG-I que tiene el dúplex.

Figura 9: El patrón de modificación múltiple del los OH del ds-RNA de OH-GFP2 conduce a una fuerte mejora del potencial de activación de RIG-I.

Figura 10: La mejora de la inmunogenia mediante modificaciones del esqueleto es transferible a un dúplex trifosforilado.

- 10 Figura 11: Se muestra una visión general esquemática del método de la invención que utiliza el dietilenglicolmonobutíler como un ejemplo de alquilpolietilenglicoles como reactivo nucleófilo de apertura de anillos.

Figura 12: Purificación por RP-HPLC de la mezcla de reacción bruta de C4-DEG-pppARN que contiene C4-DEG-pppARN al 45% (pico a un volumen de gradiente de 88,4 ml) y pppARN al 50% (pico a 77,5 ml). Columna: Hamilton PRP-1 7 × 250 mm, 10 µm, velocidad de flujo de 3 ml/min.

- 15 Gradiente: B del 1 al 80% en 50 min, A = TEAB a 0,1 M; B = metanol al 80%, TEAB a 0,1 M.

Figura 13: Espectros de MALDI-TOF que corresponden a C4-DEG-pppARN después de la purificación por HPLC. El pico de masa correcta se observa en m/z 7972,6 (A).

En la figura 14 se muestra el esquema de síntesis del pppARN mediante el uso de una etiqueta compuesta de poliéter lipófilo.

- 20 En la figura 15 se muestra la purificación por HPLC y los datos de MALDI relacionados con la figura 14 (secuencia del ARN: 5'-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU).

(A) Purificación por RP-HPLC de

C11-CONH-CH₂CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-O-CH₂CH₂CH₂-NHpppRNA

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

- 25 Gradiente: B del 0 al 80% en 50 min; A = TEAB a 100 mM, B = metanol al 80%, TEAB a 100 mM

(B) Espectro de MALDI registrado de la mezcla de reacción bruta después de la desalación que muestra la presencia de C11-CONH-CH₂CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-O-CH₂CH₂CH₂-NHpppARN (masa molecular: 8214,8)

(C) Espectro de MALDI del producto de pirólisis a pH = 3,8 del C11-CONH-CH₂CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-O-CH₂CH₂CH₂-NHpppARN (masa molecular: 7832,6) purificado

- 30 En la figura 16 se muestra el esquema de síntesis del pppARN etiquetado con colesterilo con la escisión optativa del correspondiente pppARN.

En la figura 17 se muestra la purificación y el análisis de un pppARN etiquetado con colesterilo (secuencia del ARN: 5'-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU):

- 35 (A) Purificación por RP-HPLC del colesteril-CONH-CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-NH-ppp-RNA. Columna: Hamilton PRP-1 4,1 × 250 mm, 10 µm

Gradiente: B del 0 al 10% en 5 min, B al 10% durante 9 min, B del 10 al 100% en 33 min; A = TEAB a 50 mM, B = metanol al 95%, TEAB a 50 mM.

(B) Análisis por RP-HPLC del colesteril-CONH-CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-NH-ppp-RNA.

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

- 40 Gradiente: B del 0 al 100% en 18 min, B al 100% durante 4 min; A = TEAB a 50 mM, B = metanol al 95%, TEAB a 50 mM

(C) Espectro de MALDI del colesteril-CONH-CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-NH-ppp-RNA puro.

El pico de pppARN (7827,3 Da) se debe a la escisión por PN durante el procedimiento de ionización.

Ejemplos

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier ejemplo que caiga fuera del alcance de dichas reivindicaciones sólo está pensado con propósitos ilustrativos, así como comparativos.

Ejemplo 1: Preparación del 5'-decil-O-trifosfato de ARN

- 5 Tal y como queda esbozado en la visión general (figura 1), el procedimiento de síntesis del decil-O-trifosfato de ARN incluye las siguientes etapas de síntesis:

1-4) 5'-Decil-O-trifosfato de ARN

- El 5'-OH-ARN (1 μ mol) fijado al soporte y totalmente protegido se secó durante 3 h al vacío dentro de una columna de síntesis y posteriormente se lavó con piridina/dioxano anhidro (1:3, v/v, 4 ml). En argón, una solución a 1 M recién preparada de 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona en dioxano seco (100 μ l, 100 μ mol) se inyectó en un matraz que contenía 2 ml de piridina/dioxano anhidro (1:3, v/v). La solución fosfitilante resultante a 50 mM se vertió en la columna de síntesis y se agitó arriba y abajo lentamente durante un tiempo de reacción de 30 min. A continuación, se preparó una solución de pirofosfato de tetra(tri-*n*-butilamonio) al mezclar una solución a 0,5 M de pirofosfato de bis(tri-*n*-butilamonio) en DMF (1 ml, 0,5 mmol) y tri-*n*-butilamina (238 μ l, 1 mmol). La solución de pirofosfato se empujó a través de la columna y después de expeler y descartar de la columna el reactivo fosfitilante en exceso, la solución de pirofosfato restante se empujó arriba y abajo con dos jeringuillas. Al cabo de 10 min, se lavó la columna con acetonitrilo anhidro (3 ml). Una solución de hidropéroxido de *tert*-butilo a 5,5 M en decano (300 μ l) se disolvió en acetonitrilo anhidro (2 ml) y se puso en contacto con el soporte de síntesis. Al cabo de 15 min, la columna se lavó con acetonitrilo anhidro (6 ml). Posteriormente, una solución homogénea de *N*-metilimidazol (240 μ l, 3 mmol), tri-*n*-butilamina (250 μ l, 1,1 mmol) y alcohol *n*-decílico (2 ml, 10,5 mmol) se empujó repetidamente arriba y abajo a través de la columna, y se dejó reaccionar durante 48 h para la conversión del ciclotrifosfato en decil-O-trifosfato. La columna se lavó con acetonitrilo anhidro (6 ml) y se trató con bicarbonato de trietilamonio a 0,1 M (TEAB, 2 ml) durante 20 min para la hidrólisis del ciclotrifosfato sin reaccionar, con lo que se evita la modificación inespecífica durante el siguiente procedimiento de desprotección. Después de otra etapa de lavado con acetonitrilo anhidro (9 ml), el soporte de síntesis se secó en una corriente de argón.

5-6) Desprotección y purificación

- El 5'-decil-O-trifosfato de oligonucleótido se puso en contacto con una solución recién preparada de metilamina acuosa al 40% y amonio acuoso concentrado (AMA, 1:1, v/v, 2 ml) con dos jeringuillas. Al cabo de 30 min de escisión, la solución se transfirió a un vial limpio con tapón de rosca y el soporte se enjuagó con AMA (1 ml). La solución combinada y el lavado se calentaron durante 10 min a 65 °C. Después de enfriarla en hielo, la solución se evaporó hasta la sequedad y el residuo se secó mediante coevaporación con etanol absoluto. Para la retirada de los grupos protectores 2'-O-TBDMS, se puede utilizar el tratamiento con trihidrofluoruro de trietilamina (TEA.3HF) sin una pérdida significativa del resto modificado con trifosfato. El decil-O-trifosfato de oligonucleótido se volvió a disolver en una solución recién preparada de *N*-metilpirrolidona/trietilamina/tea.3HF (NMP/TEA/TEA.3HF, 6:4:3, v/v, 325 μ l) y la solución se calentó a 65 °C durante 2 h. Como alternativa, podría utilizarse una solución de desprotección de TEA.3HF en DMSO (1:1, v/v, 600 μ l). El decil-O-trifosfato de oligonucleótido totalmente desprotegido se precipitó desde la solución de desprotección mediante el uso de *n*-butanol y se purificó por HPLC. La etiqueta lipófila de decilo permite separar el decil-O-trifosfato de las impurezas que no contienen la etiqueta mediante el uso de la cromatografía en fase inversa. El producto de reacción se aplicó a una columna PRP-1 de 7 × 250 mm y se separó en un gradiente lineal de tampón B del 0 al 100% en 50 min a una velocidad de flujo de 3 ml/min. El tampón A era TEAB a 100 mM y el tampón B era TEAB a 100 mM en metanol al 80%. Se recogieron las fracciones del producto, se evaporaron y se desalaron mediante la coevaporación repetida con metanol. El residuo se disolvió en agua y se transfirió a la forma de sodio por precipitación con etanol en presencia de cloruro de sodio a 0,3 M.

45 Ejemplo 2

Preparación del éster de 5'-pppARN y 2-(2-butoxi)etilo (C4-DEG-pppARN)

Una visión general del esquema de reacción descrito en el ejemplo 2 se muestra en la figura 11.

Etapla 1: Disolver 203 mg (1 mmol) de 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona en 1 ml de dioxano seco en un vial tabicado de 10 ml en argón.

- 50 Etapla 2: Secar al vacío durante 12 h la columna de síntesis que contiene el ARN totalmente protegido que se ha destitilado y que se ha lavado exhaustivamente con acetonitrilo. Lavar el contenido de la columna exhaustivamente mediante la extracción y la expulsión repetidas de 2 ml de la solución de dioxano/piridina anhidra, 3:1 (v/v) en una atmósfera de argón.

Etapa 3: Añadir en un vial los primeros 2 ml de piridina/dioxano, 3:1 v/v, seguido de 100 µl de la solución de 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona a 1 M en dioxano seco para dar una solución a 50 mM del reactivo fosfitilante, p. ej., la 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-2-ona, en dioxano/piridina, 3:1 (v/v). Homogeneizar la solución por agitación suave. Comenzar la reacción con la extracción de la solución de 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona a través de la columna de síntesis desde el vial.

Durante la reacción, extraer y expeler repetidamente de la columna de síntesis la solución que contiene la 2-cloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforín-4-ona para permitir el contacto exhaustivo y la buena mezcla con el ARN unido al soporte de la fase sólida. Un tiempo de reacción de 30 min suele dar una reacción casi cuantitativa del grupo 5'-OH libre del oligómero fijado al soporte en el margen de 20-40 nt.

Etapa 4: Después de un tiempo de reacción de 30 min, expeler la solución de dioxano/piridina que contiene el agente fosfitilante en exceso en un contenedor de desechos, llenar una nueva jeringuilla con una mezcla vorticial de 1 ml de pirofosfato de (Bu₃NH)₂ a 0,5 M en DMF seco y 238 µl (1 mmol) de Bu₃N seco para dar una solución de pirofosfato de (Bu₃N)₄ a 0,5 M. Empujar esta solución a través de la columna, con lo que se reemplaza la solución de dioxano/piridina. El gran exceso de pirofosfato garantiza una conversión cuantitativa del intermedio en el anhídrido cíclico P(III)-P(V) de IIa.

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

Etapa 6: Disolver 300 µl de *t*-BuOOH (solución a 5,5 M en decano, Sigma-Aldrich) en 2 ml de CH₃CN anhidro para dar una solución homogénea a aproximadamente 0,7 M. Poner en contacto el soporte de síntesis con esta solución durante 15 min para obtener el anhídrido cíclico P(V) oxidado IIb.

Etapa 7: Lavar la columna con 3 ml de CH₃CN seco para retirar el peróxido en exceso y llenarla con CH₃CN seco.

Etapa 8: Poner en contacto 2 ml de 2-(2-butoxi)etanol seco (éter monobutílico de dietilenglicol) que contiene *N*-metilimidazol a 0,1 M y tri-*n*-butilamina a 0,1 M con el soporte en la columna. El tiempo de contacto del SVC con el alcohol debe ser al menos de 48 h a temperatura ambiente.

Etapa 9: Lavar la columna exhaustivamente con 9 ml de acetonitrilo, poner luego en contacto la columna con 2 ml de TEAB a 0,1 M (bicarbonato de trietilamonio), solución en agua, durante 1 h para hidrolizar el ciclotrifosfato que no ha reaccionado.

Etapa 10. Primera etapa de la desprotección: Hacer pasar 2 o 3 veces 1 ml de la solución de desprotección (metilamina acuosa al 40%/amonio acuoso concentrado 1:1 v/v. Reactivo AMA) a través del soporte. Después de estar en contacto durante 30 min, transferir la solución a un nuevo vial. Lavar el soporte con el mismo volumen de la solución de desprotección de AMA y combinar los lavados. Calentar la solución combinada y los lavados durante 10 min a 65 °C. Después de enfriarla en hielo, concentrar la solución en un volumen de 300 a 500 µl, y a continuación evaporarla hasta la sequedad.

Etapa 11. Retirada de los grupos protectores 2'-O-TBDMS: Secar el residuo mediante la adición y la coevaporación de 300 µl de EtOH seco, añadir 1 ml de TBAF seco a 1 M (fluoruro de tetra-*n*-butilamonio) en THF, sellar fuertemente y colocarlo en un agitador durante 16 horas. Parar la reacción con 1 ml de TEAB acuoso estéril (bicarbonato de trietilamonio) a 1 M y desalarla en una columna NAPTM-25 (purificación de ácidos nucleicos) con agua estéril como eluyente. En esta etapa podría ser necesaria la filtración a través de un filtro estéril de 2 µm. Combinar y evaporar las fracciones que absorben al UV en un volumen de 150 µl, añadir 100 ml de TEAB a 1 M, pH 8 y almacenar la solución congelada a -20 °C hasta que se pueda realizar la purificación por HPLC.

Etapa 12. Purificación por HPLC: El producto de reacción de una mezcla de reacción a escala de 1 µmol de la etapa 11 se cargó en una columna PRP-1 de 7 × 25 mm (Hamilton). La purificación se realizó con un gradiente lineal del tampón B desde el 0 al 80% en 50 min a una velocidad de flujo de 3 ml/min. El tampón A es TEAB a 100 mM y el tampón B es TEAB a 100 mM en metanol/agua 8:2 v/v. Un ejemplo típico de una purificación de 24 unidades se muestra en la figura 3. Una combinación de una etiqueta de alquilo de 4 átomos y un resto de dietilenglicol es suficiente para que se separe cerca de la línea de referencia del pppARN. Se combinaron las fracciones que corresponden al pico de 88,4 ml, se evaporaron en un rotavapor y se desalaron mediante varias coevaporaciones con metanol seco.

Ejemplo 3

Modificación del pppARN mediante etiquetas compuestas de poliéter lipófilo con aminas preformadas de poliéter lipófilo

En el ejemplo 3 se emplean aminas de poliéter lipófilo de estructura ZY-H para generar ZYNHpppARN.

Parte A: Preparación económica a gran escala de la amina de poliéter lipófilo

Este procedimiento se puede llevar a cabo sin cromatografía en columna rápida y se puede aplicar de forma general a la síntesis de monoamidas a partir de diaminas hidrosolubles y ésteres de metilo de ácidos carboxílicos lipófilos.

Síntesis de la *N*-lauril-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (compuesto 3, figura 14): se disolvió la 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (43,8 ml, 200 mmol) en 32,5 ml de metanol. Se le añadió el éster metílico del ácido láurico (4,92 ml, 20 mmol) lentamente y con agitación, y el matraz cerrado se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 días. Se retiró el metanol de la mezcla de reacción en un rotavapor y el residuo se disolvió en 100 ml de acetato de etilo.

El exceso de la diamina se retiró por extracción con agua (2 × 120 ml) seguido de cloruro de sodio concentrado (2 × 100 ml). Se evaporó la fase de acetato de etilo y el aceite residual se cristalizó tras dejarlo reposar a -20 °C para dar 6,8 g (17 mmol) de la *N*-lauril-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina pura.

Parte B: Reacciones de apertura del anillo en el SVC que lleva fijado el ciclotrifosfato de ARN con la *N*-lauril-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina

Se sintetizó el ciclotrifosfato de ARN fijado a SVC (compuesto 4, figura 14) según las etapas 1 a 7 del ejemplo 2 anterior. La reacción de apertura del anillo del ciclotrifosfato de ARN inmovilizado en la fase sólida se llevó a cabo con una solución a 0,08 M de *N*-lauril-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina en acetonitrilo. La solución de acetonitrilo se puso en contacto con el SVC durante 3 h a temperatura ambiente, a continuación, se lavó el soporte con 10 ml de acetonitrilo seco y se enjuagó en seco con argón. La escisión desde el soporte, la desprotección y otro procedimiento por HPLC se llevaron a cabo exactamente de acuerdo con las etapas 10 a 12 del ejemplo 2. El producto 5 se eluyó a una concentración de metanol del 75% (figura 15A). El análisis del espectro de MALDI de la mezcla de reacción confirma la estructura del compuesto 5 (masa molecular de 8214,8 Da, figura 15B).

Optativamente, se podría retirar la etiqueta de purificación para obtener el correspondiente trifosfato de oligonucleótido: 100 nmol de la amida sustituida en γ con *n*-laurilo (compuesto 5, figura 14) se disolvieron en 400 μ l del tampón de desprotección a pH 3,8 en un tubo Eppendorf de 2 ml y el tubo sellado se calentó a 60 °C durante 70 min. Estas condiciones dan lugar a la escisión cuantitativa del enlace fosforamidado del compuesto 5, sin ninguna degradación del resto de trifosfato. La mezcla de reacción se enfrió en hielo y se le añadieron 14 μ l de la solución estéril de NaCl a 5 M y 1,2 ml de etanol absoluto. Se recogió el precipitado por centrifugación, se lavó con etanol frío, se secó en una Speed Vac, se disolvió en agua estéril y se conservó congelado a -20 °C.

El análisis del espectro de MALDI confirma la masa molecular esperada del producto pppARN (masa molecular de 7832 Da, figura 15C).

Ejemplo 4:

Estrategia con columna para la modificación del pppARN con etiquetas compuestas de poliéter lipófilo

El ejemplo 4 es un procedimiento en dos etapas que emplea la modificación en columna de un oligonucleótido HYNHpppARN inmovilizado para generar ZYNHpppARN.

Preparación del trifosfato de ARN etiquetado con colesterilo ($\text{CH}_3\text{-(CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{CH}_2\text{)}_2\text{-NH-ppp-RNA}$, compuesto 4, figura 16).

La conjugación de una etiqueta lipófila de colesterilo con el trifosfato de ARN permite la separación eficaz del producto etiqueta-pppARN a partir de las impurezas sin etiquetar por RP-HPLC. En la figura 16 se muestra una visión general del esquema de reacción para preparar el trifosfato de ARN etiquetado con colesterilo. En una primera etapa, el 5'-OH-ARN totalmente protegido y fijado al soporte se convirtió en el trifosfato cíclico intermedio (compuesto 2, figura 16) tal y como se describió en las etapas 1 a 7 del ejemplo 2.

Posteriormente, se lavó la columna con acetonitrilo anhidro (3 ml). Se disolvieron 176 μ l de la 2,2'-(etilendioxi)dietilamina (compuesto 1, figura 16; 1,2 mmol) en acetonitrilo anhidro (1 ml) y la solución se puso en contacto con el soporte en la columna. Al cabo de 3 min, la columna se lavó con acetonitrilo anhidro (3 ml) y diclorometano anhidro (6 ml).

Posteriormente, el trifosfato modificado con amino (a saber, compuesto 3, figura 16) se trató con una solución premezclada de clorofornio de colesterilo (36 mg, 80 μ mol), *N,N*-diisopropiletilamina (13,9 μ l, 40 μ mol) y 4-dimetilaminopiridina (4,9 mg, 40 μ mol) en diclorometano anhidro (5 ml) durante 15 min. La columna se lavó con diclorometano anhidro (3 ml) y acetonitrilo anhidro (6 ml), y se secó en una corriente de argón. Para la escisión desde el soporte y la desprotección, el oligonucleótido modificado se puso en contacto con una solución recién preparada de metilamina acuosa al 40% y amonio acuoso concentrado (AMA, 1:1, v/v, 2 ml) mediante el uso de dos jeringuillas. Después del tiempo de escisión de 30 min, se transfirió la solución a un vial con tapón de rosca, se calentó durante 10 min a 65 °C y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se secó mediante coevaporación con etanol absoluto y se trató con fluoruro de tetra-*n*-butilamonio a 1 M en THF (1 ml, 1 mmol) con agitación durante 16 h. Después de la desalación en una columna NAP-25, el trifosfato de oligonucleótido etiquetado con colesterilo totalmente desprotegido se purificó por HPLC en una columna de fase inversa (Hamilton PRP-1, 4,1 × 250 mm,

figura 17A). El compuesto 4 se eluyó a una concentración de metanol del 95% y la estructura esperada se confirmó mediante un análisis de MALDI (masa molecular de 8370,6 Da, figura 17C).

Optativamente, se retira la etiqueta de colesterilo por hidrólisis ácida a pH 3,8 y 60 °C para obtener el correspondiente trifosfato de oligonucleótido (compuesto 5, figura 16) siguiendo el mismo procedimiento que se describió en el ejemplo 3.

Ejemplo 5: La introducción sistemática de las 2'-O-metilaciones da lugar a un dúplex de ARN selectivo de RIG-I.

Se puede encontrar una lista de abreviaturas y su significado al final del texto de la solicitud.

El ARN propio del organismo está caracterizado por multitud de modificaciones que podrían tener una influencia sobre las funciones de los ARN (tRNA y rRNA). Así pues, las 2'-O-metilaciones son capaces de modificar la inmunogenia del ARN. Por lo tanto, un ligando selectivo de RIG-I no debería comprender más de una 2'-O-metilación por hebra. Estas propiedades están incluidas en el dúplex de ARN por combinación de hebras sentido y antisentido idóneamente metiladas.

Una detección selectiva de las 2'-O-metilaciones resolvió las posiciones que introducían la selectividad por RIG-I (figura 5). Para la hebra sentido (A) y antisentido (B) de OH-GFP2, se realizó un cribado completo de 2'-O-metilaciones. Se modificó cada una de las posiciones por 2'-O-metilación y se utilizó para la estimulación de RIG-I, TLR7 o TLR8. Para la estimulación de RIG-I, se bloquearon con cloroquina las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) y se estimularon mediante la lipofección del dúplex. Se midió el IFNa por ELISA 20 h después de la estimulación. Para TLR7 y TLR8, sólo se cribó por la capacidad estimulante la monohebra pertinente, y se comprobó en las CMSP sin bloquear. Las monohebras se transfectaron mediante la formación de complejos con poli-L-arginina y 20 h después de la transfección se midió por ELISA el IFNa para la activación de TLR7 y la IL12p70 para la activación de TLR8. La inducción del 100% con GFP2 para la hebra sentido corresponde a 3085 pg/ml de IFNa para RIG-I, 2758 pg/ml de IFNa para TLR7 y 1206 pg/ml de IL12p70 para TLR8. Para la hebra antisentido, el 100% de GFP2 corresponde a 2342 pg/ml de IFNa para RIG-I, 1831 pg/ml de IFNa para TLR7 y 3018 pg/ml de IL12p70 para TLR8. Una visión general del impacto de la introducción dependiente de la posición de la 2'-O-metilación se ofrece en forma de tabla (figura 5). Los efectos están normalizados por la hebra sin modificar como referencia. Blanco = sin cambio, amarillo = reducción de la estimulación inmunitaria, rojo = sin estimulación inmunitaria, verde = aumento de la estimulación inmunitaria.

Además, se podía demostrar que determinadas metilaciones convertían el dúplex en específico de RIG-I y muy activo.

Figura 6: (A) Las metilaciones inertes para la activación de RIG-I se combinaron en la hebra antisentido y el dúplex resultante se utilizó para la estimulación de las CMSP bloqueadas con cloroquina a una concentración de 0,8 µg/ml. Se midió el IFNa por ELISA 20 h después de la estimulación. El 100% de OH-GFP2 corresponde a 2729 pg/ml de IFNa. (B) Se hibridaron diferentes combinaciones de 2'-O-metilaciones en las hebras sentido y antisentido, y se utilizaron para la estimulación de las CMSP. Para la estimulación de RIG-I, se bloquearon con cloroquina y se transfectaron con Lipofectamine™, para TLR7 y TLR8 se utilizaron CMSP sin bloquear y se transfectaron con los dúplex que forman complejo con poli-L-arginina. El 100% de IVT-2 corresponde a 4861 pg/ml de IFNa para RIG-I, el 100% en 9.2S corresponde a 1975 pg/ml de IFNa para TLR7 y 771 pg/ml de IL12p70 para TLR8. (A) y (B) muestran la media ± EEM de 3 donantes.

Ejemplo 6: Incremento de la activación de RIG-I mediante la inserción de modificaciones estabilizantes del ARN

Durante el tratamiento con siRNA, se introducen fragmentos de dsRNA pequeños en un organismo, donde inhiben la formación de una proteína concreta en las células destinatarias. El problema con esta forma de tratamiento es la inestabilidad enorme de los siRNA bicatenarios. El ARN se podría degradar con facilidad mediante exonucleasas y endonucleasas en el suero durante el transporte hacia la célula destinataria.

Parece probable que una parte significativa del ARN exógeno utilizado con propósitos terapéuticos se degenere en el suero y en el citosol del sujeto al cual se le administra.

Se podía demostrar que cada modificación de 5'-PTO tiene un efecto positivo sobre la actividad inmunitaria del dúplex y que la combinación de 5'-PTO en las hebras sentido y antisentido conduce a un incremento máximo de la actividad (s15/as3 contra s15 PTO/as3 PTO; figura 7B). Así pues, se puede considerar beneficioso el uso de tales modificaciones del esqueleto del ARN en los ligandos selectivos de RIG-I.

En concreto, se podía demostrar que los 5'-fosforotioatos aumentan la inmunogenia de un dúplex selectivo.

Figura 7: (A) Las CMSP se bloquearon con cloroquina y se estimularon con los dúplex a una concentración de 0,8 µg/ml. Al cabo de 20 h de la estimulación, se midió el IFNa por ELISA. El 100% de IVT2 corresponde a 6138 pg/ml de IFNa. (B) Se titularon los dúplex indicados y se utilizaron para la estimulación de RIG-I. Las CMSP se bloquearon con cloroquina y los dúplex se transfectaron con Lipofectamine™. Al cabo de 20 h de la estimulación, se determinó

el IFNa en el sobrenadante mediante ELISA. El 100% de 3P-GFP2 a 50 nM corresponde a 16044 pg/ml de IFNa. Los resultados se muestran como la media \pm EEM de 4 donantes.

En el desarrollo de los siRNA terapéuticos, el problema de la estabilidad en el suero se solucionó con otra clase de modificación: si las 2'-fluoro-sustituciones se incorporaban en el ARN, los ARN resultantes eran más estables frente a la digestión de las nucleasas. Sin embargo, se observó que, en el caso de la estimulación inmunitaria dependiente de RIG-I, una 2'-fluoro-sustitución podía activar la estimulación inmunitaria.

En concreto, se podía demostrar que los 5'-fosforotioatos aumentan la inmunogenia de un dúplex selectivo.

Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se halló que determinadas 2'-fluoro-sustituciones aumentan las posibilidades de activación de RIG-I que tiene el dúplex.

Para la hebra sentido (A) y antisentido (B) del dúplex, cada una de las posiciones se modificó con una 2'-fluoro-sustitución (figura 8). Los dúplex resultantes se utilizaron para la estimulación de las CMSP a una concentración de 0,8 μ g/ml. Para la valoración de la activación de RIG-I se bloquearon las CMSP y se transfectaron con Lipofectamine™, para la estimulación de TLR7 y TLR8 se utilizaron las CMSP sin bloquear y se transfectaron con los dúplex en complejo con poli-L-arginina. Al cabo de 20 h tras la estimulación, se midieron las citocinas por ELISA. El 100% para GFP2 en la hebra sentido corresponde a 2407 pg/ml de IFNa para RIG-I, 3281 pg/ml para TLR7 y 1990 pg/ml para TLR8. Para la hebra antisentido, el 100% de GFP2 corresponde a 4512 pg/ml de IFNa para RIG-I, 4691 pg/ml de IFNa para TLR7 y 1997 pg/ml de IL12p70 para TLR8. Se muestra la media \pm EEM de 4 donantes.

Así pues, era muy importante consolidar un dúplex tan activo como fuera posible que pudiera compensar la pérdida del ARN con su fuerte actividad. En el pasaje anterior, se describió cómo las modificaciones del ARN podían identificarse por las fijaciones de PTO selectivas y las 2'-fluoro-sustituciones, lo que conduce a un incremento de la actividad de un dúplex.

Ejemplo 7: La combinación de todas las modificaciones conduce a un ligando de RIG-I considerablemente inmunógeno

Para comprobar si las fijaciones de PTO o las 2'-fluoro-sustituciones se pueden combinar con las 2'-O-metilaciones para incrementar la selectividad, se combinaron todas ellas, paso a paso, en un dúplex.

Las CMSP se bloquearon con cloroquina y se utilizaron para la estimulación de RIG-I. Se utilizaron los dúplex modificados diferencialmente que se basan en OH-GFP2 y la activación de RIG-I se midió por ELISA 20 h después de la estimulación según el IFNa (figura 9). Los dúplex con multitud de modificaciones se compararon con el OH-GFP2 (A) o bien con el 3P-GFP2 trifosforilado (B). El 100% de IVT4 corresponde a 21.305 pg/ml de INFa. Se muestra la media \pm EEM de 2 donantes.

Las 2'-O-metilaciones s15/as3 se añadieron primero al ARN de OH-GFP2 de partida (OH-GFP2 oMet15s/oMet3as, figura 9A) y luego se compararon con la modificación de 5'-PTO en sentido y antisentido (OH-GFP2 PTO 5'; figura 9A). Posteriormente, ambos tipos de modificación se combinaron con un dúplex (OH-GFP2oMet15/oMet3 PTO, figura 9A). Finalmente, se generó un dúplex que comprendía además tres 2'-fluoro-sustituciones en las posiciones 7 y 23 en la hebra sentido y en la posición 13 en la antisentido (OH-GFP2oMet15/3-F23/13-PTO, figura 9A). La titulación comparativa de estos ARN bicatenarios demostró que el oligonucleótido con multitud de modificaciones OH-GFP2oMet15/3-F23/13-PTO era con mucho el mejor de los dúplex en función de la actividad. Para evaluar mejor su actividad, se tituló el dúplex y se comparó con su trifosfato de dúplex sin modificar (figura 9B). Se encontró que la inserción de una modificación hacía posible cambiar el oligonucleótido para que su actividad inmunitaria fuera comparable a la de su equivalente trifosforilado (3P-GFP2, figura 9B).

Ejemplo 8: Los elementos son transferibles al sistema 3P-dsRNA

El desarrollo completo del ligando selectivo de RIG-I se llevó a cabo a nivel del OH de la secuencia de GFP2. Aunque la actividad podía incrementarse inmensamente mediante las modificaciones idóneas, una trifosforilación de un ligando incrementaría aún más su actividad.

Hasta ahora no estaba claro si las modificaciones y su correspondiente posicionamiento se podían transferir al sistema 3P-GFP2.

Para hallar una respuesta a esta cuestión, se produjeron unos dúplex en los que todos tenían la modificación que incrementaba la actividad: la 2'-O-metilación en la base 15 de la hebra sentido, la 2'-fluoro-sustitución en las bases 7 y 23, y dos fijaciones de PTO en el extremo 5' y en el 3' (2S2F, figura 10). En la hebra antisentido se combinaron una 2'-O-metilación en la base 3, una 2'-fluoro-sustitución en la base 13 y dos fijaciones de PTO en 5'. Para evitar que las dos fijaciones de 5'-PTO en la hebra sentido estorbaran por su proximidad al trifosfato, se produjo adicionalmente una hebra sentido con multitud de modificaciones pero sin 5'-PTO (1S2F, figura 10).

Para ser capaz de estimar la ganancia de actividad por trifosforilación, cada dúplex se produjo con 5'-hidroxilo y 5'-trifosfato (OH frente a 3P, figura 10) y se compararon el uno con el otro mediante la titulación de la estimulación de

las CMSP.

Figura 10: (A) Se sintetizaron los dúplex con multitud de modificaciones y sin el trifosfato. Se realizó una titulación de la dosis con las CMSP bloqueadas con cloroquina. Se midió por ELISA la activación inmunitaria 20 h después de la estimulación en función del IFNa. Se muestra la media \pm EEM de 4 donantes. (B) Basándose en las curvas de titulación, se calcularon los valores de CE_{50} biológicos.

Se halló que los OH de los dúplex con multitud de modificaciones, independientemente de la presencia de uno o dos extremos con PTO, podían alcanzar los límites de actividad de la forma sin modificar del OH-GFP2 (OH Multi 1S2F, OH Multi 2S2F, OH-GFP2, figura 10). La adición adicional del 5'-trifosfato en la hebra sentido dio lugar a un incremento adicional de la actividad por un factor de 5 en comparación con los complejos con hidroxilo (3P-Multi 1S2F, 3P-Multi 2S2F, figura 10).

Como resultado, se observó que los efectos que hacen incrementar la actividad de diferentes modificaciones se pueden combinar con la trifosforilación del oligonucleótido y que también pueden mostrar su influencia positiva en ello.

Mediante el incremento progresivo del dúplex original OH-GFP2 a nivel de selectividad (2'-O-metilación), el incremento en la actividad por estabilización de las modificaciones (fijaciones de PTO y 2'-fluoro-sustituciones) y la afinidad por el bolsillo de fijación (trifosfato), se hizo posible definir un ligando selectivo de RIG-I que fuera potente (3P-Multi 1S2F).

Finalmente, se podía desarrollar un 3P-dsRNA en el que la actividad inmunoestimulante se incrementase hasta un máximo mediante la inserción específica de modificaciones. Este incremento de la inmunogenia hace posible mantener la dosis de un medicamento a una concentración baja y compensar las pérdidas de ARN que se producen en el periodo que va desde la aplicación de un medicamento hasta la entrada en una célula.

Oligonucleótidos de ARN

GFP2s oMet1	G _m ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
GFP2s oMet2	GA _m CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2s oMet23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU _m U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA A	
GFP2s oMet24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU _m CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2as oMet1	G ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C _m UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃

GFP2as oMet2	GA CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU _m GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2as oMet23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA _m A	
GFP2as oMet24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA _m	
OH-GFP2 multi oMet	G AC G CUGAC C C U GAAGUUCA UCUU C _m UG _m C _m GACUG _m G _m A _m CUUCAAGU _m AGAA _m	N _m = 2'-OCH ₃
s20/as12	GACGCUGACCCU GAAGUUCA _m UCUU CUGCGACUGGGA _m CUUCAAGU AGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s20/as19	GACGCUGACCCUGAAGUUC A _m UCUU CUGCGACUGGGACUUCAAG _m U AGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s15/as12	GACGCUGACCCU GAA _m GUUCAUCUU CUGCGACUGGGA _m CUU CAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s15/as19	GACGCUGACCCUGAA _m GUUC AUCUU CUGCGACUGGGACUU CAAG _m UAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s20/as3	GAC GCUGACCCUGAAGUUCA _m UCUU CUG _m CGACUGGGACUUCAAGU AGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s15/as3	GAC GCUGACCCUGAA _m GUUCAUCUU CUG _m CGACUGGGACUU CAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s3/as12	GAC _m GCUGACCCU GAAGUUCAUCUU CUG CGACUGGGA _m CUUCAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s3/as19	GAC _m GCUGACCCUGAAGUUC AUCUU CUG CGACUGGGACUUCAAG _m UAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
Fs1	G _F ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fs2	GA _F CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fs23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU _F U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA A	N _F = 2'-F
Fs24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU _F CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas1	G ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C _F UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas2	GA CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU _F GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA _F A	N _F = 2'-F
Fas24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA _F	
3P-GFP2	ppp-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
s15/as3 PTO	GAC GCUGACCCUGAA _m GUUCAUC U U CUG _m CGACUGGGACUU CAAGUAG*A*A	* = PTO N _m = 2'-OCH ₃

s15 PTO/as3	G*A*C GCUGACCCUGAA _m GUUCAUCUU C U G _m CGACUGGGACUU CAAGUAGAA	* = PTO N _m = 2'-OCH ₃
s15 PTO/as3 PTO	G*A*C GCUGACCCUGAA _m GUUCAUC U U C U G _m CGACUGGGACUU CAAGUAG*A*A	* = PTO N _m = 2'-OCH ₃
OH-GFP2 PTO 5'	G*A*CGCUGACCCUGAAGUUCAUC U U C U GCGACUGGGACUUCAAGUAG*A*A	* = PTO
OH-GFP2 oMet15/oMet3 PTO	G*A*C GCUGACCCUGAA _m GUUCAUC U U C U G _m CGACUGGGACUU CAAGUAG*A*A	* = PTO N _m = 2'-OCH ₃
OH-GFP2 F23s/13as	GACGCUGACCCUG AAGUUCAUCU _F U CUGCGACUGGGAC _F UUCAAGUAGA A	N _F = 2'-F
OH-GFP2oMet15/3 F23/13 PTO	G*A*C GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC U _F U C U G _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃
3P-GFP2 1S2F	ppp-GAC GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC*U _F *U CUG _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃
OH-GFP2 1S2F	GAC GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC*U _F *U CUG _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃
3P-GFP2 2S2F	ppp-G*A*C GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC*U _F *U C U G _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃
OH-GFP2 2S2F	G*A*C GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC*U _F *U C U G _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde el oligonucleótido comprende
- 5 una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos
5' GACGCUG_fACCCUGAA_mGUUCAUC_{PTO}U_{fPTO}U 3'; y
una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos
3' CUG_mCGACUGGGAC_fUUCAAGUAG_{PTO}A_{PTO}A 5'; o
una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos
- 10 5' G_{PTO}A_{PTO}CGCUG_fACCCUGAA_mGUUCAUC_{PTO}U_{fPTO}U 3'; y
una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos
3' CUG_mCGACUGGGAC_fUUCAAGUAG_{PTO}A_{PTO}A 5';
en donde
el nucleótido con subíndice m está 2'-O-metilado;
- 15 el nucleótido con subíndice f está 2'-fluorado; y
el subíndice PTO entre dos nucleótidos indica que dichos dos nucleótidos están unidos por un enlace fosfotioato; y
en donde la hebra sentido comprende un trifosfato en el extremo 5'.
2. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido es un ligando de RIG-I.
3. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición farmacéutica es para la administración intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal, subcutánea, intradérmica o intratecal.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la composición farmacéutica es para la administración intradérmica mediante tatuaje, micropunción y/o parches con microagujas.

Figura 1

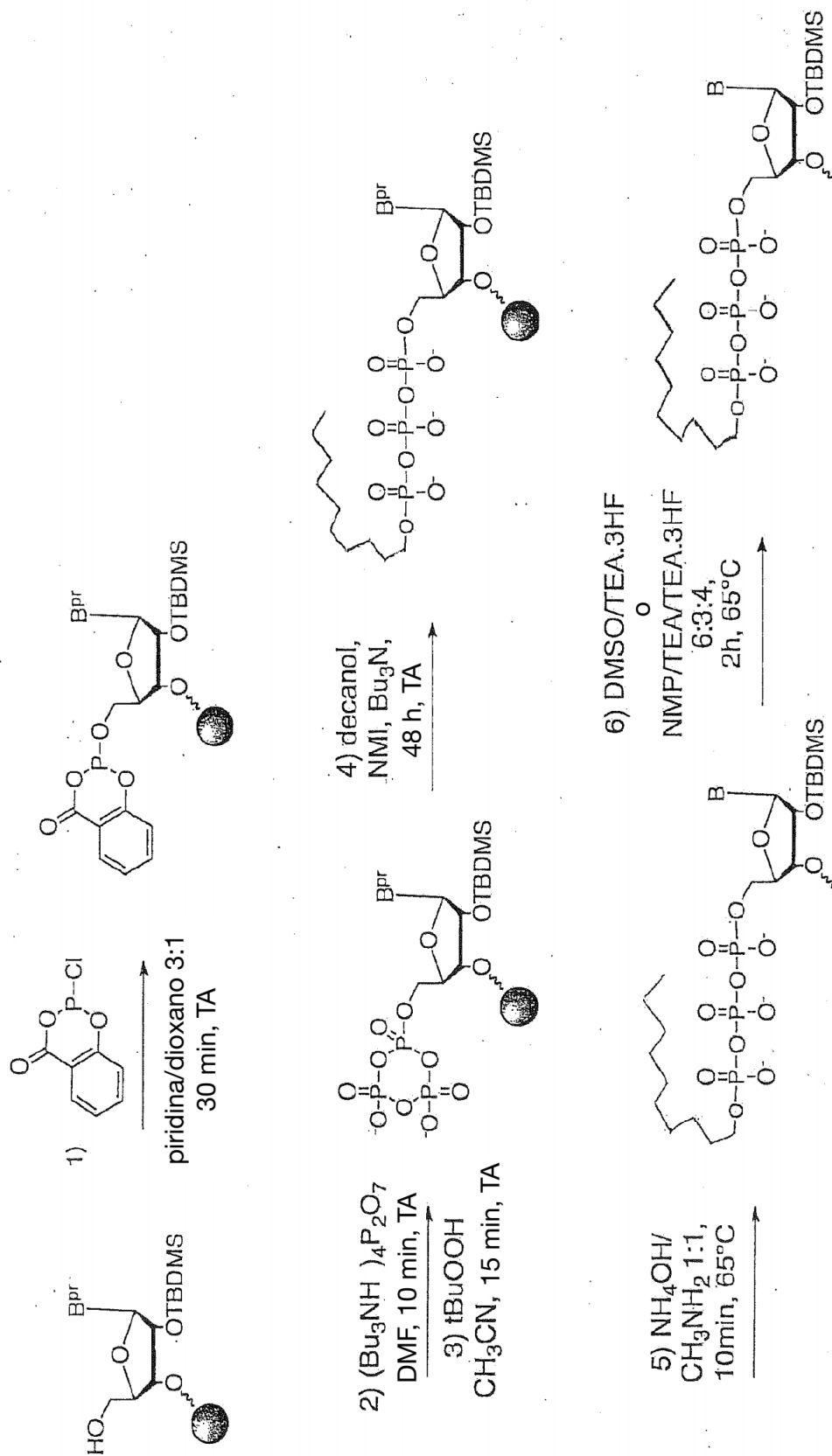


Figura 2

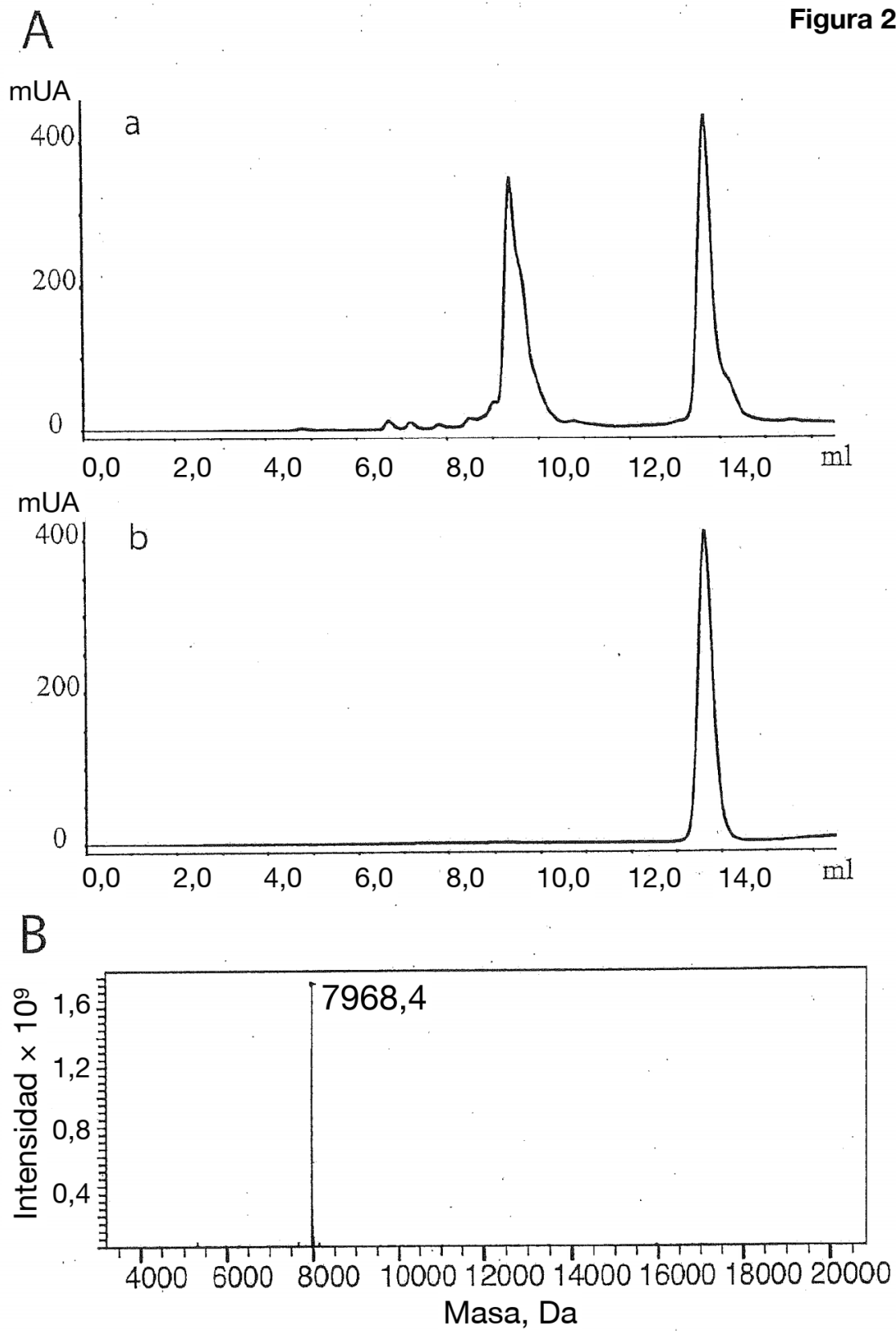


Figura 3

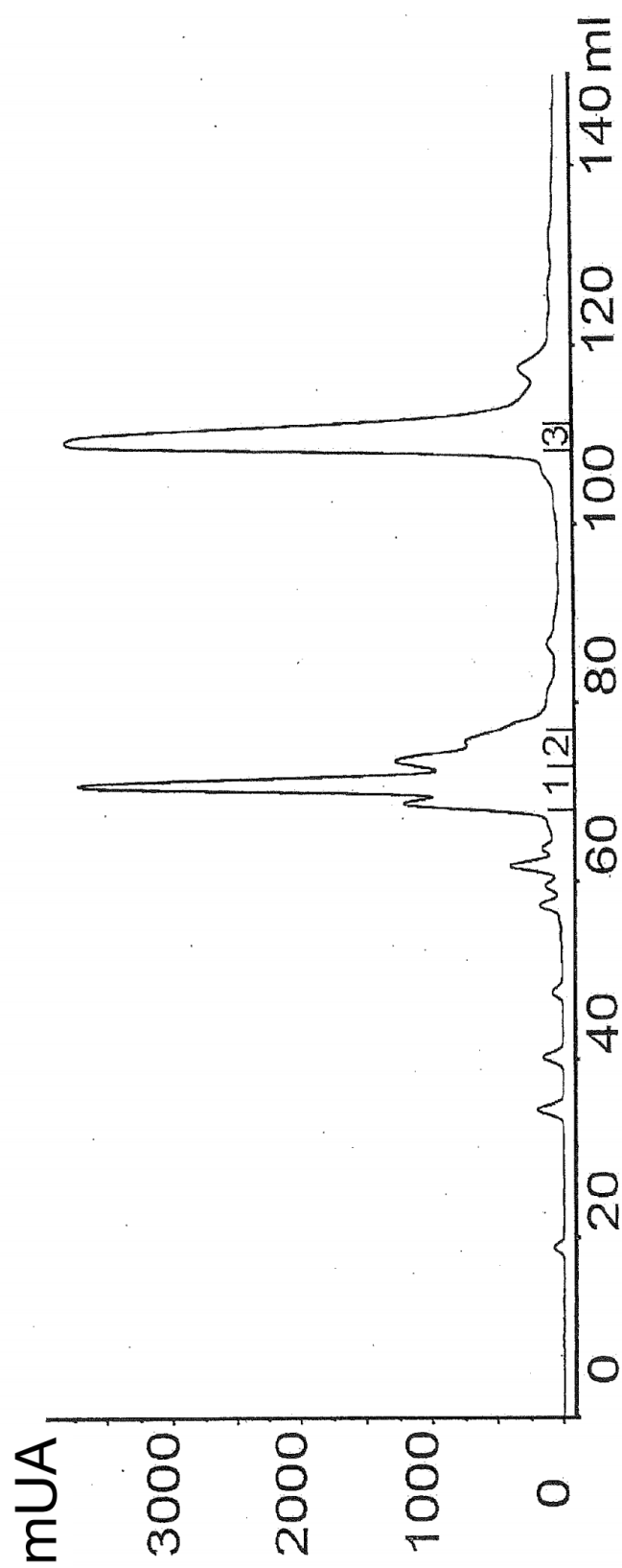


Figura 4

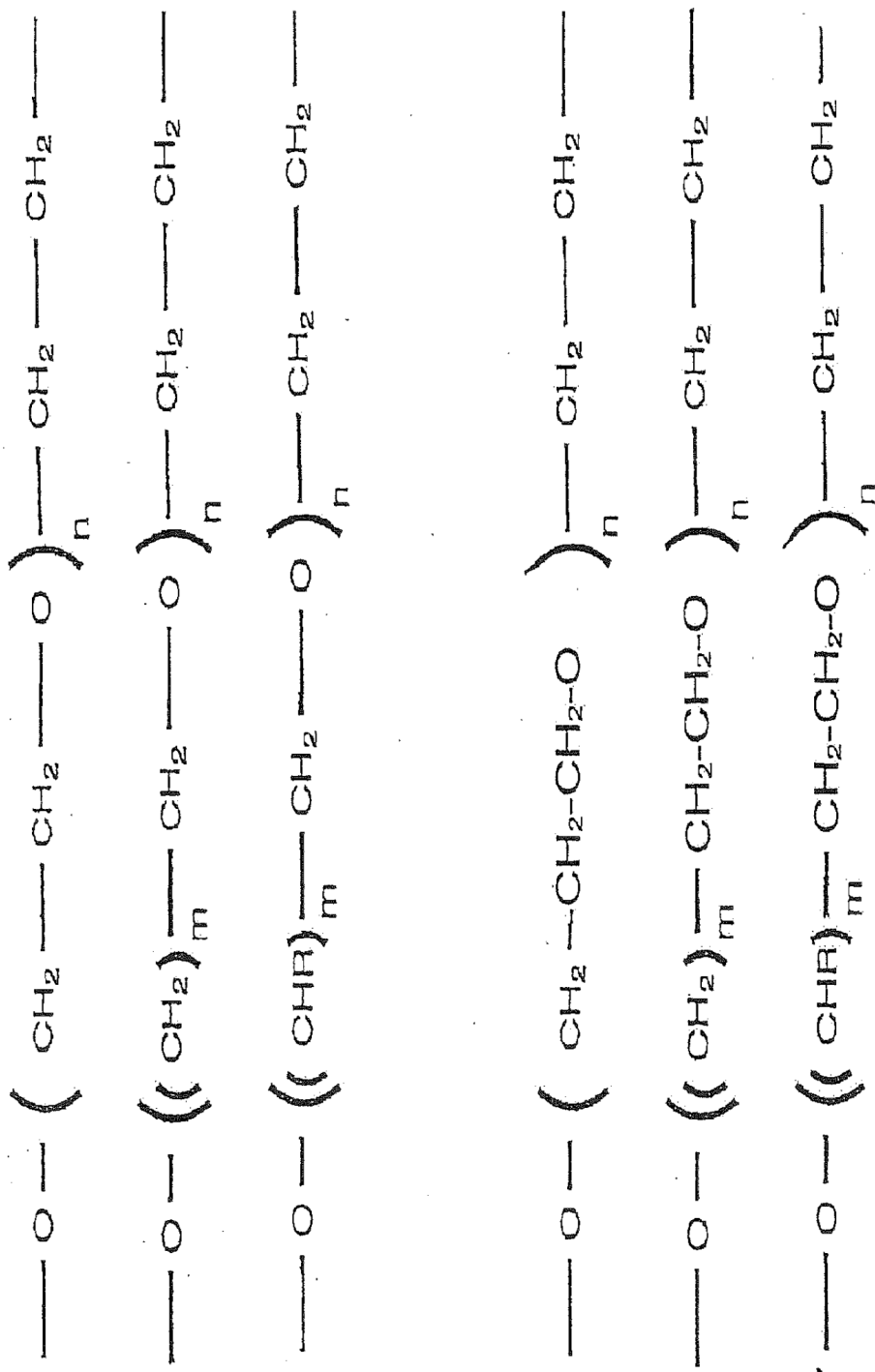
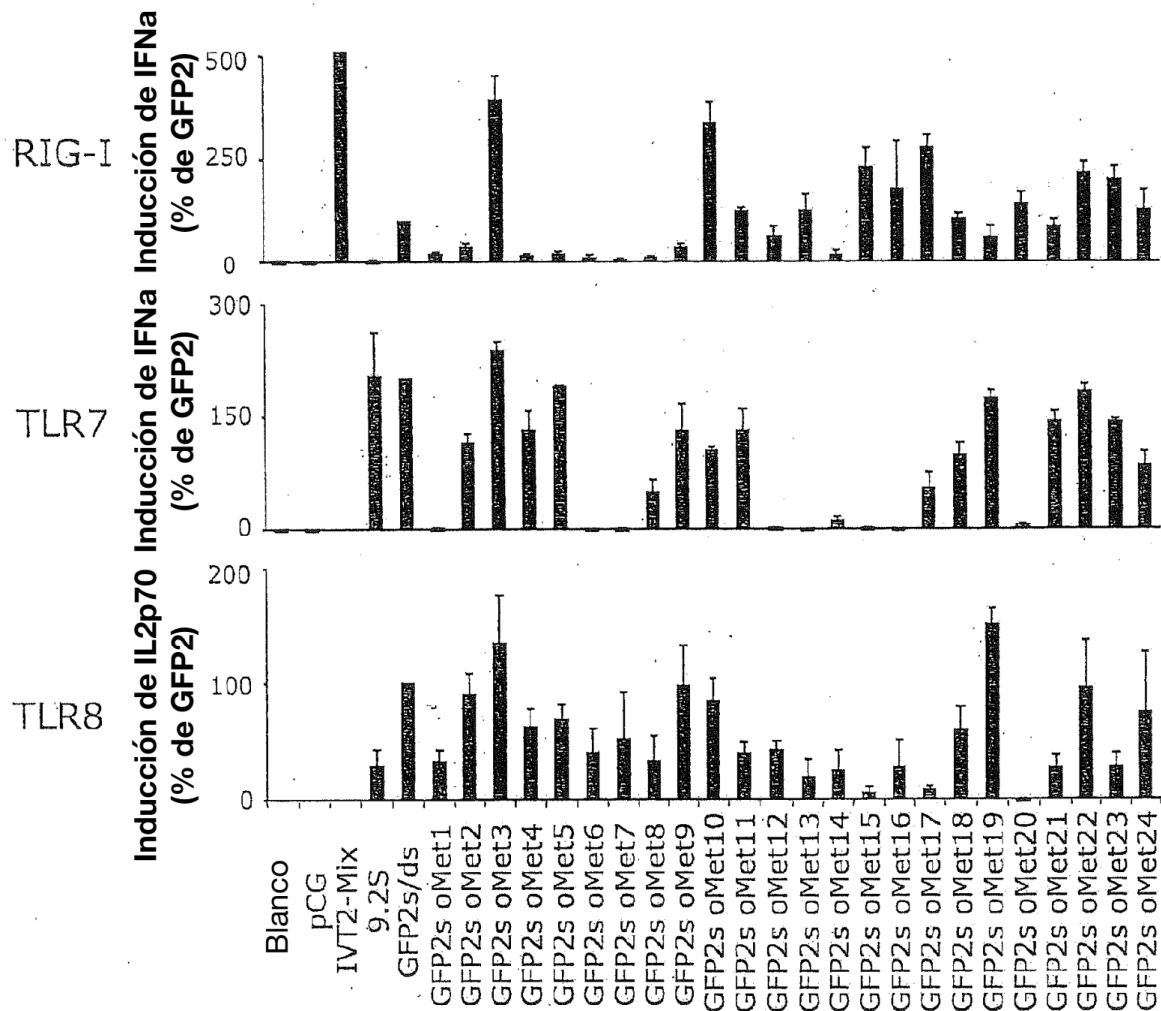


Figura 5

A Hebra sentido de GFP2 (5'-3')

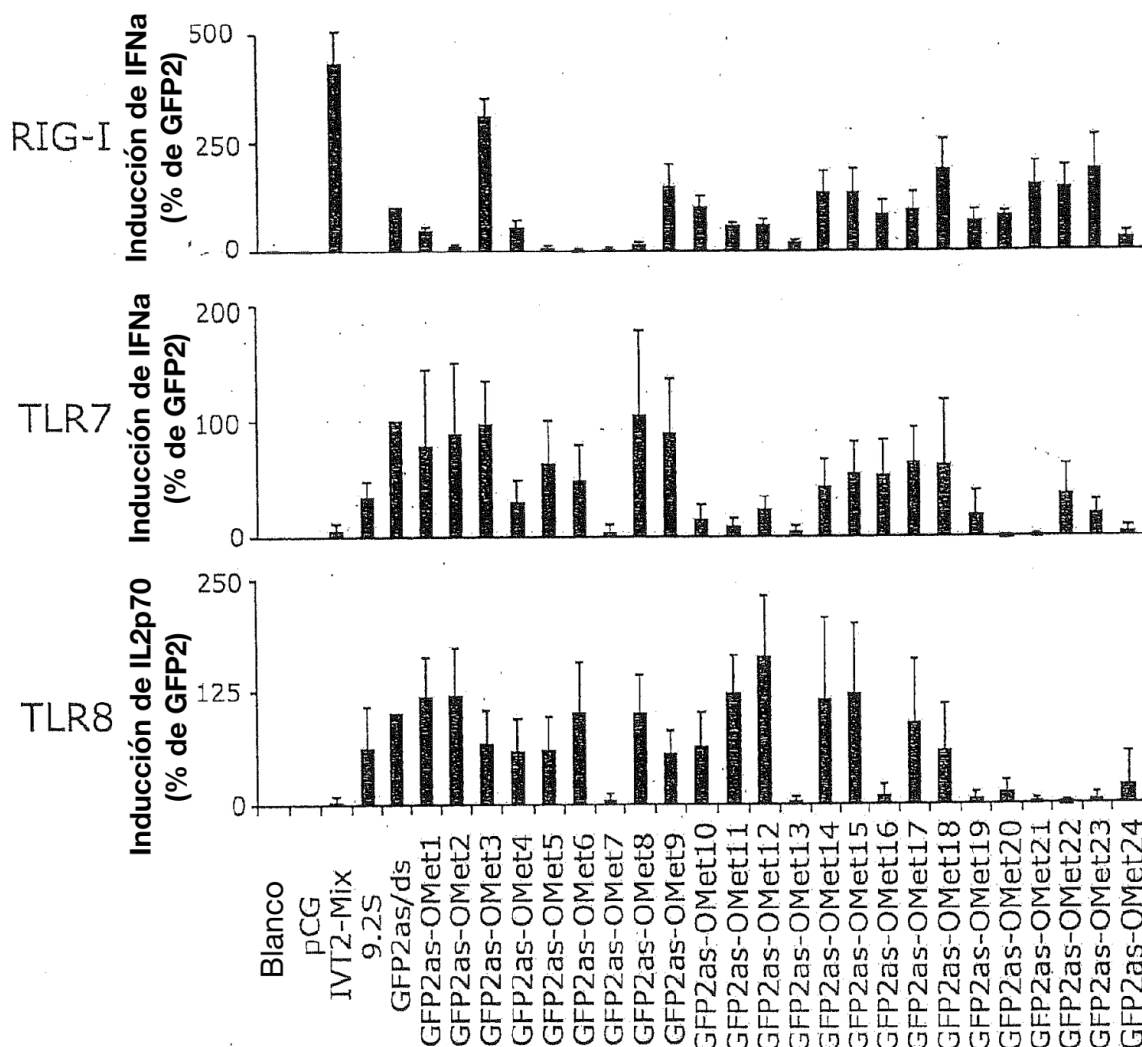


Hebra sentido de GFP2 (5'-3')

G	A		G					G		C	U	G	A	A	G		U	C	A	U		U	U
	A	C	G	C			A	C	C	C						U	U	C		U	C	U	U
G	A	C	G	C	U	G	A	C	C	C	U	G	A		G		U			U	C	U	U
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Figura 5 continuación

B Hebra antisentido de GFP2 (3'-5')



Hebra antisentido de GFP2 (3'-5')

C	C	C	C					G	G	G	A	C	U	U	C	A		G	U	A	G				
C	U	G	C	G			C	U				C	U	U	C	A	A				A	G	A	A	
C	U	G	G	G			C	U	G	G		C	U			C	A	A				A	G	A	A
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	

Figura 6

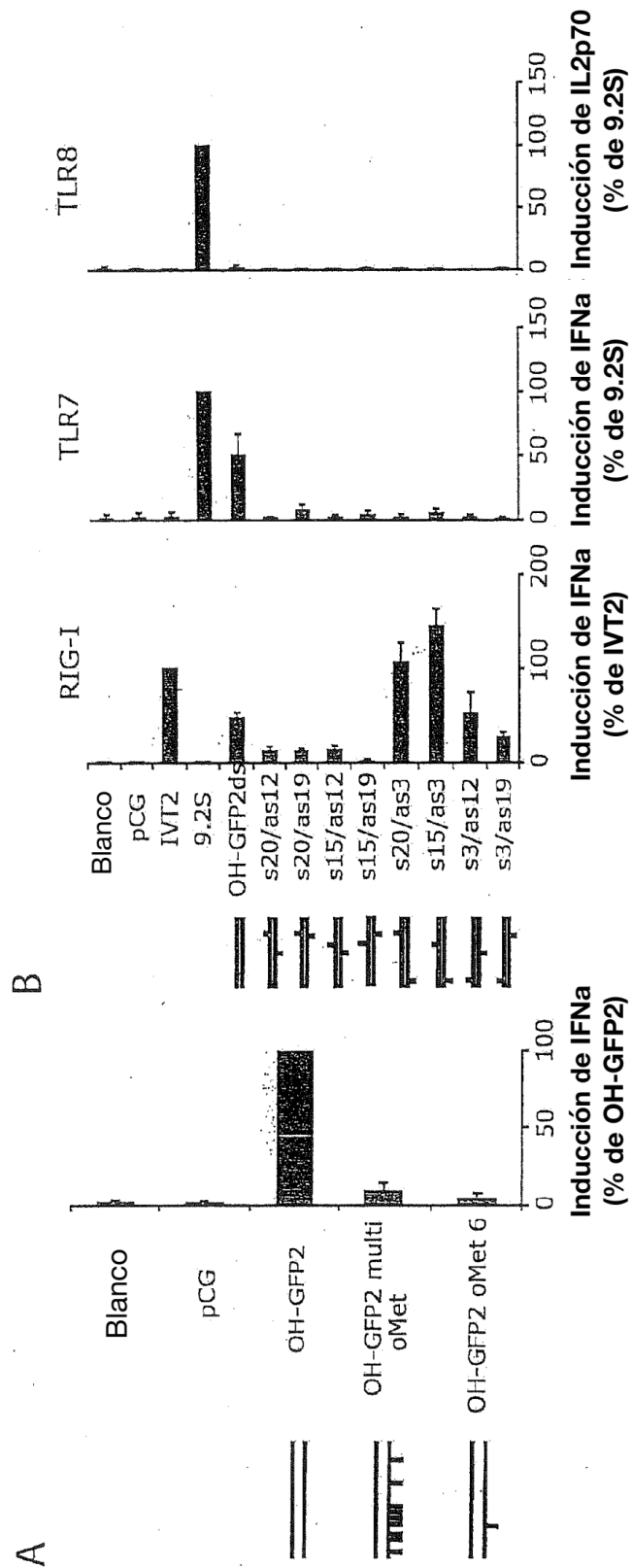


Figura 7

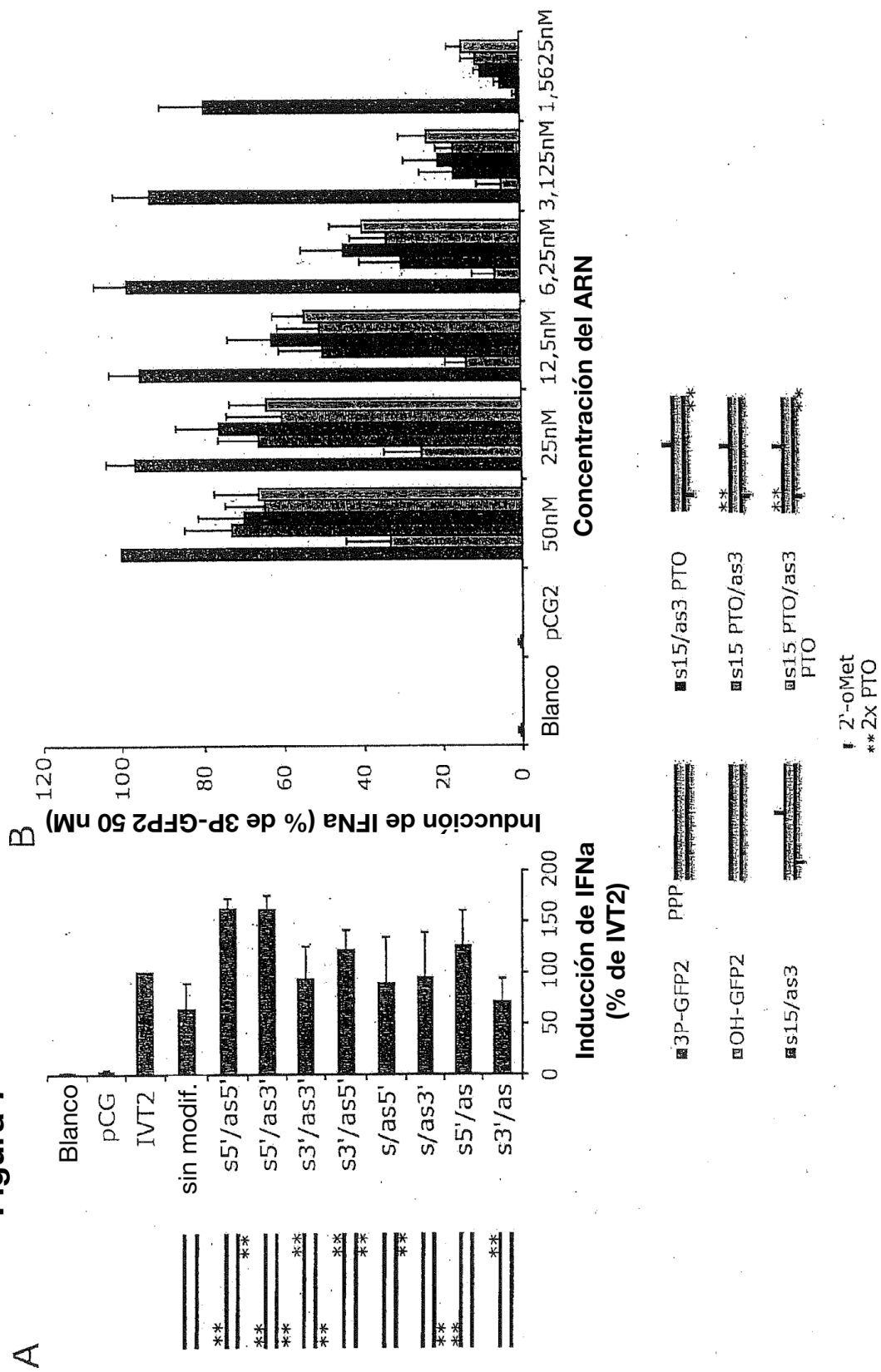


Figura 8

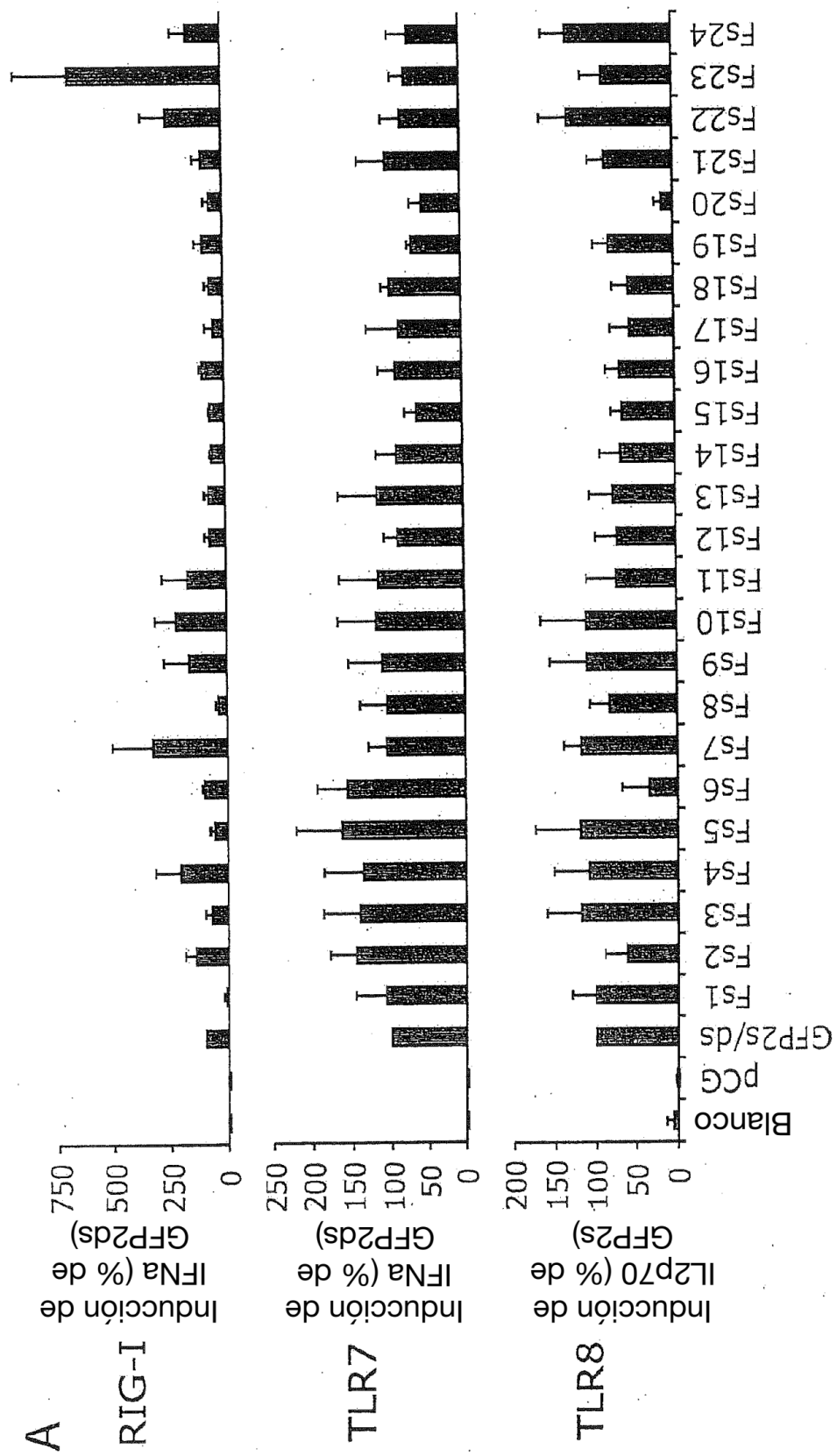
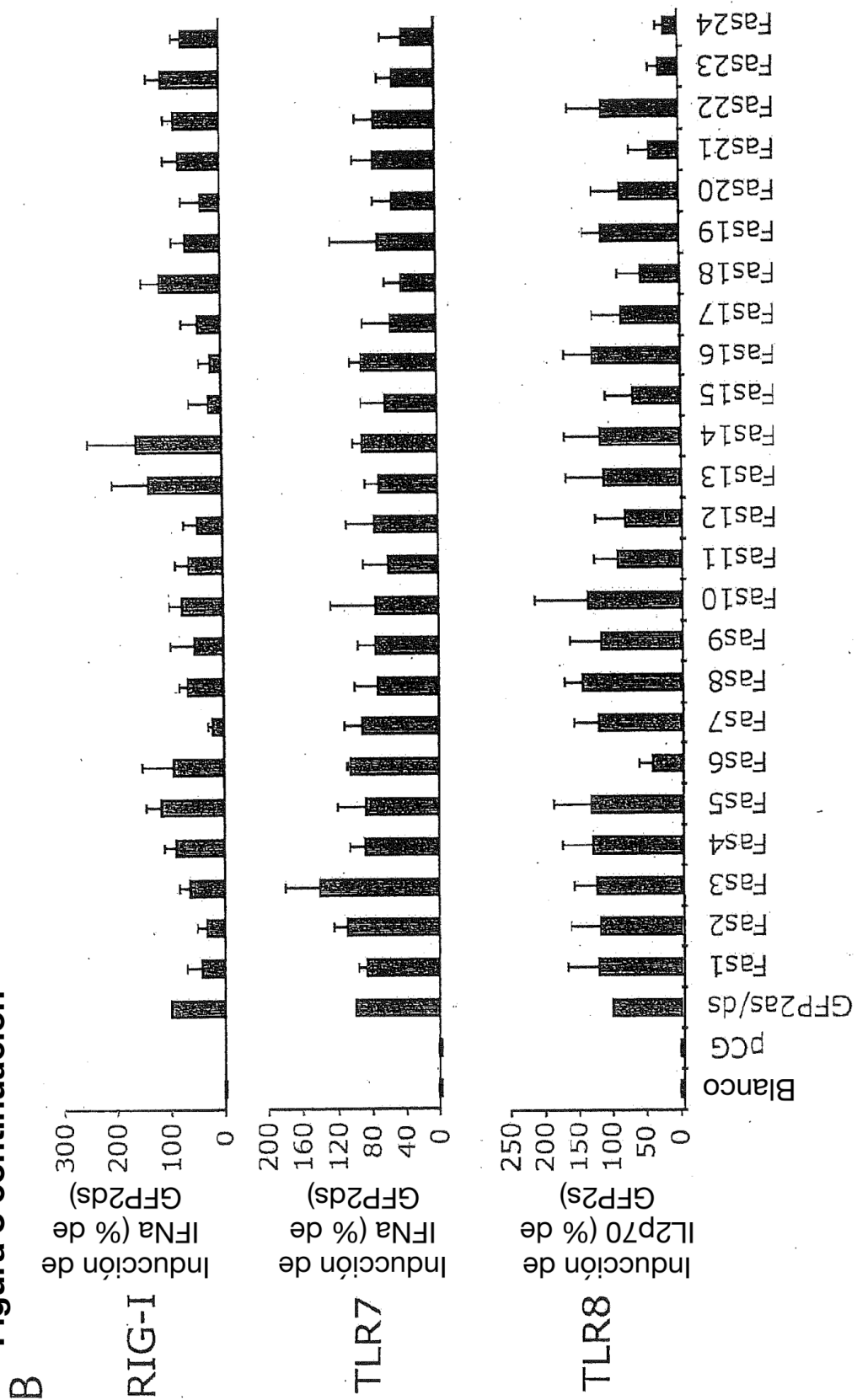


Figura 8 continuación



B Figura 9

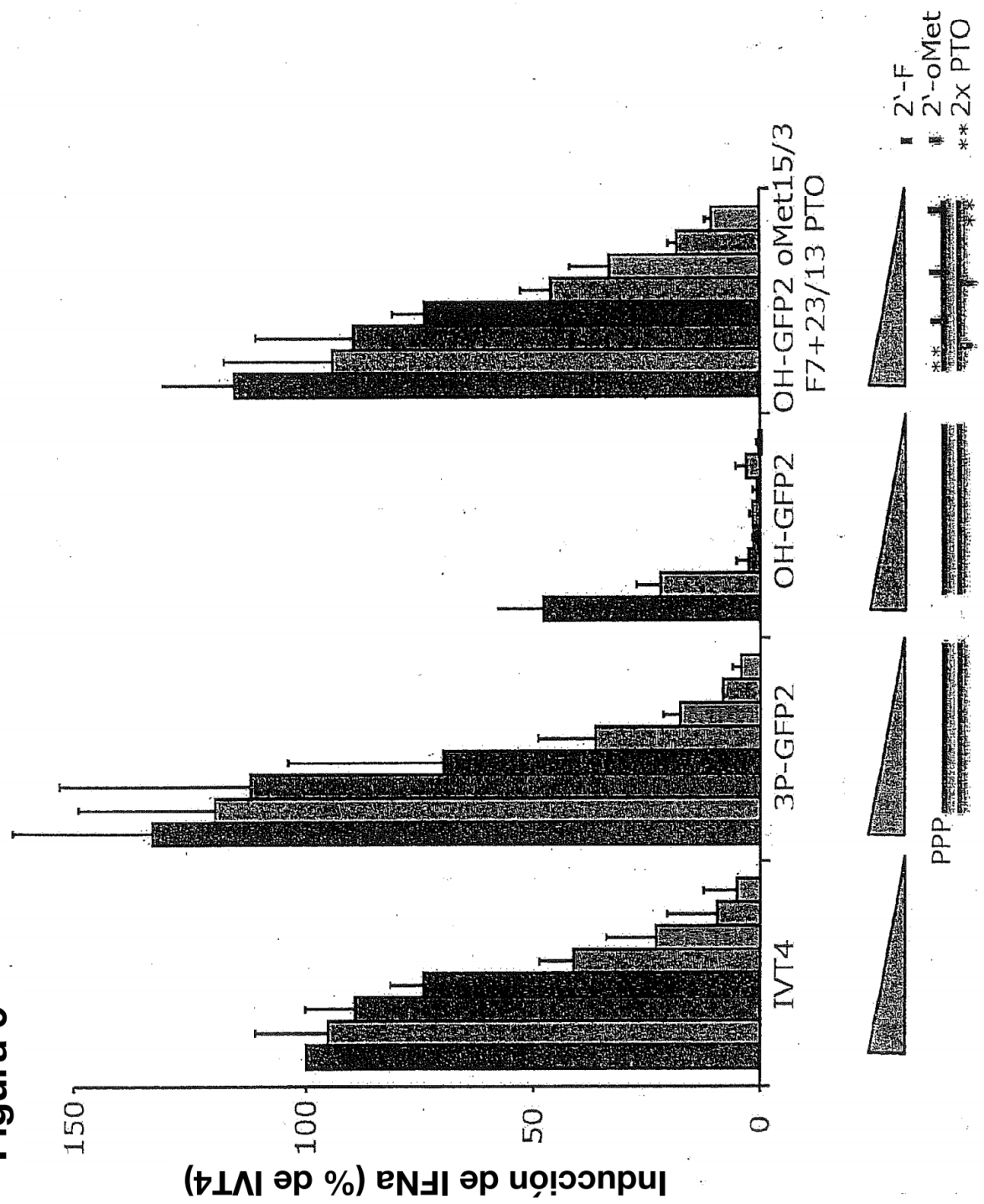


Figura 9 continuación

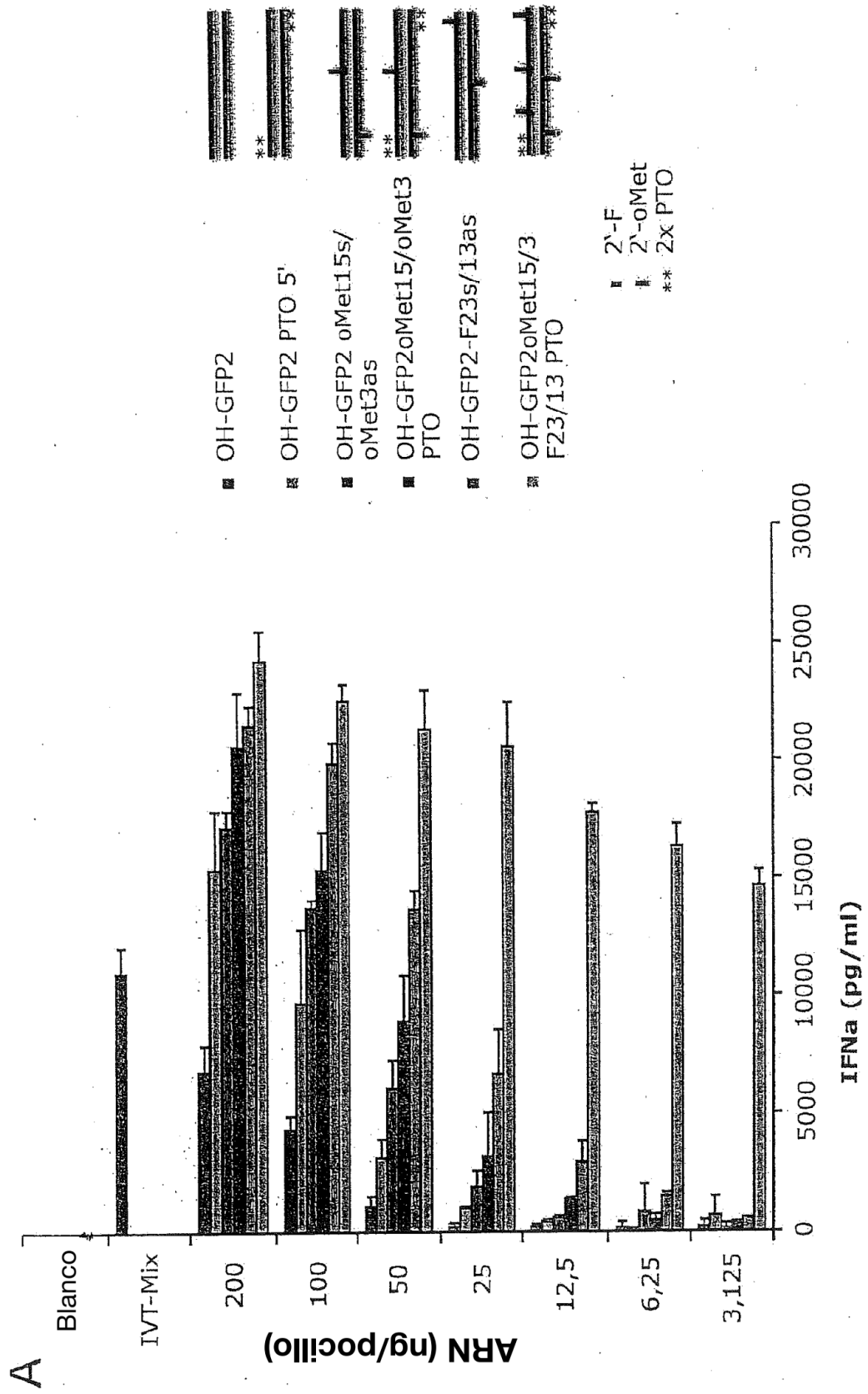


Figura 10

A

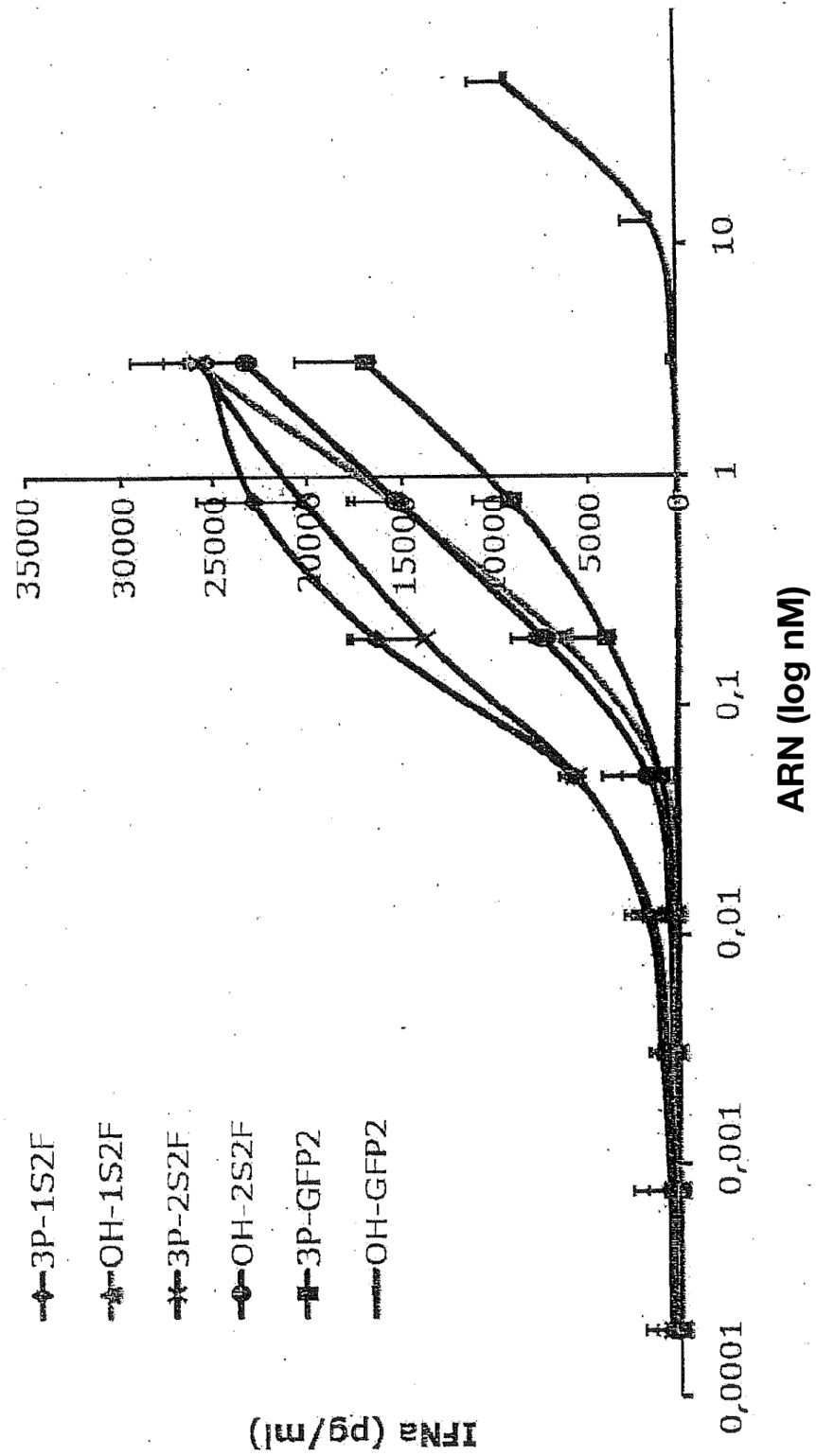


Figura 10 Continuación

B

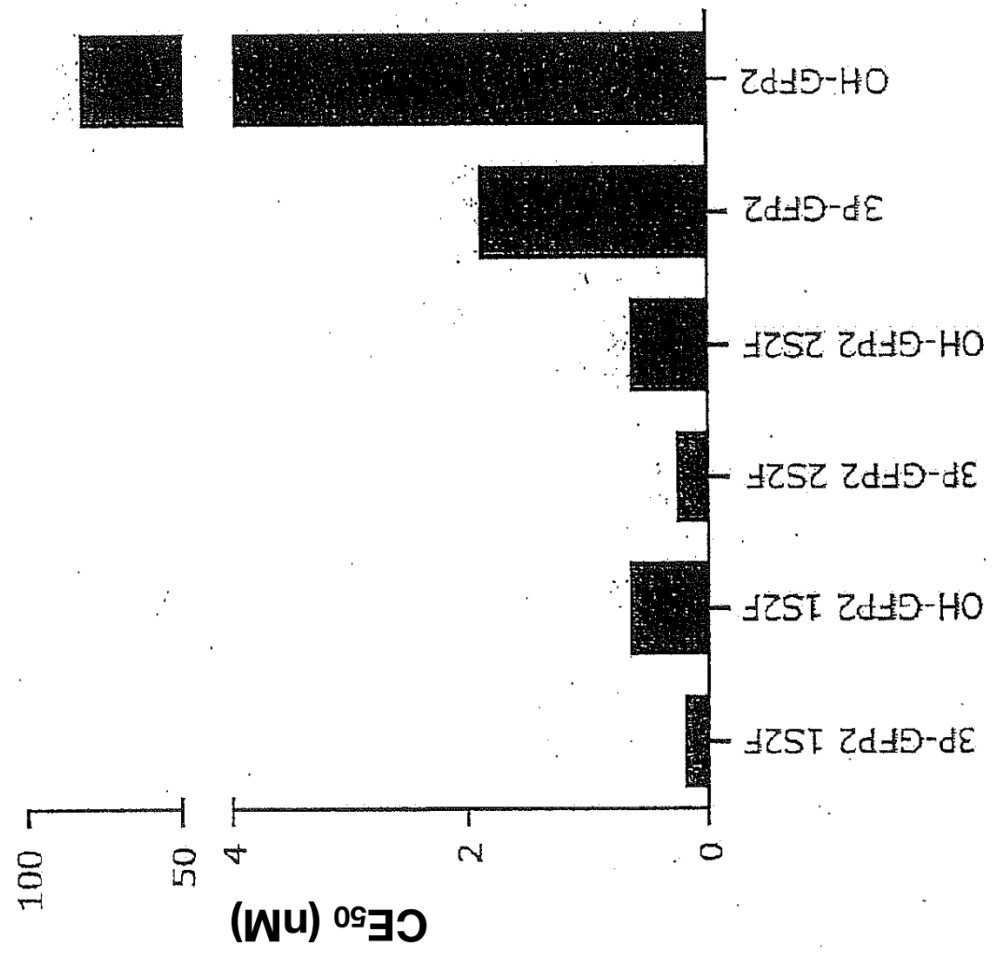


Figura 11

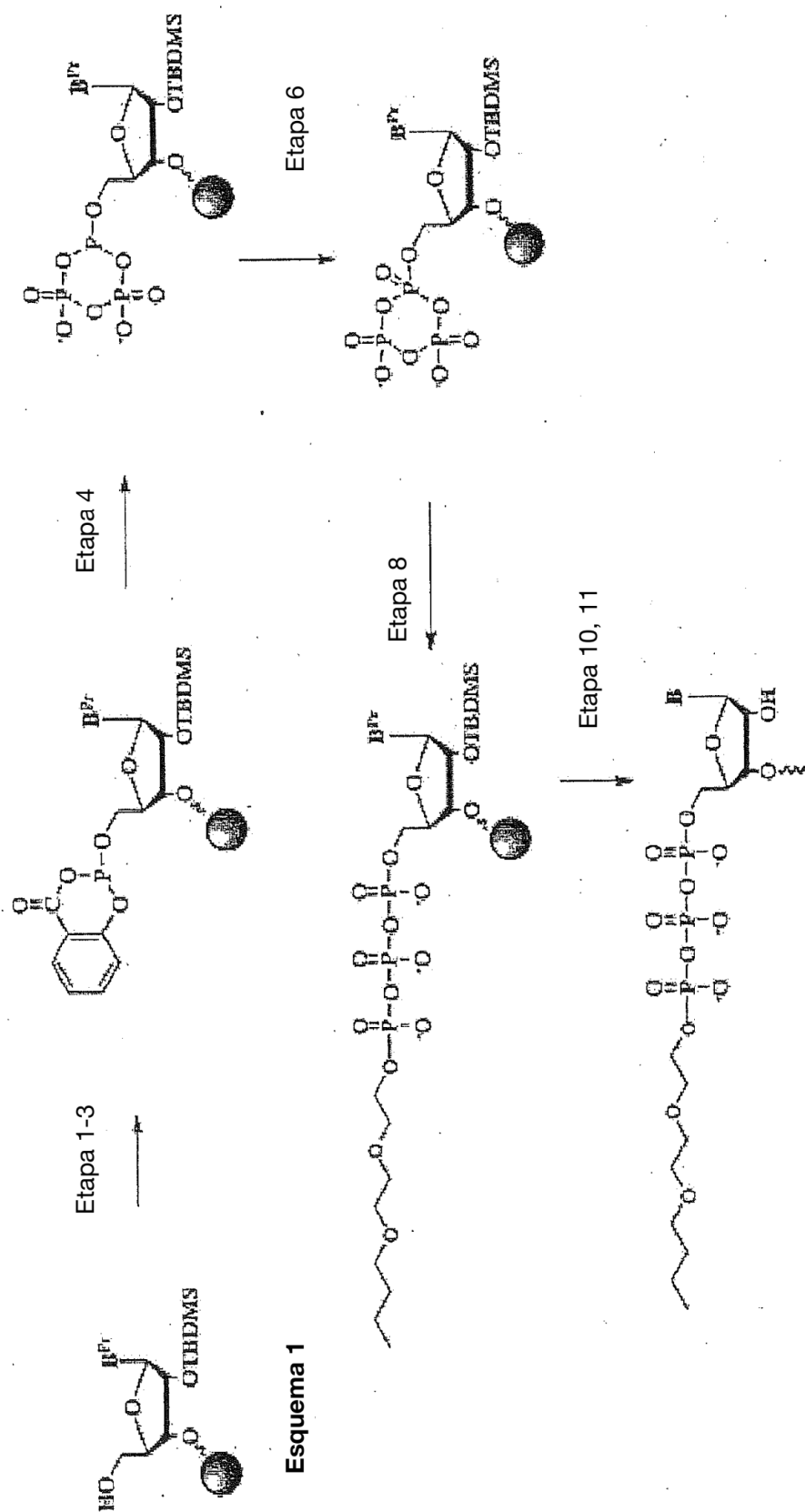


Figura 12

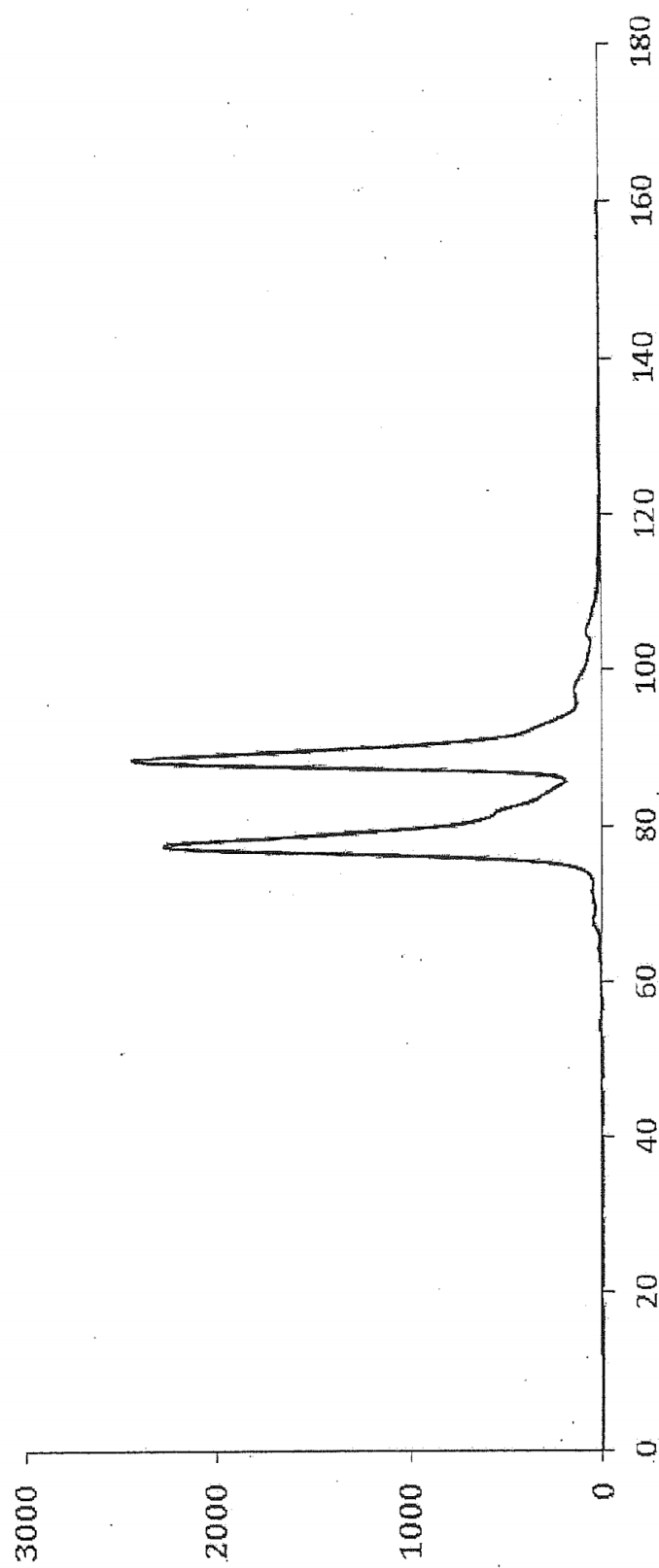


Figura 13

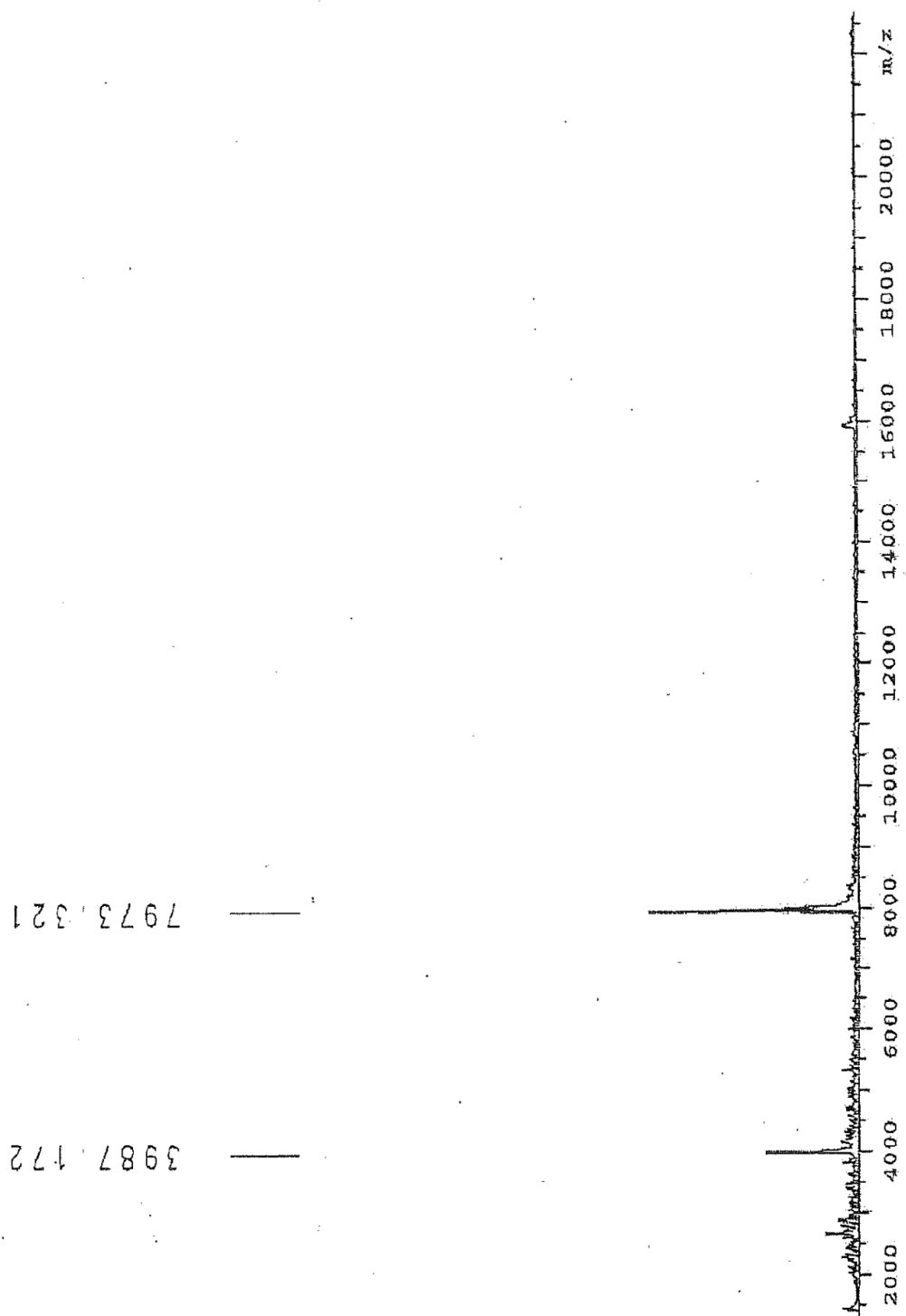


Figura 14

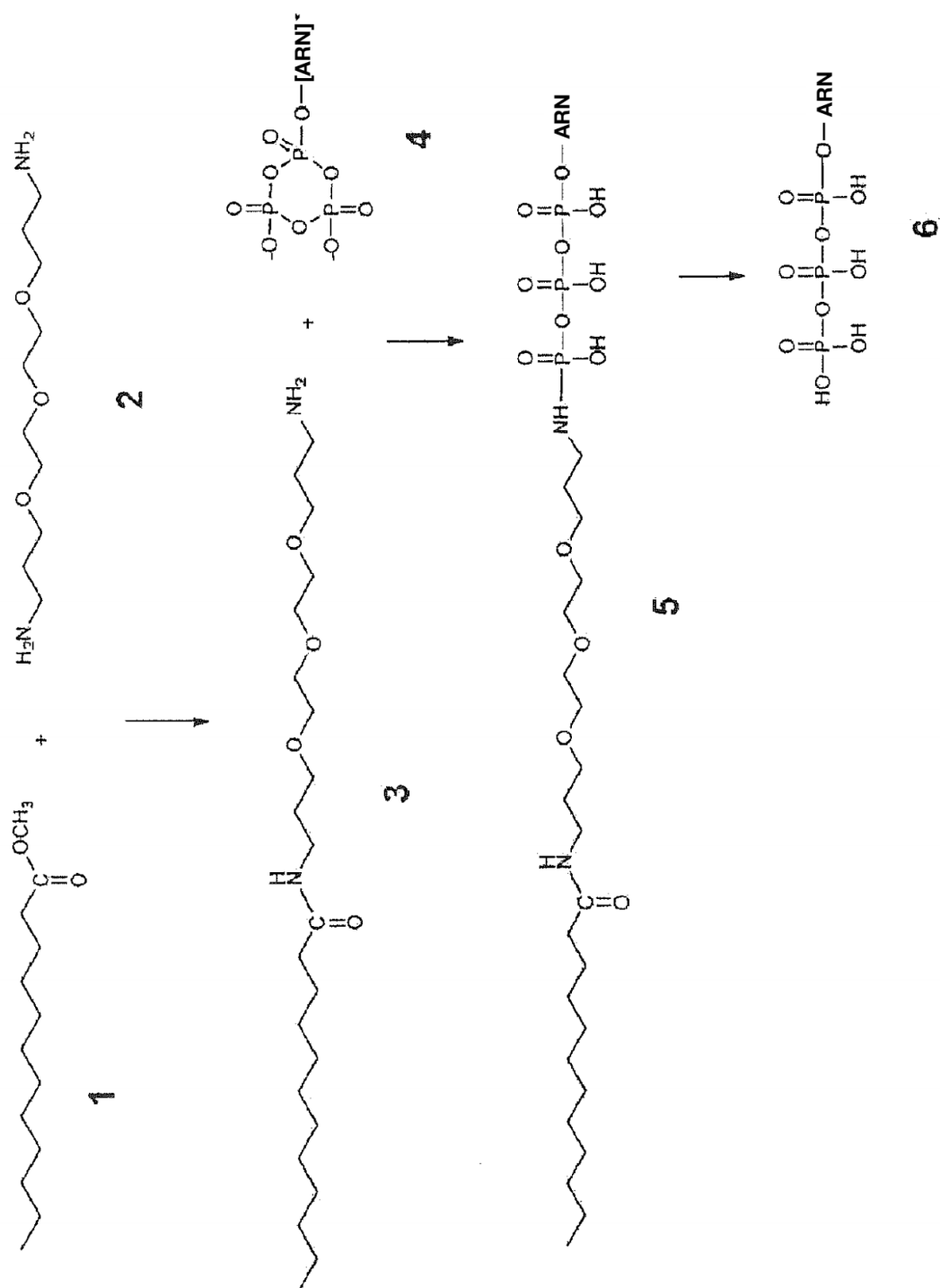


Figura 15

A

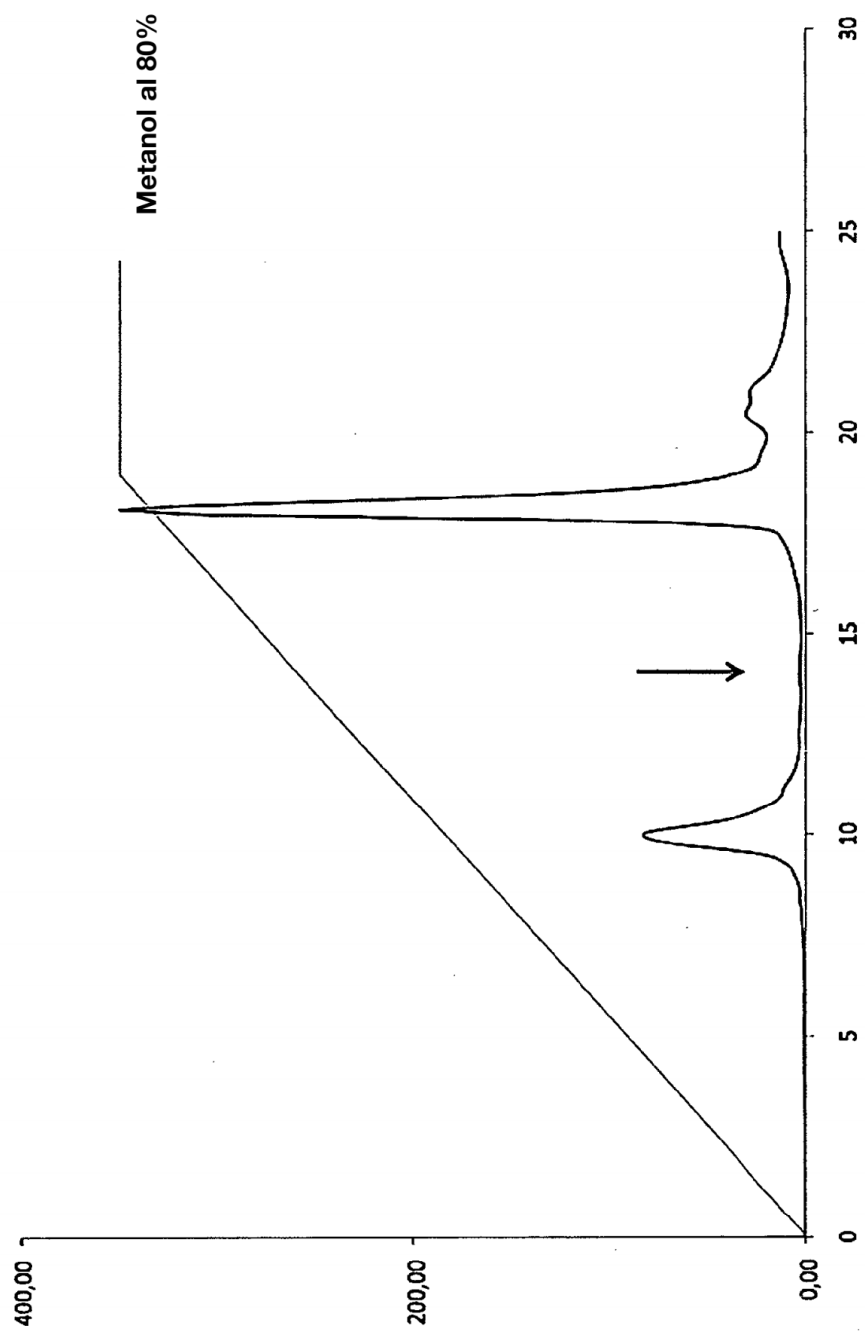


Figura 15 continuación

B

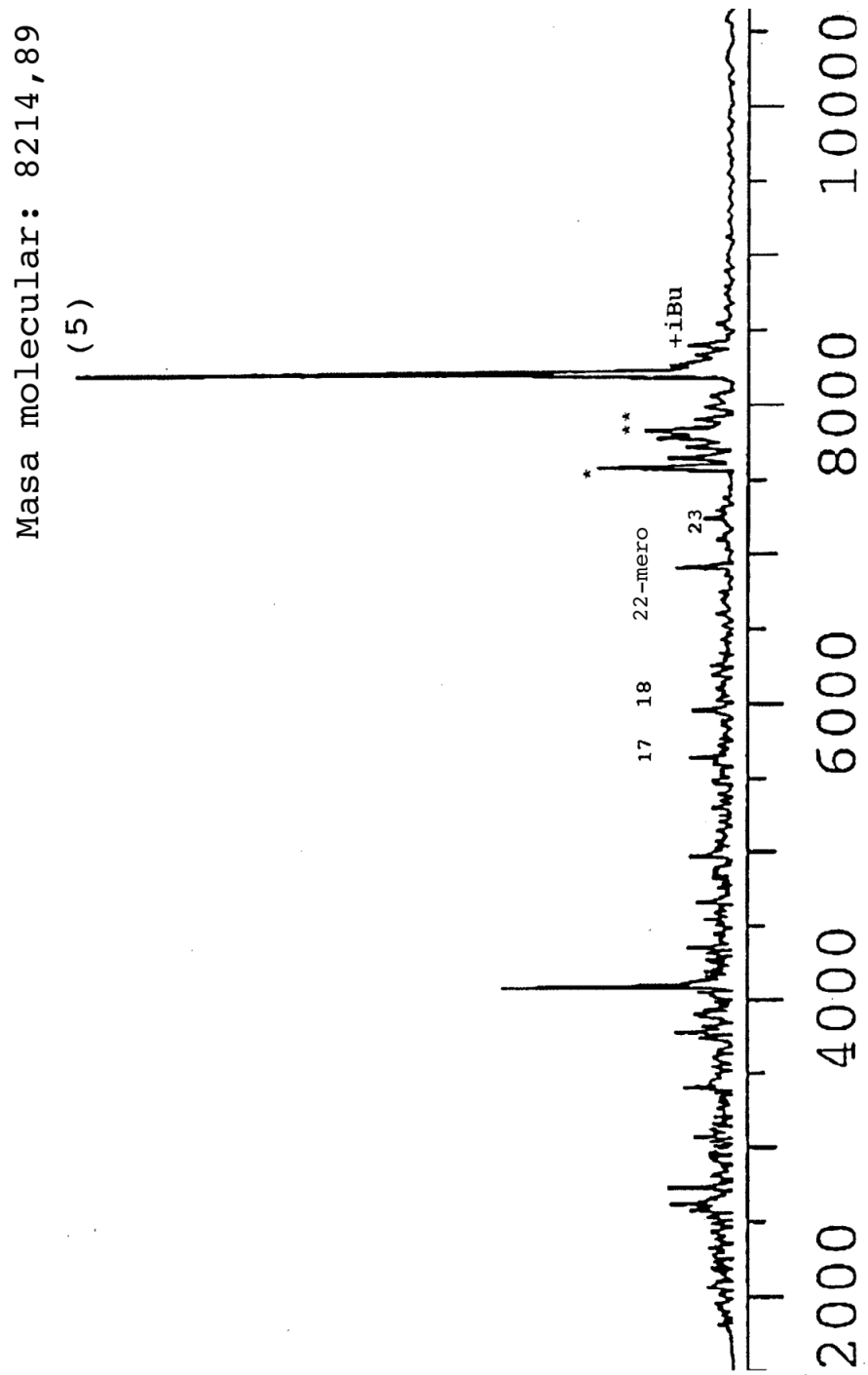
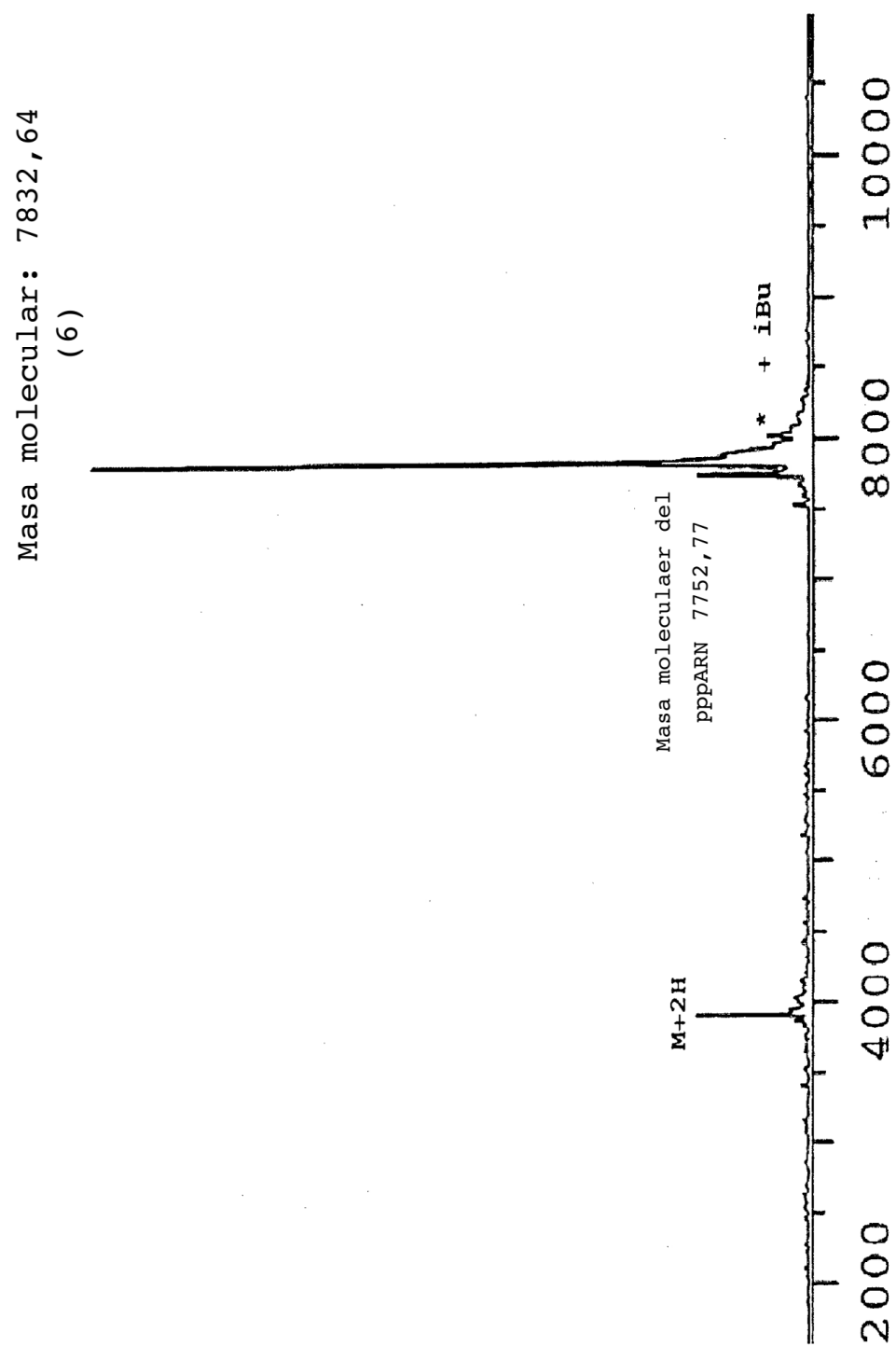


Figura 15 continuación

C



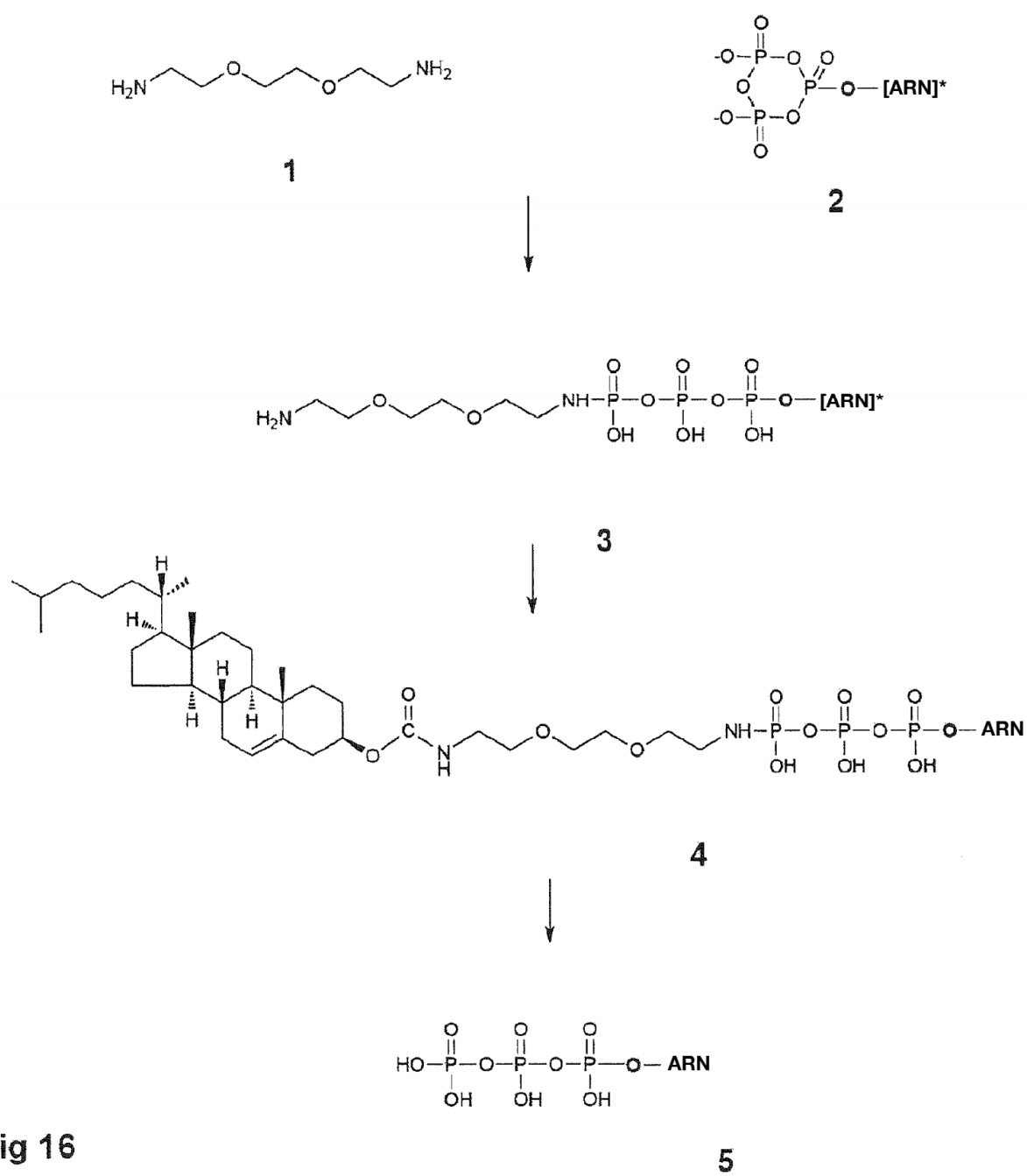


Fig 16

Figura 17