



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 372 237**

② Número de solicitud: 201030614

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

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **27.04.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2012**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
17.01.2012

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 70%)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
CIBER-BBN (Titular al 20%) y
Universidad de Barcelona (Titular al 10%)

⑱ Inventor/es: **Somoza Calatrava, Álvaro;**
Manning, Brendan;
Eritja Casadellá, Ramón;
Terrazas Martínez, Montserrat;
Ocampo, Sandra Milena;
Aviñó Andrés, Ana y
Perales Losa, José Carlos

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Oligonucleótidos modificados como reguladores de la expresión génica.**

㉖ Resumen:

Oligonucleótidos modificados como reguladores de la expresión génica.

La presente invención se refiere a un compuesto de pAR-Ni y un grupo R, donde R se selecciona entre alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo y sus procesos de síntesis. Además también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, así como sus usos en medicina.

ES 2 372 237 A1

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos modificados como reguladores de la expresión génica.

5 La presente invención se refiere a un compuesto de pARNi y un grupo R, donde R se selecciona entre alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo y sus procesos de síntesis. Además también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, así como sus usos en medicina. Por lo tanto pertenece al campo de la técnica de la biotecnología.

10

Estado de la técnica anterior

El ARN de interferencia (ARNi) es un importante mecanismo de regulación génica que puede ser utilizado para el silenciamiento específico de genes. El proceso es iniciado por ARNs de doble cadena que se denominan pARNi, pequeños ARN de interferencia (small interfering RNAs, siRNAs). Los pARNi, complementarios a un ARN mensajero determinado, se unen a un complejo proteico conocido como RISC. El complejo formado por la unión de la cadena antisentido o guía con RISC cataliza la degradación eficiente de un ARN mensajero específico, provocando un descenso de la proteína Diana. Durante los últimos años, se han realizado numerosos estudios con el fin de utilizar este fenómeno de regulación génica natural como base para una nueva terapia encaminada hacia la reducción específica de una proteína determinada previamente. Así, dicha terapia podría ser utilizada para el tratamiento de enfermedades en las que se conoce que son causadas por la sobreexpresión de genes tales como el cáncer o enfermedades inflamatorias [D. Brumcot y col. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nature Chemical Biology* 2 (2006), páginas 711-719; A. de Fougères y col. RNA interference *in vivo*: toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics *Methods in Enzymology* 392 (2005), páginas 278-296; C. Chakraborty Potentiality of small interfering RNAs (siRNA) as recent therapeutic targets for gene-silencing. *Current Drug Targets* 8 (2007) páginas. 469-482]. Para que este mecanismo de regulación se pueda convertir en un tratamiento efectivo es necesario que los pARNi produzcan un efecto inhibitorio prolongado, se puedan distribuir eficazmente en el organismo y se puedan dirigir con eficiencia hacia el órgano o tejido o grupo celular dañado. En esta invención se describen nuevos derivados del ARN con modificaciones en el extremo 3' en ambas cadenas, guía y acompañante. Estos nuevos derivados producen pARNi que son más estables a la degradación por nucleasas sin afectar el poder inhibitorio que transcurre a través del mecanismo mediado por RISC. Con el fin de utilizar los pARNi para el tratamiento efectivo de las enfermedades es necesario tener efectos inhibidores más duraderos, obtener una buena distribución de los pARNi en el cuerpo y la liberación controlada de los pARNi en el órgano, tejido o tipo de célula diana.

35 La introducción de modificaciones químicas en pARNi es una estrategia de gran utilidad para el desarrollo de nuevos compuestos con actividades inhibitorias y farmacológicas interesantes. Normalmente las modificaciones se han introducido en la cadena acompañante, ya que las modificaciones de la cadena guía pueden eliminar totalmente la actividad inhibitoria al comprometer la unión con el complejo proteico responsable de la acción inhibitoria conocido como RISC (RNA Interference Silencing Complex) [J. Elmen y col. (2005). Use of siRNA modified at 5'-end of sense strand resulting in impaired mRNA cleavage of activated RISC complex for use in treatment of cancer. *PCT Int. Appl. WO 2005/073378 A1*].

Descripción de la invención

45 En la presente invención se describen nuevos compuestos de pARNi que son más estables y/o eficaces en la inhibición de la expresión génica, como por ejemplo el de la luciferasa en células SH-SY5Y y HeLa así como en la inhibición del gen de necrosis tumoral alfa de ratón implicado en varias enfermedades inflamatorias tales como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y cáncer. También se describe la síntesis de oligoribonucleótidos que contienen moléculas alifáticas o aromáticas en el extremo terminal 3'.

La presencia de los grupos alifáticos y aromáticos en el extremo 3' tanto de la cadena guía o acompañante mantiene o mejora la estabilidad termodinámica de los dúplex resultantes de la mezcla de las cadenas guía o acompañante para formar un dúplex inhibidor o pARNi. Los duplexes pARNi unidos covalentemente a grupos alifáticos y aromáticos en la posición terminal en 3' pueden ser transfectados a células humanas y los conjugados entran eficientemente en el mecanismo de ARN de interferencia de forma semejante a los dúplex de pARNi sin modificar induciendo la inhibición específica del gen cuya secuencia es complementaria a la secuencia de los pARNi. Además los pARNi modificados tienen una estabilidad a las nucleasas presentes en el suero mucho más elevada que los pARNi sin modificar por lo que los pARNi descritos en esta invención pueden mantener el silenciamiento génico durante más tiempo que los pARNi sin modificar.

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

65



Fórmula (I)

donde:

Y es un dúplex de pARNi, o una cadena sencilla de pARNi, unido mediante un enlace tipo fosfato a X;

5 R se selecciona entre alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo (p. ej. azoarilo), estando R opcionalmente sustituido con al menos un grupo seleccionado entre halógeno (F, Cl, Br, I), haloalquilo, alquilo, C₂-C₅ alqueno, heterocicloalquilo, -NO₂, -CN, -CO₂R_a, -COR_b, -SR_c, -CONR_dR_e, -NR_fR_g, -OR_h, -SO₂NR_iR_j, donde R_a, R_b, R_c, R_d, R_e, R_f, R_g, R_h, R_i y R_j, se seleccionan independientemente entre H y C₁-C₆ alquilo (como por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo e isobutilo);

10 X es una molécula puente unida al pARNi (Y) mediante el enlace tipo fosfato a la posición 3' de la cadena guía o acompañante.

15 Los compuestos de pARNi que contienen grupos alifáticos y aromáticos en la posición terminal en 3' pueden ser sintetizados con buenos rendimientos. Por tanto, un segundo aspecto es un proceso para la síntesis en fase sólida de los compuestos según se definen el primer aspecto o en cualquiera de sus realizaciones particulares, caracterizado porque comprende las siguientes etapas (A. Aviñó y col. *Solid-phase synthesis of oligomers carrying several chromophore units linked by phosphodiester backbones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18 (2008) 2306-2310]:

- 20 i) enlazar covalentemente el grupo R y la molécula puente;
- ii) unir el compuesto obtenido en el paso (i) a un soporte sólido;
- 25 iii) ensamblar de manera secuencial una de las cadenas de pARNi sobre la molécula X-R unida al soporte sólido;
- iv) romper el enlace entre el soporte sólido y el producto y eliminar los grupos protectores obteniéndose una de las cadenas del pARNi conteniendo el grupo X-R;
- 30 v) mezclar cantidades equivalentes de las cadenas guía y acompañante para generar el dúplex de pARNi.

35 Un tercer aspecto es una composición farmacéutica que comprende los compuestos de pARNi de la presente invención y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto es el uso de los compuestos de la invención o de las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la preparación de un medicamento.

40

Descripción de las figuras

Figura 1 muestra la estabilidad de los pARNi modificados en el extremo 3' de la cadena guía en suero fetal bovino. Los pARNi modificados se incubaron con suero fetal bovino a 37°C. A tiempos determinados (0-9 horas) se sacaron alícuotas y se analizaron por electroforesis en geles del 20% de poliacrilamida. Todos los pRNAi modificados contiene la molécula puente de tipo treoninol. WT: sin modificación (pARNi n° 30, Tabla 2); Py: pireno (pARNi n° 37); Antra: antraceno (pARNi n° 38); Naph: naftaleno (pARNi n° 39); CF₃: trifluorometilfenilo (pARNi n° 40); F: fluorofenilo (pARNi n° 41); Me: metilo (pARNi n° 42).

50 Figura 2 muestra la actividad inhibitoria de los pARNi modificados: a) Actividad de los pARNi modificados en la cadena guía a una concentración 320 pM en células SH-SY5Y. b) Actividad de los pARNi modificados en la cadena acompañante a una concentración 320 pM en SH-SY5Y. c) Actividad de los pARNi modificados en la cadena guía a una concentración 32 pM en células HeLa después de 24 h. d) Actividad de los pARNi modificados en la cadena acompañante a una concentración 32 pM en células HeLa después de 24h. Todos los pRNAi modificados contiene la molécula puente de tipo treoninol. Buffer: control negativo, solución tampón sin pARNi.. WT: pARNi sin modificación (pARNi n° 30, Tabla 2); Py: pARNi conteniendo el derivado del pireno (pARNi n° 37, en a y c; pARNi n° 31 en b y d); Antra: pARNi antraceno (pARNi n° 38, en a y c; pARNi n° 32 en b y d); Naph: pARNi naftaleno (pARNi n° 39, en a y c; pARNi n° 33 en b y d); CF₃: pARNi trifluorometilfenilo (pARNi n° 40, en a y c; pARNi n° 34 en b y d); F: pARNi fluorofenilo (pARNi n° 41, en a y c; pARNi n° 35 en b y d); Me: pARNi metilo (pARNi n° 42, en a y c; pARNi n° 36 en b y d);

65 Figura 3 muestra la actividad inhibitoria de los pARNi que contienen acridina y quindolina en el extremo 3' de la cadena acompañante contra el gen del TNF- α de ratón en células HeLa. s.m.: pARNi dúplex sin modificar; 63: pARNi dúplex que contiene acridina en el extremo 3' de la cadena acompañante (63); 64: pARNi dúplex que contiene quindolina en el extremo 3' de la cadena acompañante (64); Ser: ARN dúplex control de secuencia aleatoria. Las barras de control representan la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se hizo con el método de ANOVA modificado por Bonferroni. ***p<0,001 comparando con el pARNi de secuencia aleatoria.

Figura 4 muestra la actividad inhibitoria de los pARNi modificados en el extremo 3' de la cadena guía enfrente al gen del TNF- α de ratón en células HeLa usando Oligofectamina. Células HeLa fueron cotransfectadas con 250 ng de plásmido pCam TNF- α usando lipofectamina como vector de transfección, una hora después se transfectaron 50 nM de cada uno de los pARNi usando Oligofectamina. Después de 48 horas se midieron los niveles de TNF- α por ELISA, s.m.: pARNi dúplex sin modificar; 101: pARNi dúplex que contiene acridina en el extremo 3' de la cadena acompañante (101); 103: pARNi dúplex que contiene quindolina en el extremo 3' de la cadena acompañante (103); Ser: ARN dúplex control de secuencia aleatoria. Los datos representan las medias \pm ES, n=3 y son comparados con la secuencia aleatoria. ***p<0,001. test ANOVA.

10

Descripción detallada de la invención

La actividad y/o estabilidad de los compuestos de pARNi de la presente invención se puede modular en función de los grupos R seleccionados. Se ha observado una relación entre el tamaño de la modificación en la cadena guía y la actividad de silenciamiento génico, siendo los derivados de tipo fenilo y acetilo los derivados mas eficientes en la actividad inhibitoria. Por ejemplo el compuesto donde R es alquilo o alqueno de cadena corta, es decir de C₁ a C₅, como por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o isobutilo, presentan buenas actividades, inclusive mejorando las del ARN natural. Los R más preferidos son el metilo o etilo, siendo aun más preferido el metilo. El grupo X-R de los derivados de alquilo y alqueno está introducido preferentemente en la posición terminal 3' de la cadena guía.

20

De acuerdo con una realización particular, R es alquilo C₁-C₆ o alqueno C₂-C₅, como por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o isobutilo. Preferiblemente R es metilo o etilo, más preferiblemente metilo.

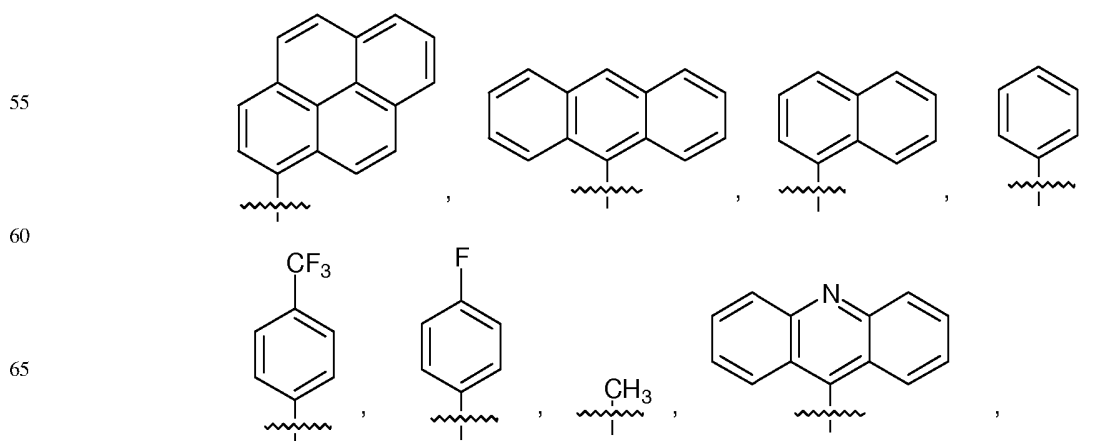
La estabilidad de los compuestos se puede incrementar seleccionado derivados cíclicos, como son los cicloalquilo, como el ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo, arilos, como fenilo, naftilo, antracilo o pireno, o heteroarilos. En el caso de los arilos los dos grupos más preferidos son fenilo o naftilo, y aún más preferiblemente fenilo. Los heteroarilo preferidos son acridinilo, quindolinilo, quinolinilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tia-4H-pirazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzoxazolilo, benzimidazolilo, benzotriazolilo, indazolilo, indolilo, isoindolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidilo, pirazinilo, triazinilo, isoquinolinilo, azocinilo, indolizínilo, purinilo, cinnolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftapiridinilo, pteridinilo, carbazolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, xantenilo o oxapinilo, preferiblemente acridinilo, quindolinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pteridilo y ftalazinilo. Al igual que en el caso de los grupos alquilo y alqueno el grupo X-R está preferiblemente unido a la posición terminal 3' ya sea de la cadena guía o acompañante, aunque éste está preferiblemente unido en la posición 3' de la acompañante porque el dúplex muestra mayor estabilidad que el ARN natural, pero sin pérdida de actividad.

35

Como ya se ha comentado anteriormente, el grupo R puede estar sustituido. Sorprendentemente cuando R está sustituido con al menos un grupo electroatrayente, como por ejemplo F, Cl, Br, I y C₁-C₃ haloalquilo, estos compuestos muestran un mayor actividad que su análogo sin dicha sustitución. Ejemplos de haloalquilo útiles para la presente invención son los grupos -CH₂F, -CHF₂, -CF₃, -CCl₃ y -CBr₃. Excelente resultados se han obtenido con R sustituidos con fluoroderivados como el propio flúor o bien derivados del metilo como el -CH₂F, -CHF₂ y -CF₃. Preferiblemente F y -CF₃. La mejora de la actividad de los grupos R sustituidos con flúor, o fluoroderivados, se ha observado particularmente cuando R es un grupo C₁-C₆ alquilo, y más claramente cuando R es un grupo C₁-C₃ alquilo sustituido con al menos un grupo F. Uno de los mejores resultados respecto actividad se ha visto cuando R es un grupo -CF₃. La mejora de la actividad gracias a los grupos electroatrayentes no se limita solo a los R alquílicos, sino que también es extensible a R cíclicos, como cicloalqueno, arilo o heteroarilo, y al igual que en los alquílicos los sustituyentes preferidos para los grupos cíclicos, y en especial para los arilos, son F o -CF₃. Preferiblemente R es un grupo fenilo sustituido con un grupo F o -CF₃, y más preferiblemente R es 4-fluorofenilo o 4-trifluorometilfenilo.

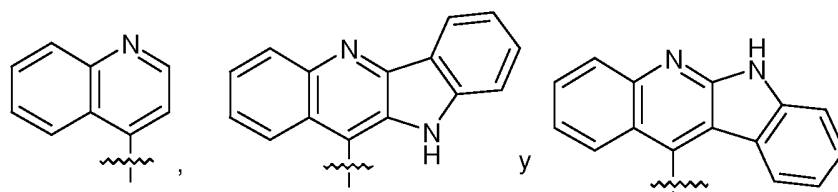
A continuación se detallan algunos grupos R particulares útiles para la presente invención:

50

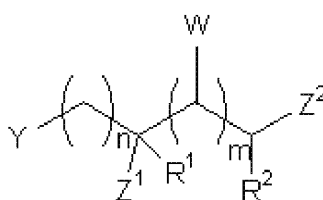


60

65



10 Como ya se ha comentado anteriormente el grupo R no se enlaza directamente a las posiciones terminales de la cadena de pARNi, sino que se utiliza una molécula puente, que a su vez está unida a la posición terminal de la cadena de pARNi a través de un enlace tipo fosfato. Estos puentes son conocidos en la técnica (ver A. Aviñó y col. Solid-phase synthesis of oligomers carrying several chromophore units linked by phosphodiester backbones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18 (2008) 2306-2310). En una realización particular, la molécula puente X es treoninol, glicerol, 2-amino-1,3-propandiol, 2-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,2-propandiol, 15 hidroxiprolinol, serinol, o cualquier otro aminoalquidiol. Preferiblemente X es treoninol. De manera particular, el compuesto de pARNi puede tener la siguiente fórmula (II):



Fórmula (II)

30 donde:

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

35 Z¹, Z² y Z³ se seleccionan independientemente entre -OH, -O-R, -NHC(=O)R y -NH₂;

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

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

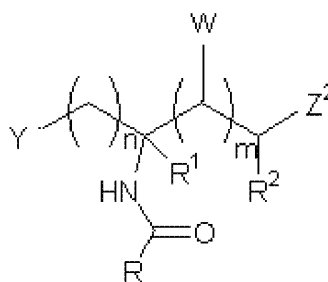
m es un número entero que se selecciona entre 0, 1, 2, 3 y 4;

45 Y es según se ha definido anteriormente;

R se selecciona independientemente entre los R definidos anteriormente.

50 Evidentemente en caso de que m sea superior a 1 puede haber diferentes grupos W. Estos grupos W no tienen porque ser todos idénticos sino que pueden ser seleccionados de manera independiente de entre los diversos significados de W especificados anteriormente.

En una realización particular Z¹ comprende un enlace amida unido a un grupo puente, por lo que se podría representar por la siguiente fórmula (III):



Fórmula (III)

donde:

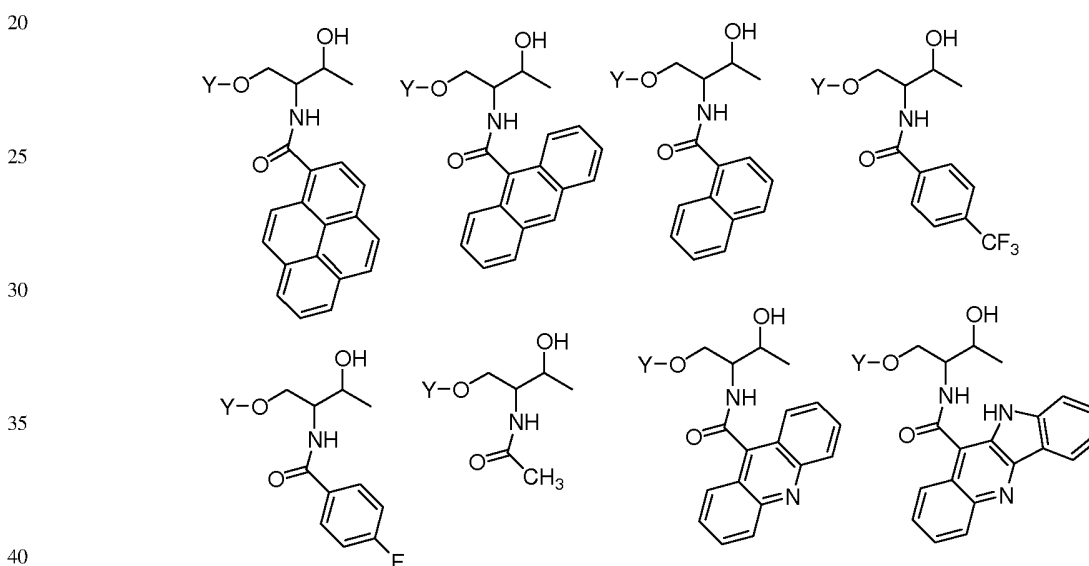
Y, R, Z², R¹, R², W, n y m son según se han definido anteriormente.

5 Tanto en los compuestos de fórmula (II) y (III) se suele preferir puentes relativamente cortos, es decir que n sea 1, 2 o 3, y más preferiblemente que n sea 1. También se prefiere que m sea 0, 1 o 2, y más preferiblemente que sea 0.

10 En una realización preferida R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H y C₁-C₃-alquilo, preferiblemente entre H y metilo.

15 En una realización preferida los compuestos de fórmula (II) y (III) derivan de la introducción, entre el enlace fosfato y el grupo R, de una molécula de treoninol, glicerol, 2-amino-1,3-propandiol, 2-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,2-propandiol, hidroxiprolinol, serinol, o cualquier otro aminoalquildiol. Preferiblemente proviene de treoninol.

En otra realización preferida el compuesto de pARNi comprende alguna de las siguientes estructuras:



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

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

55 El dúplex de pARNi (Y) puede inhibir y/o silenciar, siendo esta inhibición/silenciamiento total o parcial respecto de un control, diversos genes de interés farmacológico como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGF R1/2), factor supresor de colonias de granulocitos (GM-CSF-1) y de macrófagos (M-CSF-1), angiopoyetina (ANGPT), apolipoproteína (ApoB), neovascularización vascular (CNV), carboxiquinasa fosfoenol piruvato (PEPCK), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP2), receptor de N-metil-D aspartato (NMDA), citoquina derivadas de los keratocitos (KC), receptor opio de delta (DOR), receptor del dominio de Discoidina (DDR1), gen de la fosfo-proteína PIV (PIV-P), oxigenasa hemo (HMOX1), caveloína, transportador de dopamina, proteína fluorescente verde y/o proteína del sarcoma de Swing (EWS-FL/1). Los genes preferidos para silenciar/inhibir son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGF R1/2), factor supresor de colonias de granulocitos (GM-CSF-1) y de macrófagos (M-CSF-1). TNF- α es un mediador importante de la apoptosis tanto en inflamación como en la respuesta inmunitaria. Además, la sobreexpresión de TNF- α está confirmada en el desencadenamiento de la patogénesis de muchas enfermedades humanas. Por todo ello la inhibición

ES 2 372 237 A1

de esta citoquina es relevante desde el punto de vista biomédico. PEPCK es una proteína importante en el proceso de gluconeogénesis y se encuentra sobreexpresada en la diabetes. Es la responsable de un aumento en la producción de glucosa hepática en pacientes diabéticos y en modelos animales.

5 Secuencias específicas pARNi útiles para la presente invención son 1) contra luciferasa: UCGAAGUAUCCGC GUACGT (SEQ ID NO: 5), CGUACGCGGAUACUUCGAT (SEQ ID NO: 6); 2) contra TNF: GUGCCUAUGU CUCAGCCUCTT (SEQ ID NO: 2), GAG GCU GAG ACA UAG GCA CTT (SEQ ID NO: 1).

10 Cuando Y es una cadena sencilla de pARNi, dicha cadena sencilla puede ser, o bien una secuencia de la cadena guía o antisentido del ARN, o bien una secuencia de la cadena acompañante o sentido del ARN.

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

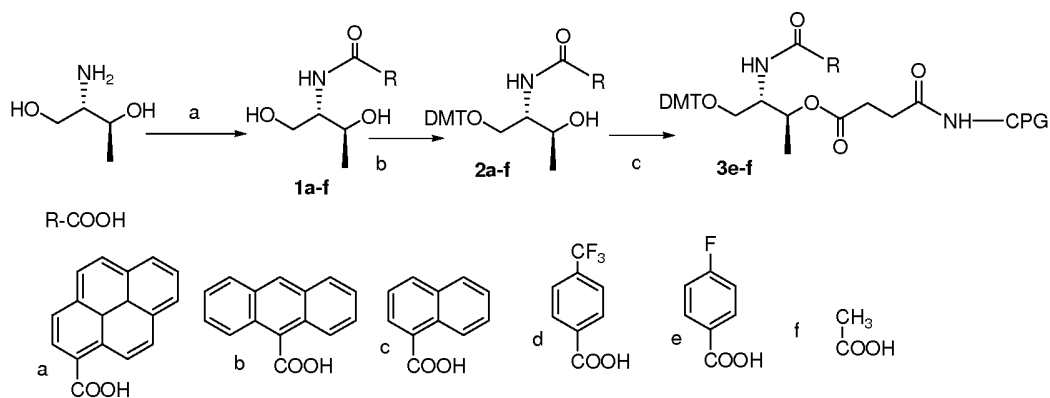
En una realización preferida, en el proceso de síntesis R se une al soporte sólido a través de una molécula puente y al menos una de las cadenas del pARNi se sintetiza utilizando el procedimiento de síntesis en fase sólida utilizando el soporte sólido funcionalizado con el grupo R.

20 En otra realización preferida del proceso el grupo R se une a un soporte sólido y al menos una de las cadenas del pARNi se sintetiza por adición sucesiva de derivados de los nucleósidos que constituyen la secuencia de la cadena incluyendo los fosforamditos, los H-fosfonatos, los fosfatos diéster y los fosfatos monoéster

25 El grupo R también se puede unir al soporte sólido y al menos una de las cadenas del pARNi se sintetiza por adición sucesiva de los fosforamditos de los nucleósidos que constituyen la secuencia de la cadena.

En el siguiente esquema se describe el proceso de síntesis en el caso particular de que la molécula puente provenga de treoninol:

Esquema 1



50 **Reactivos y Condiciones:** a. R-COOH, carbodiimida, N-hidroxisuccinimida; b. cloruro de dimetoxitritilo, piridina; c) i) anhídrido succínico, dimetilaminopiridina, temp. amb., 16-24 horas; ii) amino-CPG, dimetilaminopiridina, trifetilfosfina, 2,2-ditio-bis(5-nitropiridina). CPG son bolas de vidrio de poro controlado

55 El esquema 1 muestra las diferentes etapas necesarias para la síntesis de los soportes sólidos funcionalizados con algunos de los compuestos de la invención. Reactivos y condiciones: a) R-COOH, diisopropilcarbodiimida, N-hidroxisuccinimida; b) Cloruro de dimetoxitritilo (DMTr); c) i) anhídrido succínico, N,N-dimetilaminopiridina, diclorometano, temperatura ambiente, agitación durante 16 horas, ii) vidrio de poro controlado con grupos aminos (amino-CPG), N,N-dimetilaminopiridina, trifetilfosfina, 2,2-ditio-bis(5-nitropiridina).

60 Diversos compuestos con un grupo carboxílico obtenidos de fuentes comerciales se han hecho reaccionar con L-treoninol en presencia de diisopropilcarbodiimida rindiendo los correspondientes derivados 1a-h. La protección del alcohol primario con el grupo dimetoxitritilo (DMTr) se efectuó en condiciones habituales generando los DMTr derivados 2a-h. Por reacción de los compuestos 2a-h con anhídrido succínico y posterior acoplamiento de los hemisuccinatos correspondientes a los soportes de vidrio de poro controlado (CPG) funcionalizado con grupos amino se obtuvieron los soportes de vidrio funcionalizado con los derivados alifáticos y aromáticos 3a-h listos para su utilización en la síntesis de oligonucleótidos.

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas preferidas para la presente invención son una forma adaptada a la administración oral o parenteral, preferiblemente parenteral.

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

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

Definiciones

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

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

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

Dentro del contexto de la presente aplicación, los términos mencionados en la descripción y en las reivindicaciones tienen preferiblemente los siguientes significados:

ES 2 372 237 A1

El término “alquilo” comprende preferiblemente alquilos ramificados y no ramificados de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 6, más preferiblemente de entre 1 a 3, átomos de carbono, como por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, tert-butilo, sec-butilo, pentilo, iso-pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo y sus correspondientes isómeros.

5

El término “haloalquilo” comprende preferiblemente alquilos ramificados y no ramificados, definidos anteriormente, en los cuales uno o más hidrógenos están reemplazados de la misma manera o no por un halógeno (F, Cl, Br o I), preferiblemente por flúor. Particularmente preferible, llamamos haloalquilo a clorometilo, fluoropropilo, fluorometilo, difluorometilo, triclorometilo, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, pentafluoroetilo, bromobutilo, trifluorometilo, yodoetilo, y sus correspondientes isómeros.

10

El término “cicloalquilo” comprende preferiblemente un grupo C₃-C₁₀, cicloalquilo, más particularmente un grupo cicloalquilo saturado con la medida indicada del anillo, por ejemplo; ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclónonilo, o ciclodecilo. También comprenden cicloalquilos insaturados que contengan uno o más dobles enlaces en la cadena carbonada por ejemplo grupos cicloalqueno C₃-C₁₀ como ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo, ciclónonenilo o ciclodecenilo. En lo que respecta a los enlaces, para el resto de la molécula, el grupo cicloalquilo puede contener enlaces simples o dobles es decir puede estar saturado o insaturado y puede ser opcionalmente sustituido una o varias veces, independientemente de los otros grupos por un grupo alquilo C₁-C₆ y/o un halógeno y/o un grupo -O-Alquilo y/o un grupo -N(alquilo)₂- como por ejemplo los grupos 2-metilciclopropilo, 2,2-dimetilciclopropilo, 2,2-dimetilciclobutilo, 3-hidroxiciclopentilo, 3-hidroxiciclohexilo, 3-dimetilaminociclobutilo, 3-dimetilaminociclopentilo y 4-dimetilaminociclohexilo.

15

20

El término “heterocicloalquilo” comprende preferiblemente un grupo cicloalquilo C₃-C₁₀, definido anteriormente, donde alguno de los átomos del anillo es un heteroátomo como NH, -N(Alquilo)-, O, S o grupos como C(O), S(O), S(O)₂, o bien un grupo C_n-ciclo alquilo (donde n es un número entero seleccionado entre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) donde uno o más átomos de carbono están sustituidos por los heteroátomos o grupos anteriormente citados para dar un grupo C_n-ciclo heteroalquilo; también comprenden los grupos cicloheteroalquilo insaturados que contengan uno o más dobles enlaces en la cadena carbonada, por tanto en lo que respecta a los enlaces, para el resto de la molécula, el grupo cicloheteroalquilo puede contener enlaces simples o dobles es decir puede estar saturado o insaturado y puede ser opcionalmente sustituido una o varias veces, independientemente de los otros grupos por un grupo alquilo C₁-C₆ y/o un halógeno y/o un grupo -O-Alquilo y/o un grupo NH y/o un grupo -N(Alquilo)-.

25

30

Se define el uso del término “arilo” en cada caso como aquellos compuestos que contienen desde 6 a 20 átomos de carbono, preferiblemente 6 a 18, más preferiblemente entre 6 y 16, átomos de carbono como por ejemplo fenilo, tropilo, indenilo, naftilo, azuleno, bifenilo, fluorenilo, antraceno, pirenilo, etc. Preferiblemente es fenilo.

35

Se define el uso del término “heteroarilo” como un sistema de anillos aromáticos que comprende 3-16 átomos, preferiblemente anillos con 5 ó 6 ó 9 ó 10 átomos, que contienen como mínimo un heteroátomo que es idéntico o diferente a los heteroátomos anteriormente citados siendo por ejemplo nitrógeno, NH, -N(Alquilo)-, O, S y puede ser monocíclico, bicíclico, o tricíclico. Además en este caso puede estar benzocondensado. Preferiblemente el heteroarilo está seleccionado entre tienilo, furanilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tia-4H-pirazolilo etc., y benzoderivados como por ejemplo benzofuranilo, benzotienilo, benzoxazolilo, benzimidazolilo, benzotriazolilo, indazolilo, indolilo, isoindolilo, etc. o piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, etc., otros benzoderivados como por ejemplo quinolinilo, isoquinolinilo, etc., o azocinilo, indolizínilo, purinilo, etc., y además de otros benzoderivados como cinnolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalínilo, naftpiridinilo, pteridinilo, carbazolilo, acridínilo, fenazínilo, fenotiazínilo, fenoxazínilo, xantenilo, o oxapínilo, etc.

40

45

El término “C₁-C₆” se usa en lo referente al texto por ejemplo en el contexto de la definición “C₁-C₆ alquilo”, o “C₁-C₆ alcoxi” como el grupo de alquilos que tienen un número finito de átomos de carbono desde 1 a 6, es decir 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 átomos de carbono. El término “C₁-C₆” se interpreta como cualquier subintervalo comprendido entre C₁-C₆, C₂-C₅, C₃-C₄, C₁-C₂, C₁-C₃, C₁-C₄, C₁-C₅, C₁-C₆; más preferiblemente C₁-C₃.

50

De la misma manera el término usado como “C₄-C₁₀” se usa en lo referente al texto por ejemplo en el contexto de las definiciones “C₄-C₁₀-cicloalquilo”, se entiende como grupos alqueno o alquino con un número finito de átomos de carbono de 4 a 10, es decir 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono, preferiblemente 4, 5 ó 6 átomos de carbono. Se entiende que el término “C₄-C₁₀” implica cualquier subrango comprendido entre C₄-C₉, C₅-C₈, C₆-C₇. Preferiblemente C₄-C₆.

55

60

La presente invención también comprende los isómeros, isómeros constitucionales y estereoisómeros de los compuestos de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III).

El término isómeros se entiende como diferentes especies químicas o compuestos químicos, con el mismo número y tipo de átomos. Existen dos grandes clases de isómeros, isómeros constitucionales y estereoisómeros.

65

El término isómeros constitucionales se entiende con un significado químico donde los compuestos químicos tienen el mismo número y tipo de átomos pero están conectados por diferentes secuencias. Éstos son isómeros funcionales, isómeros estructurales, tautómeros o isómeros de valencia.

5 Los estereoisómeros, son aquellos que tienen sus átomos conectados secuencialmente de la misma manera, por tanto las dos fórmulas condensadas de los isómeros son idénticas. Los isómeros difieren en la manera en que los átomos están orientados en el espacio. Existen dos grandes subclases de estereoisómeros; conformacionales, los cuales se pueden interconvertir por rotación de enlaces sencillos, y configuracionales, los cuales no pueden interconvertirse.

10 En los isómeros configuracionales están comprendidos los enantiómeros y diastereómeros. Los enantiómeros que están relacionados con los demás ya que son como las imágenes de un espejo a partir de ahora imagen especular. Los enantiómeros deben contener algún número de centros estereogénicos, y cada estereocentro es la imagen especular que corresponde al centro de la otra molécula. Si uno o más de estos centros difieren en la configuración, las dos moléculas no son imágenes especulares. Los estereoisómeros que no son enantiómeros, son llamados diastereómeros
15 o diastereoisómeros.

Para poder limitar los diferentes tipos de isómeros se hace referencia a las normas establecidas por la IUPAC. "IUPAC Rules Section E (Puré Appl Chem 45, 11-30, 1976)".

20 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.
25

Ejemplos

30 Los soportes sólidos de vidrio se han utilizado en la preparación de cadenas de ARN utilizando un sintetizador automático. Las secuencias diana seleccionadas han sido el gen de la luciferasa, una proteína luminiscente muy utilizada para el análisis del silenciamiento génico por tener un ensayo bioquímico de su actividad enzimática muy robusto. También se ha utilizado como diana el gen del factor de necrosis tumoral (TNF- α). Esta proteína es un mediador en la apoptosis, en procesos de inflamación y en los procesos de inmunidad. Además se ha demostrado que la sobreexpresión de TNF- α está implicada en muchas enfermedades humanas tales como enfermedad de Crohn, artrosis reumatoide y otras enfermedades de tipo autoinmune. También la sobreexpresión de TNF- α empeora el pronóstico del cáncer ya que facilita la extensión de las metástasis. Por todo ello la inhibición de TNF- α tiene una especial relevancia biomédica.
35

40 Se han preparado ambas cadenas, acompañante y guía, con la modificación en el extremo 3'. De esta manera se puede comparar los resultados obtenidos por la modificación y las diferencias observadas en la cadena guía serán debido sobretudo a la interacción con RISC ya que sólo la cadena guía se une al complejo RISC. Los monómeros de ARN utilizados estaban protegidos en su posición 2' por el grupo t-butildimetilsilil (TBDMS). Los rendimientos de acoplamiento de los monómeros fueron de alrededor del 97-98%. Para la eliminación de los protectores y liberación del ARN del soporte se ha utilizado un protocolo que consta de dos etapas: I) amoniaco concentrado-etanol 3:1 a
45 55°C, y II) fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en tetrahidrofurano (THF) a temperatura ambiente. Las secuencias de ARN se purificaron por HPLC y los productos purificados se caracterizaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF).

50 Los pARNi se prepararon mezclando cadenas equimolares de las cadenas guía y acompañante siguiendo un protocolo de hibridación habitual. La estabilidad térmica de los dúplex de pARNi modificados se comparó con la estabilidad térmica del dúplex natural (WT), sin modificar. Los pARNi modificados presentaron una temperatura de fusión (T) igual o ligeramente superior a la temperatura de fusión (T_m) del dúplex sin modificar sobretudo en algunos compuestos aromáticos y cuando la modificación estaba en el extremo 3' de la cadena guía.

55 Posteriormente se estudio la estabilidad de los pARNi modificados a las ARNasas por incubación de los dúplex de pARNi en suero fetal bovino. En todos los casos la estabilidad de los pARNi modificados fue mejor que el pARNi sin modificar (WT). A las 9 horas el pARNi sin modificaciones fue digerido por las RNasas del suero mientras que los pARNi modificados estaban aún presentes en la muestra (figura 1).

60 La actividad de los pARNi modificados se evaluó utilizando el ensayo de las dos luciferasas a diferentes concentraciones y diferentes tiempos. La actividad de los pARNi modificados se comparó con la actividad del pARNi sin modificar. Sólo a dosis muy bajas de pARNi se observaron diferencias significativas. En el caso de líneas celulares SH-SY5Y y HeLa se utilizaron concentraciones 320 pM y 32 pM respectivamente para observar diferencias significativas. A estas concentraciones se observó una correlación entre el tamaño de la modificación y la actividad (figura 2).
65

Inhibición de TNF- α

Las cadenas guía y acompañante diseñadas para inhibir el gen del TNF- α se hibridaron y los dúplex resultantes se usaron para el estudio de la inhibición del gen de TNF- α . En primer lugar se estudiaron las propiedades inhibitorias de los pARNi en células HeLa. Estas células no expresan el gen del TNF- α de ratón por lo que se transfectaron con el correspondiente plásmido. Se utilizó el siguiente protocolo: Células HeLa se transfectaron con 250 ng del plásmido con el gen que codifica el TNF- α de ratón (pCam TNF- α) utilizando lipofectina y 1 h más tarde se transfectaron con el dúplex de pARNi (50 nM) utilizando oligofectamina. Al cabo de 48 h la cantidad de TNF- α producido por las células se analizó utilizando un ensayo enzimático (ELISA). En la figura 3 se muestra la actividad inhibitoria de los pARNi modificados en el extremo 3' de la cadena acompañante. Tanto el pARNi modificado con acridina como el modificado con quindolina tienen una actividad inhibitoria semejante o mayor a la actividad inhibitoria del pARNi sin modificar.

De la misma manera se han preparado pARNi que contienen moléculas de acridina o quindolina en el extremo 3' de la cadena guía. En la figura 4 se muestra la actividad inhibitoria de los pARNi modificados en el extremo 3' de la cadena guía. Tal como se ha descrito con los derivados anteriores con grupos pireno y antraceno los pARNi modificados con acridina o quindolina tienen una actividad inhibitoria ligeramente menor, aunque muestran una excelente estabilidad.

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

30 *Procedimientos Generales de síntesis*

Procedimiento A

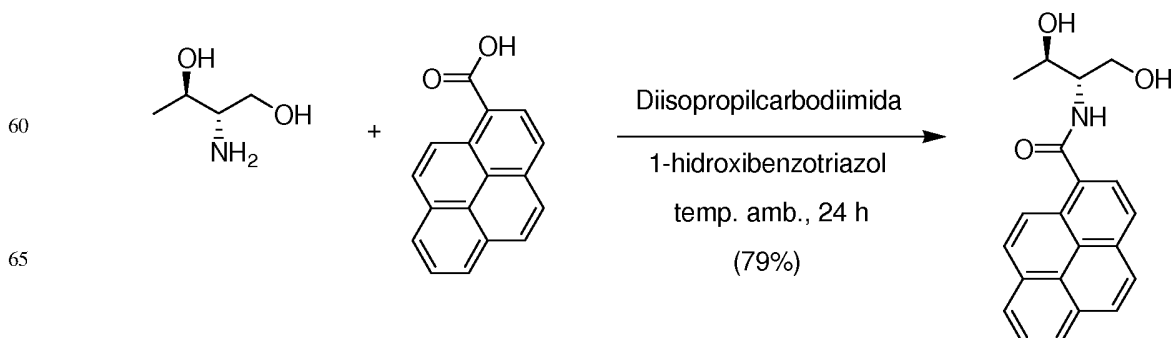
35 *Formación de la amida*

Los derivados con un grupo ácido carboxílico (1,2 equiv) disueltos en *N,N*-dimetilformamida (DMF) generando una solución 0.5 M se mezclaron con *N*-hidroxibenzotriazol (1,1 equiv) y diisopropilcarbodiimida (1,1 equiv) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla durante 5 minutos se añadió *L*-treoninol (1 equiv). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y a continuación se detuvo la reacción por adición de metanol. La mezcla resultante se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice de tipo flash.

Procedimiento B

45 *Introducción del grupo protector DMTr*

Una solución 0,2 M en piridina del diol resultante de la reacción anterior (1 equiv) se enfrió a 0°C en un baño de hielo. A la solución resultante se añadieron *N,N,N*-diisopropiletilamina (1,5 equiv), cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1,2 equiv) y *N,N*-dimetilaminopiridina (0,1 equiv). Después de 15 min la mezcla resultante se sacó del baño de hielo y se dejó recuperar la temperatura ambiente dejándose agitando durante 24 h. Finalmente se detuvo la reacción por adición de metanol. La mezcla resultante se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice de tipo flash.

55 *N*-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiбутан-2-il]pireno-1-carboxamida (1a)

ES 2 372 237 A1

El compuesto 1a se obtuvo siguiendo el procedimiento A. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 4/CH₂Cl₂ 4/MeOH 0,5) se obtuvieron 302 mg (0,906 mmol) de un sólido blanco (79%).

¹H NMR (400 MHz, D₃OD): 8,53 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 8,25 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 8,21-8,02 (m, 5H), 4,28 (dt, *J* = 6,2 y 3,6 Hz, 1H), 4,18 (dq, *J* = 6,4 y 3,6 Hz, 1H), 3,87 (System ABX, *J*_{AB} = 11,1 Hz, *J*_{AX} = 5,8 Hz, y *J*_{BX} = 6,6 Hz, 2H), 1,38 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, D₃OD): 173,4, 133,9, 132,8, 132,6, 132,1, 129,7, 129,6, 129,5, 128,3, 127,6, 126,9, 126,8, 126,1, 125,8, 125,61, 125,59, 125,51, 67,5, 63,0, 58,5, 20,8. HRMS *m/z*: Calculado para C₂₁H₂₀NO₃ (M + H⁺) 334,1437, encontrado 334,1449.

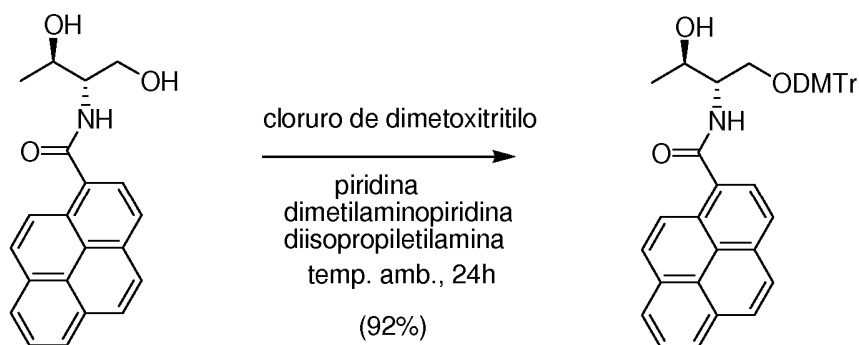
10

N-[(2*S*,3*R*)-1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxiбутан-2-il]-pireno-1-carboxamida (2a)

15

20

25



30

El compuesto 2a se obtuvo siguiendo el procedimiento B. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 2/EtOAc 1) se obtuvieron 133 mg (0,209 mMol) en forma de un sólido blanco y se recuperaron 24 mg del compuesto inicial. (Rendimiento 70%, o 92% si se tiene en cuenta el compuesto inicial recuperado).

35

¹H NMR (400 Mz, CDCl₃): 8,62 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 8,21 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 8,12 (s, 3H), 8,09 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,04 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,45 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,7 Hz, 4H), 7,28 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,20 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,89 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 6,81 (dd, *J* = 8,9 y 2,8 Hz, 4H), 4,38-4,32 (m, 1H), 4,28-4,22 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,63 (sistema ABX), *J*_{AB} = 9,6 Hz, *J*_{AX} = 3,7 Hz, *J*_{BX} = 3,6 Hz, 2H), 1,35 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 170,29, 158,6, 158,5, 144,3, 135,4, 135,2, 132,6, 131,1, 130,7, 130,6, 129,9 (4C), 128,7, 128,6, 128,5, 128,0 (2C), 127,9 (2C), 127,0, 126,9, 126,3, 125,8, 125,7, 124,7, 124,5, 124,5, 124,3, 124,2, 113,3 (4C), 86,9, 69,0, 65,6, 55,1 (2C), 54,3, 20,3. HRMS *m/z*: teórico para C₄₂H₃₇NO₃Na (M + Na⁺) 658,2563, experimental 658,2563.

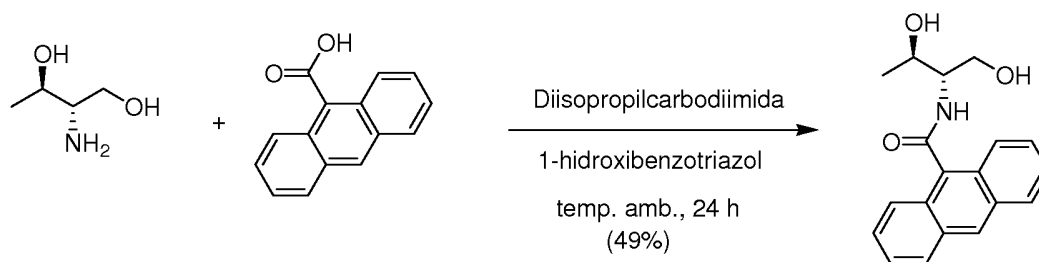
40

N-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiбутан-2-il]antraceno-9-carboxamida (1b)

45

50

55



El compuesto 1b se obtuvo siguiendo el procedimiento A. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 6/CH₂Cl₂ 3/MeOH 0,5) se obtuvieron 273 mg (1,052 mMol) de un sólido amarillento (49%).

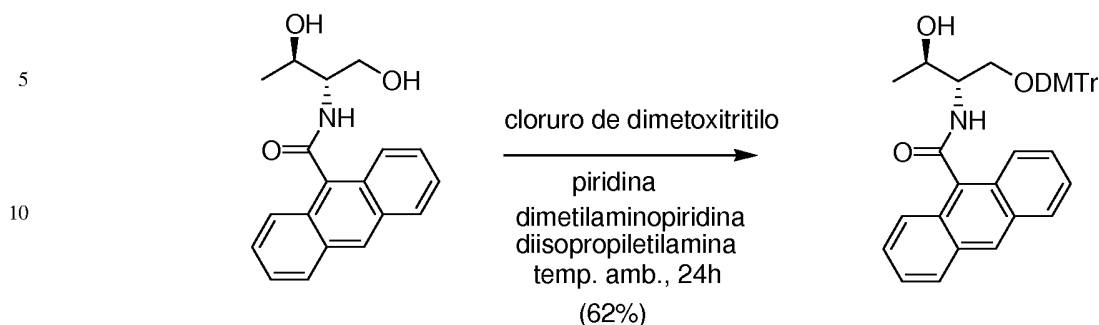
60

¹H NMR (400 MHz, D₃OD): 8,56 (s, 1H), 8,27-8,15 (m, 2H), 8,06 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,57-7,47 (m, 4H), 4,40 (ddd, *J* = 6,7, 5,6 y 3,9 Hz, 1H), 4,15 (dq, *J* = 6,4 y 3,8 Hz, 1H), 3,87 (ABX System: *J*_{AB} = 11,0 Hz, *J*_{AX} = 5,6 Hz, *J*_{BX} = 6,9 Hz, 2H), 3,35 (s, 1H), 1,39 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, D₃OD): 172,7, 133,5, 132,7, 129,6 (2C), 129,3, 129,2 (2C), 127,7 (2C), 126,6 (4C), 126,4, 67,4, 63,0, 58,8, 20,9. HRMS *m/z*: teórico para C₁₉H₁₉NNaO₃ (M + Na)⁺ 332,1257, experimental 332,1258.

65

ES 2 372 237 A1

N-[*(2S,3R)*-1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxiбутан-2-il]-антрацено-9-карбоксамид (2b)



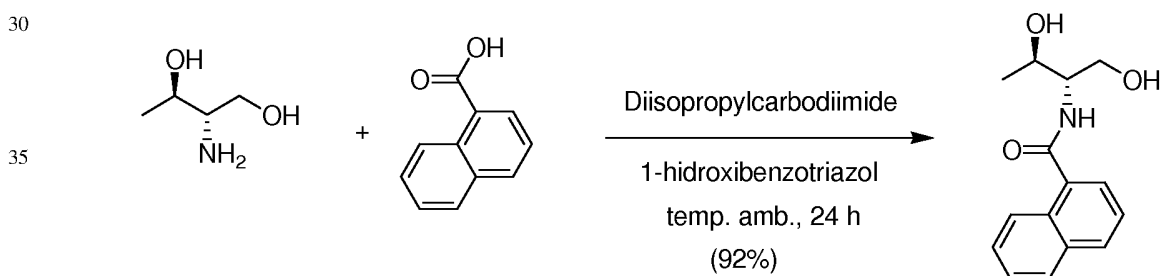
El compuesto 2b se obtuvo siguiendo el procedimiento B. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 3/EtOAc 1) se obtuvieron 130 mg (0,213 mMol) en forma de un sólido blanco (62%).

¹H NMR (400 Mz, CDCl₃): 8,48 (s, 1H), 8,11 (bs, 1H), 8,01 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H), 7,47 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,41 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,8 Hz, 4H), 7,26 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 6,80 (d, *J* = 8,8 Hz, 4H), 6,73 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 4,49 (td, *J* = 7,3 y 3,9 Hz, 1H), 4,16 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,62 (sistema ABX, *J*_{AB} = 9,6 Hz, *J*_{AX} = 3,6 Hz, *J*_{BX} = 4,4 Hz, 2H), 3,07 (s, 1H), 1,35 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 169,9, 158,6 (2C), 144,2 (2C), 135,4, 135,1, 131,7, 131,1 (2C), 130,0 (3C), 129,9 (3C), 128,5 (2C), 128,3, 128,1, 128,0 (2C), 127,9 (2C), 127,0, 126,7 (2C), 125,4, 125,2, 113,3 (2C), 113,2 (2C), 86,9, 68,8, 65,5, 55,2 (2C), 54,6, 20,6. HRMS *m/z*: teórico para C₄₀H₃₇NNaO₅ (M + Na)⁺ 634,2564, experimental 634,2570.

20

25

N-[*(2S,3R)*-1,3-dihidroxiбутан-2-il]-1-naftamida (1c)



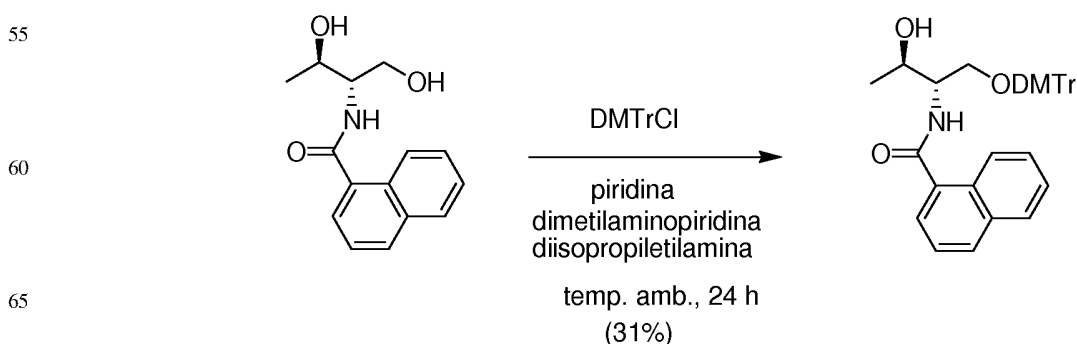
El compuesto 1c se obtuvo siguiendo el procedimiento A. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 6/CH₂Cl₂ 3/MeOH 0,5) se obtuvieron 273 mg (1,052 mMol) de un sólido amarillento (92%).

¹H-NMR (400 MHz, D₃OD): 8,26 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,90 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,57-7,47 (m, 3H), 4,21-4,16 (m, 1H), 4,15-4,09 (m, 1H), 3,79 (Sistema ABX; *J*_{AB} = 11,1 Hz, *J*_{AX} = 5,8 Hz, *J*_{BX} = 6,5 Hz, 2H), 1,30 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₃OD): 173,1, 136,1, 135,3, 131,7, 131,6, 129,6, 128,2, 127,6, 126,6, 126,5, 126,1, 67,6, 63,1, 58,4, 20,9. HRMS *m/z*: teórico para C₁₅H₁₈NO₃ (M + H⁺) 260,1281, experimental 260,1291.

45

50

N-[*(2S,3R)*-1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxiбутан-2-il]-1-naftamida (2c)



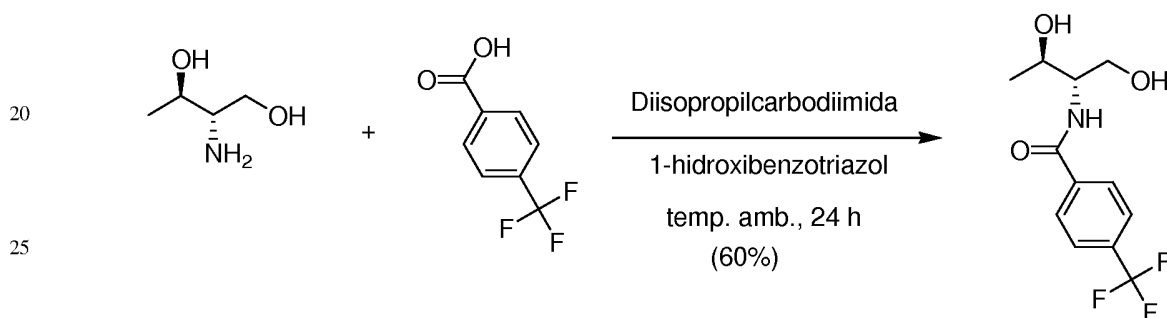
ES 2 372 237 A1

El compuesto 2c se obtuvo siguiendo el procedimiento B. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 3/EtOAc 1) se obtuvieron 146 mg (0,259 mMol) en forma de un sólido blanco (31%).

¹H-NMR (400 Mz, CDCl₃): 8,37-8,32 (m, 1H), 7,95 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,92-7,87 (m, 1H), 7,66 (dd, *J* = 7,0 y 1,1 Hz, 1H), 7,56-7,52 (m, 2H), 7,48 (dd, *J* = 8,2 y 7,1 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,9 Hz, 4H), 7,26 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,20 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,80 (dd, *J* = 8,8 y 3,7 Hz, 4H), 6,71 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 4,28-4,24 (m, 1H), 4,23-4,18 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 3,56 (sistema ABX, *J*_{AB} = 9,7 Hz, *J*_{AX} = 3,8 Hz, *J*_{BX} = 3,6 Hz, 2H), 3,17 (s, 1H), 1,29 (d, *J* = 6,34 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 169,8, 158,7, 158,6, 144,2, 135,4, 135,2, 134,4, 133,7, 130,7, 130,1, 129,9 (4C), 128,3, 128,0 (2C), 127,9 (2C), 127,2, 127,0, 126,4, 125,5, 124,9, 124,7, 113,3 (4C), 86,9, 69,1, 65,7, 55,2 (2C), 53,9, 20,2. HRMS *m/z*: teórico para C₃₆H₃₅NNaO₅ (M + Na)⁺ 584,2407, experimental 584,2402.

N-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxitbutan-2-il]-4-(trifluorometil)benzamida (1*d*)

15

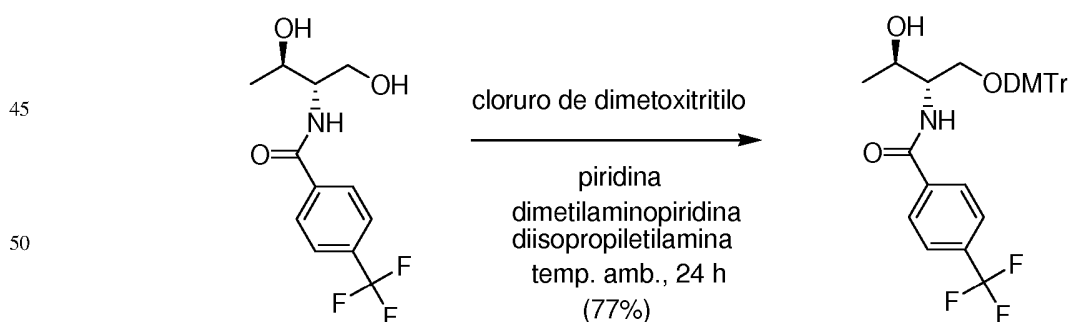


El compuesto 1d se obtuvo siguiendo el procedimiento A. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 4/CH₂Cl₂ 4/MeOH 0,5) se obtuvieron 157 mg (0,566 mMol) de un sólido blanco (60%).

¹H-NMR (400 MHz, D₃OD): 8,03 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,78 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 4,14-4,04 (m, 2H), 3,75 (sistema ABX: *J*_{AB} = 11,2 Hz, *J*_{AX} = 5,6 Hz, *J*_{BX} = 6,2 Hz, 2H), 1,22 (d, *J* = 6,2 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₃OD): 169,4, 139,7, 134,1 (q, *J*_{F-C} = 32,4 Hz, 1C), 129,3 (2C), 126,5 (q, *J*_{F-C} = 3,8 Hz, 2C), 124,0, 67,3, 62,8, 58,4, 20,6. ¹⁹F-NMR (376 MHz, D₃OD): -64,86. HRMS *m/z*: teórico para C₁₂H₁₅NO₃F₃ (M + H⁺) 278,0998, experimental 278,0999.

N-[(2*S*,3*R*)-1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxitbutan-2-il]-4-(trifluorometil)benzamida (2*d*)

40



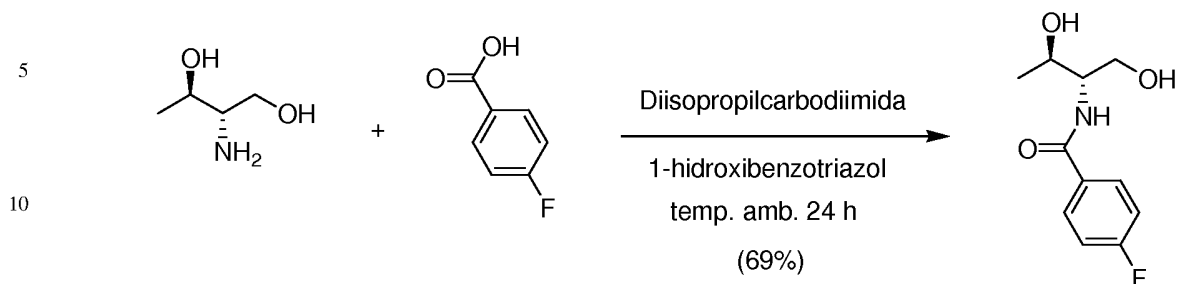
El compuesto 2d se obtuvo siguiendo el procedimiento B. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 3/EtOAc 1) se obtuvieron 580 mg (0,828 mMol) en forma de un sólido blanco (77%).

¹H-NMR (400 Mz, CDCl₃): 7,89 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,73 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,30-7,18 (m, 4H), 6,79 (dd, *J* = 8,8 y 6,8 Hz, 2H), 4,28-4,20 (m, 1H), 4,15-4,10 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 3,49 (System ABX: *J*_{AB} = 9,8 Hz, *J*_{AX} = 4,2 Hz, *J*_{BX} = 3,4 Hz, 2H), 3,07 (s, 1H), 1,21 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 166,3, 158,6 (2C), 144,2, 137,6, 135,3, 135,2, 133,3 (q, *J*_{F-C} = 32,8 Hz, 1C), 129,9 (2C), 129,8 (2C), 128,0 (2C), 127,8 (2C), 127,4 (2C), 127,0, 125,7 (q, *J*_{F-C} = 3,8 Hz, 2C), 124,9, 113,3 (2C), 113,2 (2C), 86,9, 68,5, 65,2, 55,1 (2C), 54,0, 20,1. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): -63,36. HRMS *m/z*: calculado para C₃₃H₃₂F₃NNaO₅ (M + Na)⁺ 602,2125, encontrado 602,2126.

65

ES 2 372 237 A1

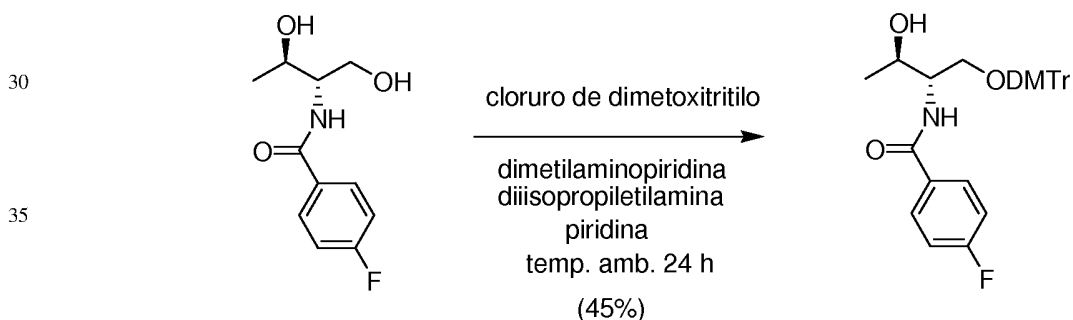
N-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiбутан-2-il]-4-fluorobenzamida (*1e*)



15 El compuesto *1e* se obtuvo siguiendo el procedimiento A. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 5/CH₂Cl₂ 4/MeOH 0,5) se obtuvieron 180 mg (0,792 mmol) de un sólido blanco (69%).

20 ¹H-NMR (400 MHz, D₃OD): 7,92 (dd, *J* = 8,8 y 5,4 Hz, 2H), 7,20 (t, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,13-4,02 (m, 2H), 3,73 (sistema ABX, *J*_{AB} = 11,2 Hz, *J*_{AX} = 5,9 Hz, *J*_{BX} = 6,3 Hz, 2H), 1,21 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₃OD): 169,5, 166,2 (d, *J*_{F-C} = 250,5 Hz, 1C), 132,1, 131,0 (d, *J*_{F-C} = 8,9 Hz, 2C), 116,4 (d, *J*_{F-C} = 22,1 Hz, 2C), 67,3, 62,8, 58,2, 20,6. ¹⁹F-NMR (376 MHz, D₃OD): -111,2. HRMS *m/z*: teórico para C₁₁H₁₅NO₃F (M + H⁺) 228,1030, experimental 228,1035.

25 *N*-[(2*S*,3*R*)-1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxiбутан-2-il]-4-fluorobenzamida (*2e*)

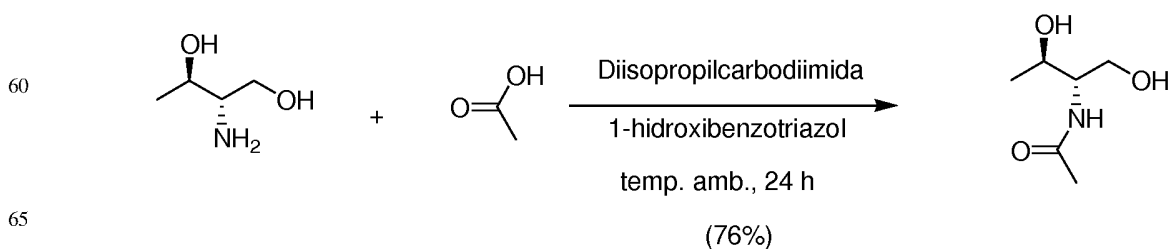


El compuesto *2e* se obtuvo siguiendo el procedimiento B. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 3/EtOAc 1) se obtuvieron 313 mg (0,591 mmol) en forma de sólido blanco (45%).

45 ¹H-NMR (400 Mz, CDCl₃): 7,81 (dd, *J* = 8,8 y 5,3 Hz, 2H), 7,37 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,30-7,18 (m, 7H), 7,14 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,79 (dd, *J* = 8,9 y 6,8 Hz, 4H), 4,21 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H), 4,15-4,05 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,56 (dd, *J* = 9,7 y 4,2 Hz, 1H), 3,38 (dd, *J* = 9,7 y 3,4 Hz, 1H), 3,13 (s, 1H), 1,20 (d, *J* = 6,37 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 166,6, 164 (d, *J*_{F-C} = 252 Hz, 1C), 158,6 (2C), 144,2, 135,4, 135,2, 130,5 (d, *J*_{F-C} = 3,2 Hz, 1C), 129,9 (2C), 129,8 (2C), 129,3 (d, *J*_{F-C} = 8,9 Hz, 2C), 128,0 (2C), 127,8 (2C), 127,0, 115,6 (d, *J*_{F-C} = 21,8 Hz, 2C), 113,3 (4C), 86,9, 68,9, 65,5, 55,2 (2C), 53,9, 20,0.

50 ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): -108,44. HRMS *m/z*: teórico para C₃₂H₃₂NO₅FNa (M + Na⁺) 552,2156, experimental 552,2143.

55 *N*-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiбутан-2-il]-acetamida (*1f*)



ES 2 372 237 A1

El compuesto 1f se obtuvo siguiendo el procedimiento A. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 4/CH₂Cl₂ 4/MeOH 0,5) se obtuvieron 159 mg (1,08 mmol) en forma de aceite incoloro (76%).

¹H NMR (400 MHz, D₃OD): 4,04-3,94 (m, 1H), 3,84-3,76 (m, 1H), 3,61 (sistema ABX, $J_{AB} = 11,0$ Hz, $J_{AX} = 5,9$ Hz, $J_{BX} = 6,3$ Hz, 2H), 2,00 (s, 3H), 1,14 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, D₃OD): 173,8, 67,2, 62,8, 57,6, 22,7, 20,4.

HRMS m/z: teórico para C₆H₁₄NO₃ (M + H⁺) 147,0895, experimental 147,1325.

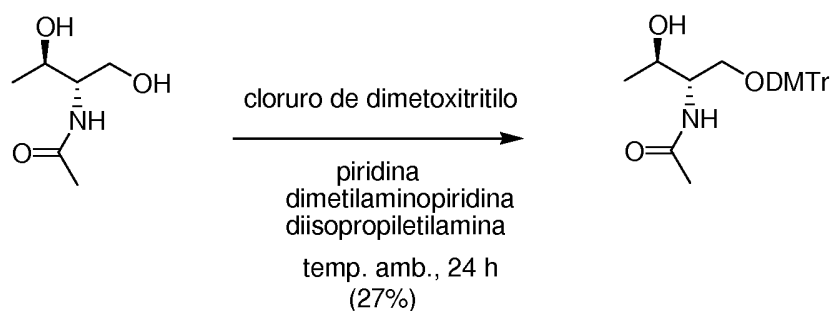
10

N-[(2*S*,3*R*)-1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxibutan-2-il]-acetamida (2f)

15

20

25



30

El compuesto 2f se obtuvo siguiendo el procedimiento B. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (ciclohexano 1/EtOAc 3) se obtuvieron 137 mg (0,29 mmol) en forma de sólido amarillento (27%).

35

¹H-NMR (400 Mz, CDCl₃): 7,38 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 7,27 (d, $J = 8,8$ Hz, 6H), 7,22 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,83 (d, $J = 8,74$ Hz, 4H), 6,05 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 4,15-4,06 (m, 1H), 3,94-3,88 (m, 1H), 3,79 (s, 6H), 3,35 (sistema ABX, $J_{AB} = 9,7$ Hz, $J_{AX} = 4,4$ Hz, $J_{BX} = 3,5$ Hz, 2H), 3,02 (s, 1H), 2,02 (s, 3H), 1,13 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 170,4, 158,7 (2C), 144,3, 135,5, 135,3, 129,9 (2C), 129,8 (2C), 128,0 (2C), 127,9 (2C), 127,0, 113,3 (4C), 86,9, 68,7, 65,4, 55,2 (2C), 53,4, 23,3, 19,9. HRMS m/z: teórico para C₂₇H₃₁NNaO₅ (M + Na)⁺ 472,2100, experimental: 472,2096.

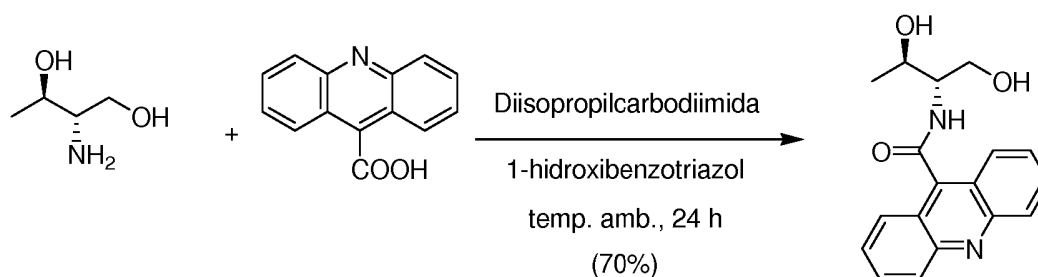
40

N-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxibutan-2-il]acridina-9-carboxamida (1g)

45

50

55



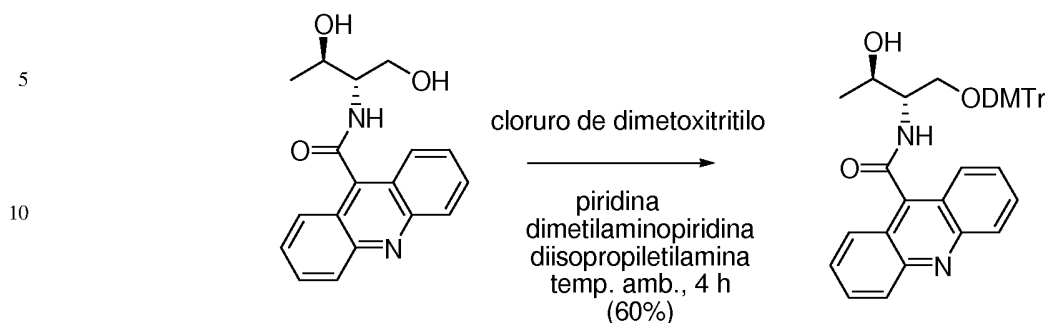
60

El compuesto 1g se obtuvo siguiendo el procedimiento A, a partir de 0,95 mmol del ácido. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (0-2% gradiente de metanol en CH₂Cl₂) se obtuvieron 0,69 g (0,66 mmol) de un sólido amarillento (70%). UV (λ max): 249, 343, 359 y 385 nm. Espectro de fluorescencia: exc: 385 nm, em: 433 nm. ¹H-NMR [CDCl₃, δ , ppm]: 8,82 (m, 1H, NH), 8,35 (m, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,8 (m, 2H), 7,6 (m, 2H), 5,3 (s, 2H, OH), 4,21 (m, 1H, CH), 3,85 (m, 1H, CH), 3,49 (m, 2H, CH₂), 1,26 (d, 3H, CH₃). MS (Cl/NH₃) teórico para C₁₈H₂₀N₂O₃ 312,1 experimental 311,1.

65

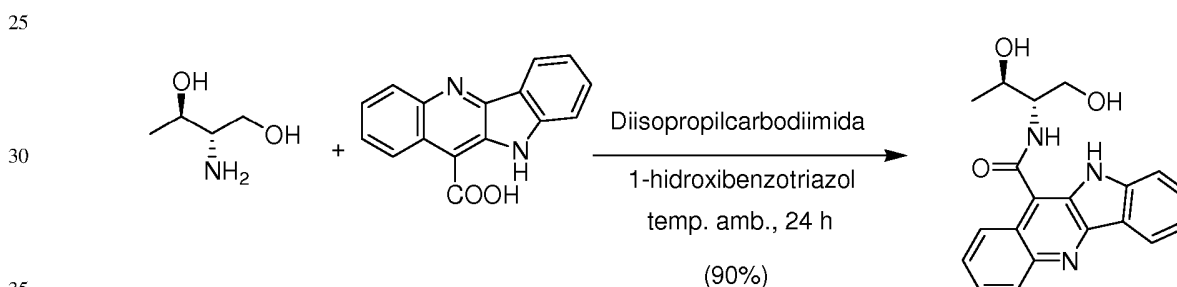
ES 2 372 237 A1

N-[(2*S*,3*R*)-1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxybutan-2-yl]acridine-9-carboxamida (2g)



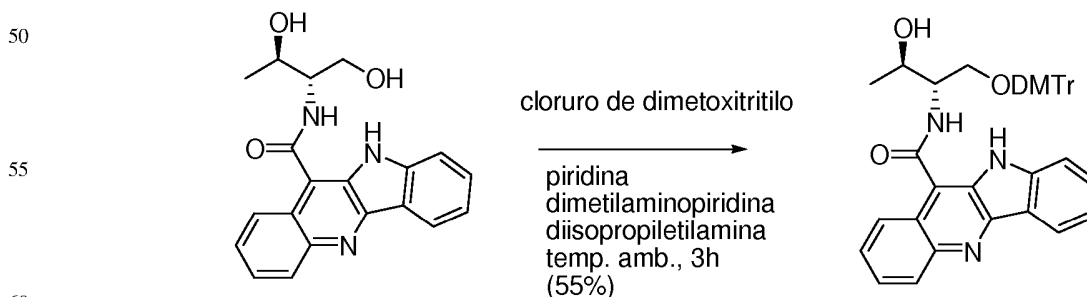
El compuesto 2g se obtuvo siguiendo el procedimiento B. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (0-2% metanol en CH₂Cl₂ con un 1% de trietilamina) se obtuvieron 490 mg (0,80 mmol) en forma de sólido amarillento (60%). ¹H-NMR [CDCl₃, δ, ppm]: 8,3-8,2 (m, 2H), 8,1 (m, 2H), 7,8 (m, 2H), 7,5-7,1 (m, 11H), 6,8-6,7 (m, 4H), 4,5 (m, 1H, OH), 4,2 (m, 1H), 3,7 (m, 7H), 3,5 (m, 2H, CH₂), 1,1 (d, 3H, CH₃).

N-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxybutan-2-il]-10*H*-indolo[3,2-*d*]quinolina-11-carboxamida, (1h)



El compuesto 1h se obtuvo siguiendo el procedimiento A, a partir de 0,95 mmol del ácido. El producto fue cristalizado de cloroformo obteniendo 300 mg (0,85 mmol) de un sólido amarillento (90%). UV (λ max): 276, 306, 347 y 400 nm. Espectro de fluorescencia exc: 347 nm, em: 495 nm. ¹H-NMR [DMSO-d₆, δ, ppm]: 8,41 (ancho d, 1H, NH), 8,2 (m, 2H), 7,9 (m, 1H), 7,3-7,6 (m, 5H), 5,44 (ancho, 2H, OH), 4,14 (m, 1H, CH), 3,99 (m, 1H, CH), 3,4-3,6 (m, 2H, CH₂), 1,21 (d, J=6,6 Hz, 3H, CH₃). MS (Cl/NH₃) teórico para C₂₀H₁₉N₃O₃ 349,1 experimental 350,1.

N-[(2*S*,3*R*)-1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxybutan-2-il]-10*H*-indolo[3,2-*d*]quinolina-11-carboxamida (2h)



El compuesto 2h se obtuvo siguiendo el procedimiento B. Al finalizar la purificación por cromatografía de tipo flash (0-2% metanol en CH₂Cl₂ con un 1% trietilamina) se obtuvieron 110 mg (0,17 mmol) en forma de sólido amarillento (55%). ¹H-NMR [CDCl₃, δ-ppm]: 9,3 (s, 1H), 8,5 (d, 1H), 8,3 (d, 1H), 8,4 (d, 1H), 7,7-7,2 (14 H, aromáticos), 6,8 (m, 4H), 4,4 (d, 1H), 4,2 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,7 (s, 6H), 3,3 (s, 1H), 1,1 (d, 3H).

ES 2 372 237 A1

Procedimiento C

Funcionalización del CPG (Dos Pasos) (3)

5 Paso I

Se hicieron reaccionar los alcoholes 2a-h (1 equiv) disueltos en diclorometano (0,2 M) con anhídrido succínico (1,3 equiv) en presencia de diisopropilietilamina (1,4 equiv) y *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,1 equiv). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (5 mL) y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa al 1% de Na_2HPO_4 . La capa orgánica se seco con sulfato sódico y el disolvente se evaporó a sequedad. Los productos obtenidos (hemisuccinatos) se utilizaron directamente sin más purificación.

15 Paso II

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

La mezcla se agitó vigorosamente durante unos segundos y se añadió a una jeringa que contenía el soporte polimérico de vidrio de poro controlado (LCAA-CPG) (500 mg, 0,05 mmol de grupos amino) y se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de metanol (500 μL). El soporte polimérico se lavó con metanol (3x10 mL), acetonitrilo (3x10 mL) y dietil éter (3x10 mL). El soporte se secó al vacío y se bloquearon los grupos aminos residuales por acetilación con una mezcla de anhídrido acético/piridina/tetrahidrofurano (500 μL) y 1-metilimidazol en tetrahidrofurano (500 μL). Al cabo de 30 minutos, el soporte polimérico se lavó con metanol (3x10 mL), acetonitrilo (3x10 mL) y dietil éter (3x10 mL). El soporte resultante se secó primero al aire y después aplicando vacío. El soporte polimérico se almacenó a 4°C. El grado de funcionalización de los soportes se determinó por eliminación de los grupos DMTr en una pequeña alícuota y leyendo la absorbancia del catión DMTr a 500 nm desprendidos de los soportes durante la eliminación. El grado de funcionalización de los soportes preparados estuvo entre 15-35 nmol/g.

35 Síntesis de oligonucleótidos

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

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

60

65

ES 2 372 237 A1

TABLA 1

Análisis por espectrometría de masas de los oligonucleótidos sintetizados

5	Nº	Cadena	Secuencia (5'-3')	PM Teórico	PM Exp.
10	10	Luc WT guía	UCGAAGUAUCCGCGUACGT (SEQ ID NO: 5)	6646,2	6646,2
15	11	Luc Py guía	SEQ ID NO: 5-Py	6736,1	6731,1
20	12	Luc Antra guía	SEQ ID NO: 5-Antra	6712,1	6707,8
25	13	Luc Naph guía	SEQ ID NO: 5-Naph	6662,1	6657,4
30	14	Luc CF3 guía	SEQ ID NO: 5-CF3	6680,1	6673,3
35	15	Luc F guía	SEQ ID NO: 5-F	6630,1	6625,6
40	16	Luc Me guía	SEQ ID NO: 5-Me	6550,1	6550,9
45	17	Luc WT aco	CGUACGCGGAAUACUUCGAT (SEQ ID NO: 6)	6669,2	6669,4
50	18	Luc Py aco	SEQ ID NO: 6-Py	6759,1	6753,5
55	19	Luc Antra aco	SEQ ID NO: 6-Antra	6735,1	6735,3
60	20	Luc Naph aco	SEQ ID NO: 6-Naph	6685,1	6686,4
65	21	Luc CF3 aco	SEQ ID NO: 6-CF3	6703,1	6707,4
	22	Luc F aco	SEQ ID NO: 6-F	6653,1	6656,6
60	23	Luc Me aco	SEQ ID NO: 6-Me	6573,1	6576,9
65	24	TNF Acri	GUGCCUAUGUCUCAGCCUCTT	6933,1	6940,3

ES 2 372 237 A1

		aco	(SEQ ID NO: 2)-Acri		
5	25	TNF Quin	SEQ ID NO: 2-Quin	6972,1	6977,1
		aco			
	26	TNF Acri	SEQ ID NO: 1-Acri	7145,2	7146,3
10		guía			
	27	TNF Quin	SEQ ID NO: 1-Quin	7184,2	7224,2
		guía			(M+K+)
15	28	TNF s.m.	SEQ ID NO: 1	6771,2	6772,5
		guía			
20	29	TNF s.m.	SEQ ID NO: 2	6559,0	6558,6
		aco			

25 Luc: luciferasa; TNF: factor de necrosis tumoral; WT: sin modificación; Py:
 30 pireno; Antra: antraceno; Naph: naftaleno; CF₃: trifluorofenilo; F:
 35 fluorofenilo; Me: acetilo; Acri: acridina; Quin: quindolina; Guía: Cadena
 40 guía; aco: Cadena acompañante;

35 *Experimentos de desnaturalización de las hebras de pARNi*

40 La hibridación de los dúplexes de pARNi se llevó a cabo por incubación a 90°C de una solución 20 μM de las cadenas guía y acompañante en tampón de hibridación (100 mM acetato de potasio, 2 mM acetato magnésico 30 mM HEPES-KOH a pH 7,4) durante 1 min y enfriamiento lento hasta alcanzar la temperatura ambiente.

45 Los experimentos de desnaturalización se siguieron en un espectrofotómetro de luz UV. Los pARNis (0,5 μM) se disolvieron en solución tampón (50 mM acetato de potasio, 1 mM acetato magnésico, 15 mM HEPES-KOH at pH 7,4). Los experimentos se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico con un tapón de teflón en un espectrofotómetro de luz UV Jasco V-650 equipado con programador de temperaturas. El experimento de desnaturalización se realizó a una velocidad de 1°C/min desde 20°C hasta 90°C, registrando la absorción a 260 nm. En todos los casos se observó una curva que se ajustó a un proceso de dos estados. Los datos se analizaron por el programa de desnaturalización MeltWin v. 3.0. Las temperaturas de fusión (T_m) se determinaron por ordenador por ajuste de la primera derivada de la absorbancia con respecto al inverso de la temperatura. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

55 (Tabla pasa a página siguiente)

60

65

ES 2 372 237 A1

TABLA 2

Temperaturas de fusión (T_m, °C) de los derivados de ARN diseñados para la inhibición de luciferasa, y que contienen moléculas alifáticas y aromáticas en su extremo 3' unidas por una molécula puente de tipo L-treoninol

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

pARNi nº	Tipo de dúplex	T _m (°C)
30	Luciferasa cadenas guía y acompañante sin modificaciones (compuestos 10 y 17, Tabla 1)	76,0
31	Luciferasa, cadena acompañante con grupo pireno en extremo 3' (18), cadena guía sin modificaciones (10)	77,3
32	Luciferasa, cadena acompañante con grupo antraceno en extremo 3' (19), cadena guía sin modificaciones (10)	76,6
33	Luciferasa, cadena acompañante con grupo naftaleno en extremo 3' (20), cadena guía sin modificaciones (10)	76,3
34	Luciferasa, cadena acompañante con grupo trifluorofenilo en extremo 3' (21), cadena guía sin modificaciones (10)	76,5
35	Luciferasa, cadena acompañante con grupo	76,6

ES 2 372 237 A1

	fluorofenilo en extremo 3' (22), cadena guía sin modificaciones (10)		
5	36	Luciferasa, cadena acompañante con grupo acetilo en extremo 3' (23), cadena guía sin modificaciones (10)	76,2
10			
15	37	Luciferasa, cadena guía con grupo pireno en extremo 3' (11), cadena acompañante sin modificaciones (17)	76,1
20	38	Luciferasa, cadena guía con grupo antraceno en extremo 3' (12), cadena acompañante sin modificaciones (17)	75,2
25	39	Luciferasa, cadena guía con grupo naftaleno en extremo 3' (13), cadena acompañante sin modificaciones (17)	75,8
30	40	Luciferasa, cadena guía con grupo trifluorofenilo en extremo 3' (14), cadena acompañante sin modificaciones (17)	75,6
35			
40	41	Luciferasa, cadena guía con grupo fluorofenilo en extremo 3' (15), cadena acompañante sin modificaciones (17)	75,9
45	42	Luciferasa, cadena guía con grupo acetilo en extremo 3' (16), cadena acompañante sin modificaciones (17)	76,2

50

55

60

65

ES 2 372 237 A1

TABLA 3

Temperaturas de fusión (T_m, °C) de los derivados de ARN diseñados para la inhibición de TNF- α y que contienen moléculas de acridina y quindolina en el extremo 3' unidas por una molécula puente de tipo treoninol

pARNi nº	Tipo de dúplex	T _m (°C)
63	TNF cadena acompañante con grupo acridina en extremo 3' (24), cadena guía sin modificaciones (28)	84,3
64	TNF cadena acompañante con grupo quindolina en extremo 3' (25), cadena guía sin modificaciones (28)	84,0
101	TNF cadena guía con grupo acridina en extremo 3' (26), cadena acompañante sin modificaciones (29)	84,2
103	TNF cadena guía con grupo quindolina en extremo 3' (27), cadena acompañante sin modificaciones (29)	84,1
s.m.	TNF sin modificaciones en ninguna de las dos cadenas (28 y 29)	83,5

Estabilidad en suero

La estabilidad de los pARNi en suero se llevó a cabo por incubación a 37°C de 5 μ L de los pARNi que se añadieron a 45 μ L de suero fetal bovino. Después de un periodo determinado de tiempo 10 μ L de la mezcla se añadieron a 15 μ L de solución tampón de electroforesis y la mezcla resultante se congeló.

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante: acrilamida/bisacrilamida 19:1 (25 mL), formamida (12,5 mL), TBE 10X (5 mL), agua (5 mL) y el gel resultante se tiñó con SYBR Green II.

Cultivos celulares, transfección y ensayos celulares. Ensayo de luciferasa

Células SH-SY5Y y HeLa se cultivaron en condiciones habituales: 37°C, 5% CO₂ en medio Eagles's modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO) suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS), 100 U/mL penicilina y 100 μ g/mL estreptomycin. Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial. Las células se sembraron en placas de 24-pocillos (0,5 mL medio/pocillo) hasta alcanzar alrededor del 50% de confluencia para la transfección. Las células se incubaron durante 24 h y el medio celular se cambió a OPTIMEM 1 (GIBCO), 0,5 mL/pocillo. Se utilizaron dos plásmidos que contienen los genes de dos luciferasas: luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (pGL2) y luciferasa de Renilla (*Renilla reniformis*) (pRL-CMV) de la casa comercial Promega. Uno de los genes actúa como gen informador de la inhibición (el gen de luciferasa de luciérnaga incluido en pGL2) ya que el pARNi es complementario a este gen. El gen de luciferasa de *Renilla* incluido en el plásmido pRL-CMV se utiliza como control. La co-transfección de los plásmidos y los pARNis se llevo a cabo con lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante para líneas celulares adherentes. En cada pocillo, se añadieron 1,0 μ g pGL2, 0,1 μ g pRL-CMV y la cantidad requerida de pARNis, formulada con liposomas. El volumen final fue de 500 μ L por pocillo. Las células se aislaron 24 hr después de la transfección y fueron lisadas por lisis pasiva utilizando el tampón de lisis (PLB), 100 μ L por pocillo, siguiendo las instrucciones de fabricante del equipo del sistema de ensayo de las dos luciferasas (Dual-Luciferase Reporter Assay, Promega, USA). Las actividades de luciferasa en las muestras se midieron en un Luminómetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corporation, USA) con un tiempo de demora de 2 s y un tiempo de

ES 2 372 237 A1

integración de 10 s. Se utilizaron 20 μ L de muestra y 30 μ L de cada uno de las soluciones que contienen los sustratos de las luciferasas (Luciferase assay reagent II y Stop & Glo Reagent). La actividad inhibitoria generada por los pARNis se muestran como cantidades normalizadas entre las actividades del gen de la luciferasa de luciérnaga que es el gen informador de la inhibición (GL2, *Photinus pyralis*) y el gen control de luciferasa de renilla RL (*Renilla reniformis*).

5

Oligoribonucleótidos controles utilizados en la inhibición de TNF- α

Las siguientes secuencias de ARN se obtuvieron de fuentes comerciales (*Sigma-Proligo*, *Dharmacon*): cadena antisense o guía control negativo 5'-CAGUCGCGUUUGCGACUGGTT-3' (SEQ ID NO: 3), cadena sense o acompañante control negativo 5'-CCAGUCGCAAACGCGACUGTT-3' (SEQ ID NO: 4), cadena antisense o guía anti-TNF- α : 5'-GAGGCUGAGACAUAGGCACTT-3' (SEQ ID NO: 1) y cadena sense o acompañante anti-TNF- α : 5'-GUGCCUAUGUCUCAGCCUCTT-3' (SEQ ID NO: 2). Los monómeros de tipo ARN se detallan en letras mayúsculas, la abreviación T corresponde a timidina. Las secuencias de pARNi anti-TNF- α habían sido descritas pARNi en la bibliografía para inhibir el ARN mensajero de TNF- α de ratón [S D.R. Sorensen y col. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNA in adult mice. *Journal of Molecular Biology* 327 (2003) páginas 761-766].

Cultivos celulares, transfección y ensayos celulares

20

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

25

Al cabo de una hora después de la transfección, las células HeLa que expresan m-TNF- α se transfectaron con 50 nM de pARNi (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) diseñado para inhibir TNF- α , utilizando oligofectamina (Invitrogen). La concentración de TNF- α en los sobrenadantes del cultivo celular se determinó utilizando el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Bender MedSystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

30

35

40

45

50

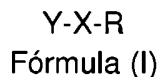
55

60

65

REIVINDICACIONES

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



donde:

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

R se selecciona entre alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, estando R opcionalmente sustituido con al menos un grupo seleccionado entre halógeno (F, Cl, Br, I), haloalquilo, alquilo, C₂-C₅ alqueno, heterocicloalquilo, -NO₂, -CN, -CO₂R_a, -COR_b, -SR_c, -CONR_dR_e, -NR_fR_g, -OR_h y -SO₂NR_iR_j, donde R_a, R_b, R_c, R_d, R_e, R_f, R_g, R_h, R_i y R_j, se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo e isobutilo;

X es una molécula puente unida al dúplex de pARNi (Y) mediante el enlace tipo fosfato a la posición 3' de la cadena guía o acompañante.

2. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque R es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o isobutilo.

3. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque R es metilo o etilo, preferiblemente es metilo.

4. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el grupo X-R está unido a la posición terminal 3' de la cadena guía.

5. El compuesto de pARNi según la reivindicación 1, **caracterizado** porque R es ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

6. El compuesto de pARNi según la reivindicación 1, **caracterizado** porque R es fenilo, naftilo, antracilo o pireno.

7. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque R es fenilo o naftilo, preferiblemente fenilo.

8. El compuesto de pARNi según la reivindicación 1, **caracterizado** porque cuando R es heteroarilo se selecciona del grupo formado por acridinilo, quindolinilo, quinolinilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tia-4H-pirazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzoxazolilo, benzimidazolilo, benzotriazolilo, indazolilo, indolilo, isoindolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidilo, pirazinilo, triazinilo, isoquinolinilo, azocinilo, indolizínilo, purínilo, cinnolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalínilo, naftapiridinilo, pteridinilo, carbazolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, xantenilo y oxapínilo.

9. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque cuando R es heteroarilo se selecciona del grupo formado por acridinilo, quindolinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pteridilo y ftalazinilo.

10. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, **caracterizado** porque el grupo X-R está unido a la posición terminal 3' de la cadena guía.

11. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, **caracterizado** porque el grupo X-R está unido a la posición terminal 3' de la cadena acompañante.

12. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque R está sustituido con al menos un grupo seleccionado entre F, Cl, Br, I y C₁-C₃ haloalquilo.

13. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque R está sustituido con al menos un grupo seleccionado entre F, Cl, Br, I, -CH₂F, -CHF₂, -CF₃, -CCl₃ y -CBr₃.

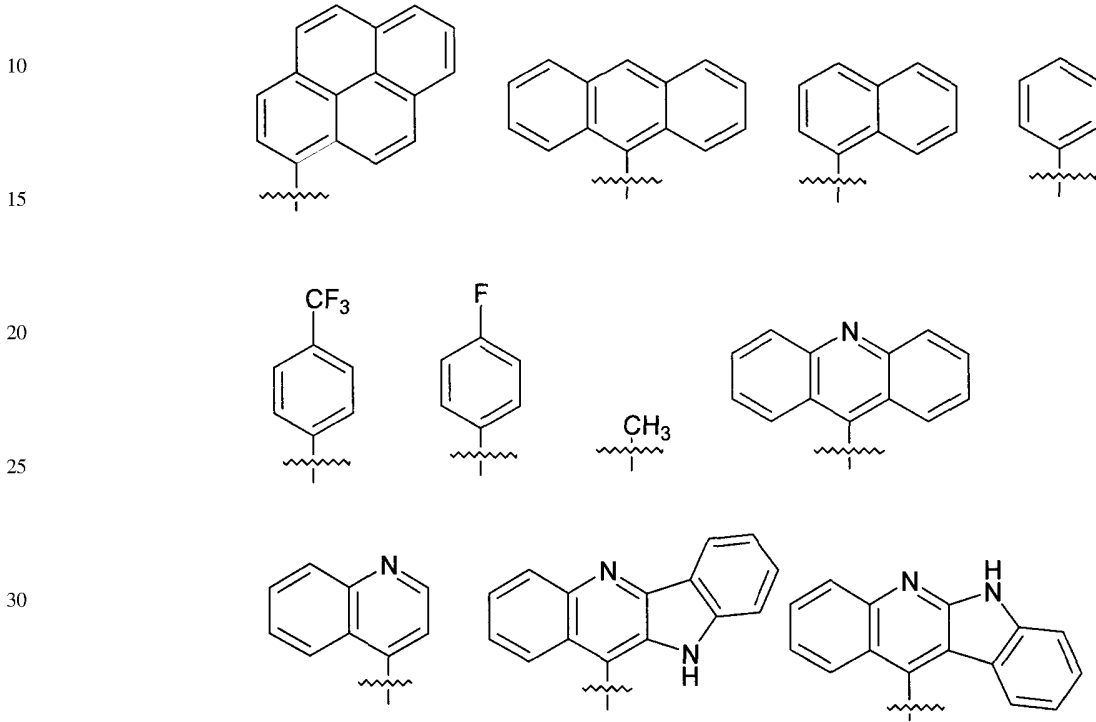
14. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque R está sustituido con al menos un grupo seleccionado entre F, -CH₂F, -CHF₂ y -CF₃, preferiblemente F y -CF₃.

15. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque R es un grupo C₁-C₆ alquilo sustituido con al menos un grupo F, preferiblemente un grupo C₁-C₃ alquilo sustituido con al menos un grupo F, más preferiblemente R es un grupo -CF₃.

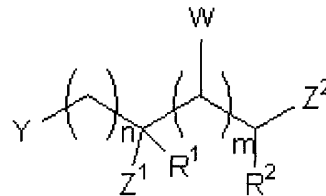
ES 2 372 237 A1

16. El compuesto de pARNi según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque R es un grupo arilo sustituido al menos con un grupo F o -CF₃, preferiblemente un grupo fenilo sustituido con un grupo F o -CF₃, y más preferiblemente R es 4-fluorofenilo o 4-trifluorometilfenilo.

17. El compuesto de pARNi según la reivindicación 1, **caracterizado** porque R se selecciona de entre uno de los siguientes grupos:



18. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el compuesto de fórmula (I) comprende un compuesto de fórmula (II):



Fórmula (II)

donde:

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

Z¹, Z² y Z³ se seleccionan independientemente entre -OH, -O-R, -NHC(=O)R y -NH₂;

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

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

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

Y es según se ha definido en las reivindicaciones anteriores;

R se selecciona independientemente entre los R definidos en las reivindicaciones anteriores.

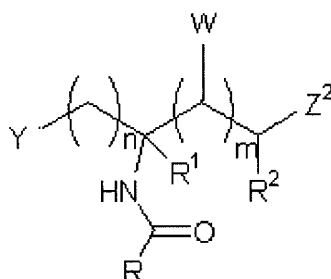
ES 2 372 237 A1

19. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque presenta la fórmula (III):

5

10

15



Fórmula (III)

donde:

20

Y, R, Z², R¹, R², W, n y m son según se han definido en las reivindicaciones anteriores.

25

20. El compuesto de pARNi según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque n es un número entero que se selecciona entre 1, 2 y 3, preferiblemente n es 1.

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

30

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

35

23. El compuesto de pARNi según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el compuesto puente proviene de una molécula de treoninol, glicerol, 2-amino-1,3-propandiol, 2-amino-1,4-butandiol, 3-amino-1,4-butandiol, 3,-amino-1,2-propandiol, hidroxiprolinol o serinol, preferiblemente proviene de treoninol.

24. El compuesto de pARNi según cualquiera de las cinco reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende alguna de las siguientes estructuras:

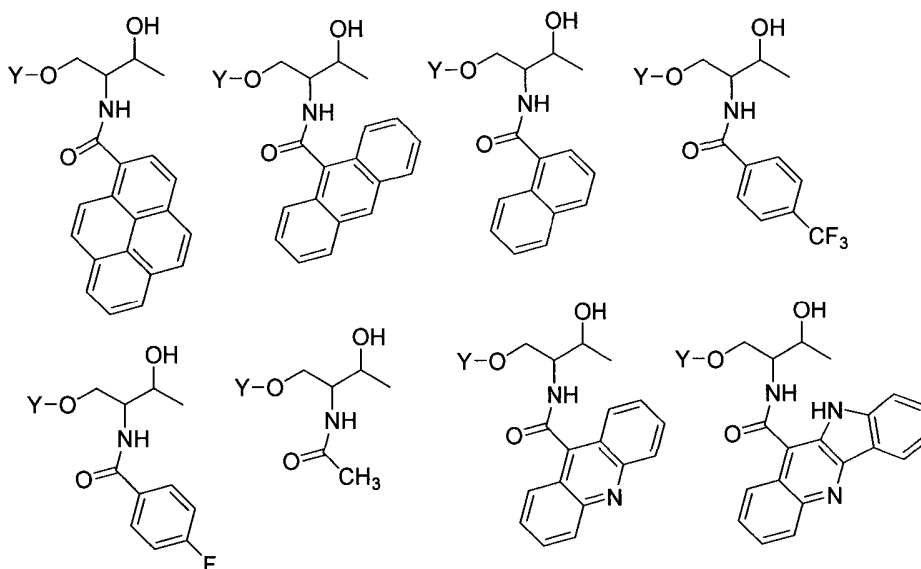
40

45

50

55

60



65

25. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el oligonucleótido de pARNi (Y) tiene entre 15 y 40 nucleótidos.

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

ES 2 372 237 A1

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

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

29. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dicho dúplex de siARN (Y) inhibe/silencia, total o parcialmente, la expresión de al menos uno de los siguientes genes factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGF R1/2), factor supresor de colonias de granulocitos (GM-CSF-1) y de macrófagos (M-CSF-1), angiopoietina (ANGPT), apolipoproteína (ApoB), neovascularización vascular (CNV), carboxiquinasa fosfoenol piruvato (PEPCK), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP2), receptor de N-metil-D aspartato (NMDA), citoquina derivadas de los keratocitos (KC), receptor opio de delta (DOR), receptor del dominio de discoidina (DDR41), gen de la fosfoproteína PIV (PIV-P), oxigenasa hemo (HMOX1), caveloína, transportador de dopamina, proteína fluorescente verde y proteína del sarcoma de Swing (EWS-FL/1).

30. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el dúplex de pARNi (Y) inhibe/silencia, total o parcialmente, al menos uno de los siguientes genes factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGF R1/2), factor supresor de colonias de granulocitos (GM-CSF-1) y de macrófagos (M-CSF-1).

31. El compuesto de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la secuencia de pARNi se selecciona entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 1.

32. Un compuesto de fórmula (I):

Y-X-R

Fórmula (I)

donde:

Y es una cadena sencilla de pARNi unida mediante un enlace tipo fosfato a X;

R se selecciona entre alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, estando R opcionalmente sustituido con al menos un grupo seleccionado entre halógeno (F, Cl, Br, I), haloalquilo, alquilo, C₂-C₅ alqueno, heterocicloalquilo, -NO₂, -CN, -CO₂R_a, -COR_b, -SR_c, -CONR_dR_e, -NR_fR_g, -OR_h, -SO₂NR_iR_j; donde R_a, R_b, R_c, R_d, R_e, R_f, R_g, R_h, R_i y R_j, se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo e isobutilo;

X es una molécula puente unida a la cadena sencilla de pARNi (Y) mediante el enlace tipo fosfato a la posición 3'.

33. Un proceso para la síntesis en fase sólida de los compuestos según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- i) enlazar covalentemente el grupo R y el puente;
- ii) unir el compuesto obtenido en el paso (i) a un soporte sólido;
- iii) ensamblar de manera secuencial una de las cadenas de pARNi sobre la molécula X-R unida al soporte sólido;
- iv) romper el enlace entre el soporte sólido y el producto y eliminar los grupos protectores obteniéndose una de las cadenas del pARNi conteniendo el grupo X-R;
- v) mezclar cantidades equivalentes de las cadenas guía y acompañante para generar el dúplex de pARNi.

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

ES 2 372 237 A1

35. El proceso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el grupo R es unido a un soporte sólido a través de una molécula puente y al menos una de las cadenas del pARNi es sintetizada utilizando el procedimiento de síntesis en fase sólida utilizando el soporte sólido funcionalizado con el grupo R.

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

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

15 38. Una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos de pARNi como se describen en las reivindicaciones 1 a 32 y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

20 40. La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, **caracterizada** porque el agente de transfección se selecciona entre uno o mezclas de los siguientes compuestos lipofectina, liptofectamina, oligofectamina, effectene, cellfectina, DOTAP, DOPE, fugene, polietilenglicol, colesterol, polietilenimida (PEI), Jet-polietilenimida, péptidos de penetración celular, péptidos troyanos, péptido TAT, penetratina, oligoarginina, poli-lisina, glicoproteína del virus de la rabia, nanopartículas de oro, dendrímeros, nanotubos de carbono, lípidos catiónicos y/o liposomas.

25 41. El uso de los compuestos de pARNi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 o de las composiciones según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores para la preparación de un medicamento.

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

43. El uso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, inflamación, colitis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y/o artritis reumatoides.

35

40

45

50

55

60

65

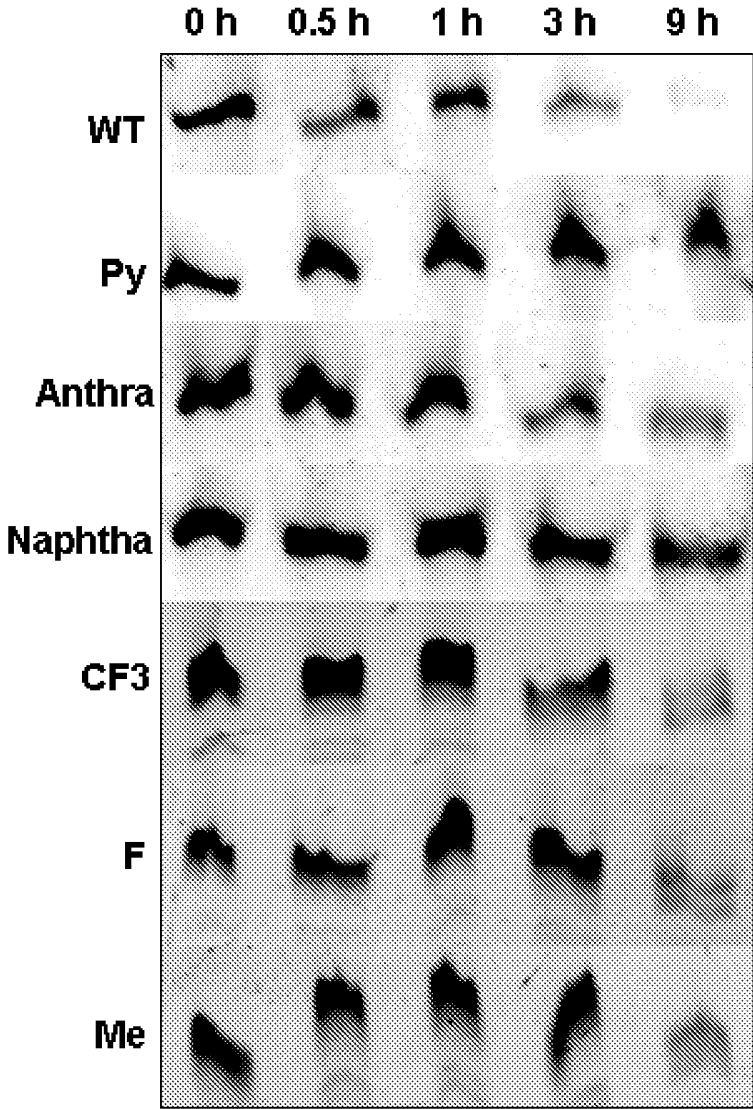


Fig. 1

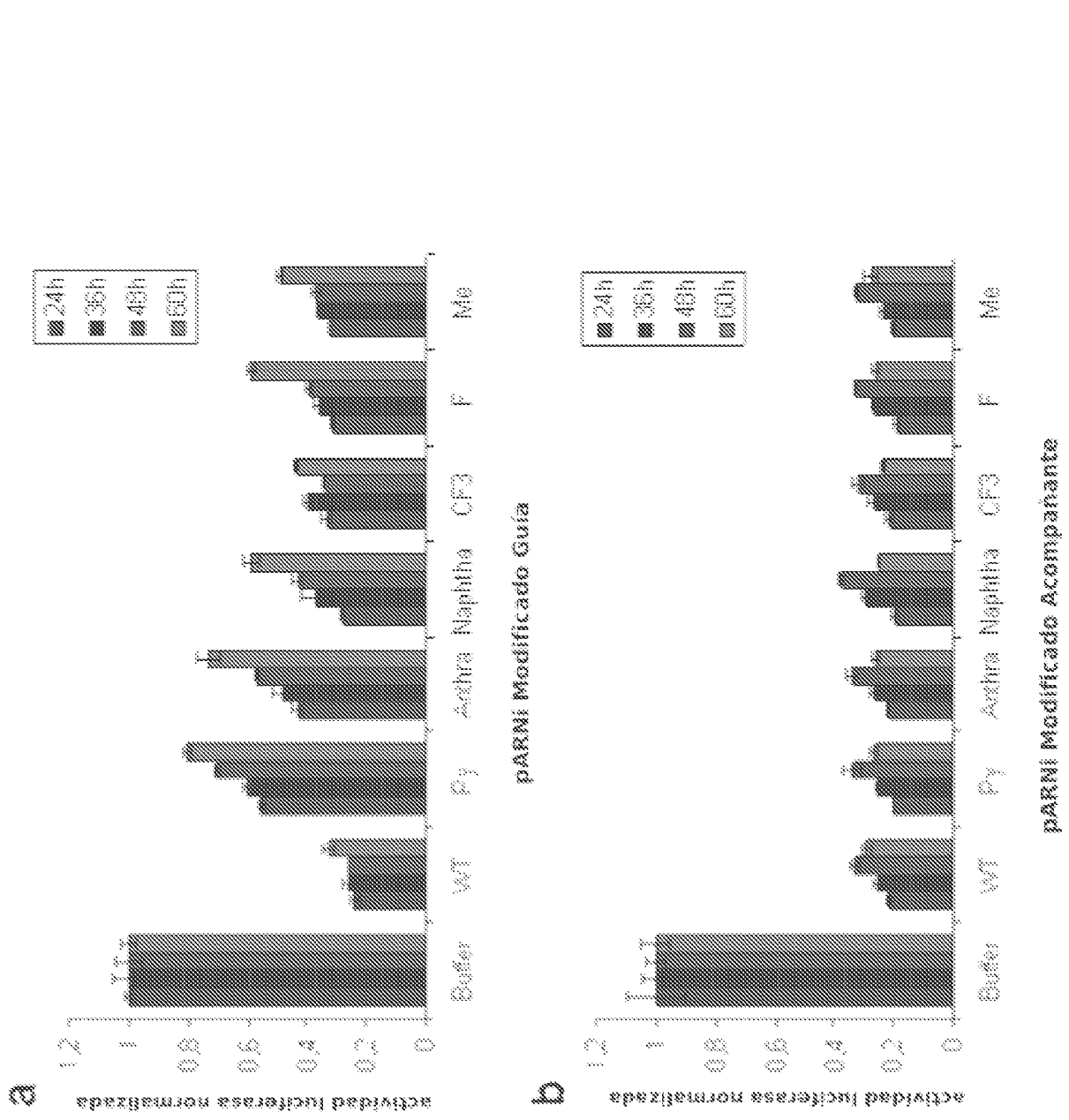


Fig. 2

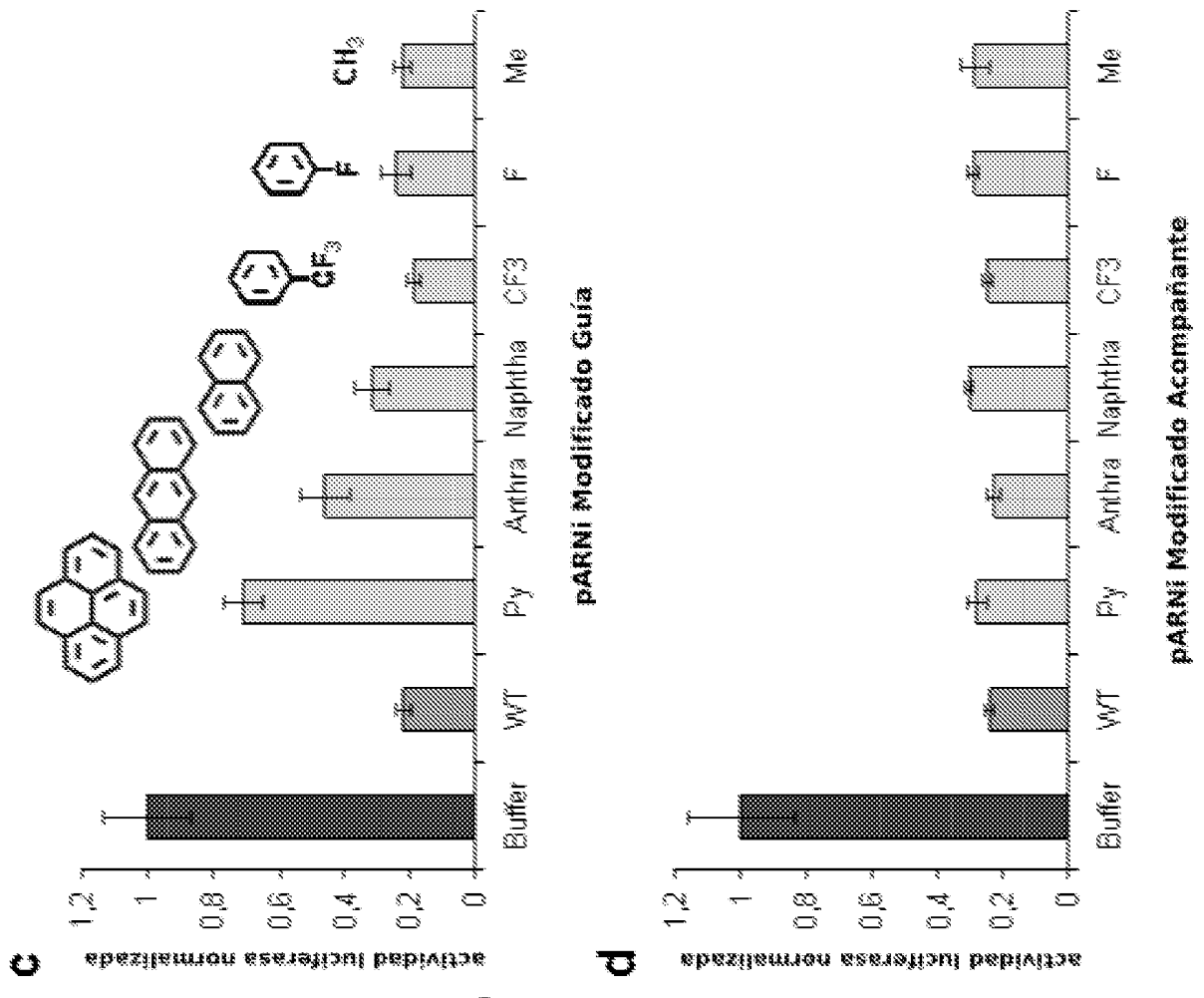


Fig. 2

A.

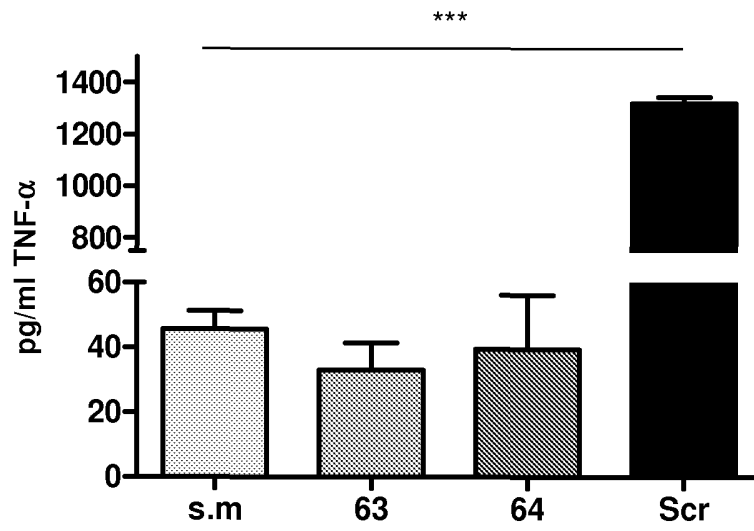


Fig. 3

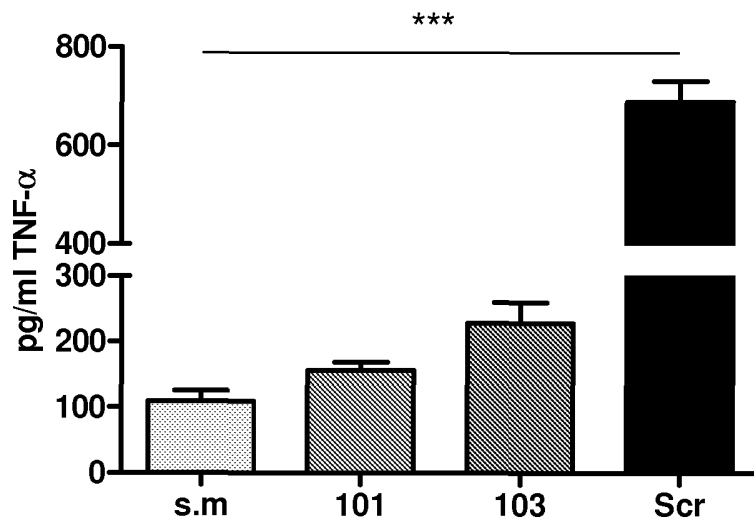


Fig. 4

ES 2 372 237 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Consejo Superior de investigaciones Científicas
Universidad de Barcelona
CIBER-BBN
- <120> Oligonucleótidos modificados como reguladores de la expresión génica
- 10 <130> ES1641.511
- <160> 6
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 21
- 20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Fragmento de la secuencia guía o antisentido del ARN de TNF alfa de *Mus musculus* a la que se han adicionado dos timinas en el extremo 3'.
- <400> 1
- 30 gaggcugaga cauaggcact t 21
- <210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Fragmento de la secuencia acompañante o sentido del ARN de TNF alfa de *Mus musculus* a la que se han adicionado dos timinas en el extremo 3'.
- 45 <400> 2
- gugccuaugu cucagccuct t 21
- 50 <210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 60 <223> Fragmento de una secuencia guía o antisentido de ARN de *Euglena gracilis* a la que se han adicionado dos timinas en el extremo 3'.
- <400> 3
- 65 cagucgcguu ugcgacuggt t 21

ES 2 372 237 A1

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

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

<400> 4
15 ccagucgcaa acgcgacugt t 21

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

<220>
<223> Fragmento de la secuencia guía o antisentido del ARN del gen GL2 que codifica la luciferasa de *Photinus pylaris* a la que se ha adicionado una timina en el extremo 3'.
25

<400> 5
30 ucgaaguauu ccgcuacgt 20

35 <210> 6
<211> 20
<212> DNA
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de la secuencia acompañante o sentido del ARN del gen GL2 que codifica la luciferasa de *Photinus pylaris* a la que se ha adicionado una timina en el extremo 3'.
45

<400> 6
50 cguacgcgga auacuucgat 20

55
60
65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201030614

22 Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl. : Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GB 2406568 A (SIRNA THERAPEUTICS INC) 06.04.2005, página 6, líneas 10-26; reivindicaciones 1-31.	1-43
A	WO 2004029212 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 08.04.2004, página 2, línea 25 – página 3, línea 14; resumen; reivindicaciones 1-83.	1-43
A	WO 2007128477 A2 (NOVARTIS AG) 15.11.2007, reivindicaciones 1-23; resumen.	1-43
A	ANNA AVIÑÓ et al. "Solid-phase synthesis of oligomers carrying several chromophore units linked by phosphodiester backbones" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 8, 2008, páginas 2306-2310. Página 2307-2309.	1-43

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.12.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K48/00 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

C12N15/87 (2006.01)

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

A61K, C12N

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-43	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-43	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GB 2406568 A (SIRNA THERAPEUTICS INC)	06.04.2005
D02	WO 2004029212 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS)	08.04.2004
D03	WO 2007128477 A2 (NOVARTIS AG)	15.11.2007
D04	ANNA AVIÑO et al. "Solid-phase synthesis of oligomers carrying several chromophore units linked by phosphodiester backbones" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 8, 2008, páginas 2306-2310. Página 2307-2309.	

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

La presente solicitud de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a un compuesto de pARNi y un grupo R unidos covalentemente entre sí mediante una molécula puente (X) por medio de un enlace tipo fosfato a la posición 3' de la cadena guía o acompañante (reivindicaciones 1, 4 y 10). R puede ser metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o isobutilo, preferiblemente metilo (reivindicaciones 2 y 3, 4-10). R puede estar sustituido (reivindicaciones 12-16). Se reivindica también el compuesto de fórmula (II) y el de fórmula (III) (reivindicaciones 18-31). En el compuesto de fórmula I, Y puede ser una cadena sencilla de pARNi (reivindicación 32). Por último, se hace referencia también a un procedimiento de síntesis de dichos compuestos en fase sólida (reivindicaciones 33-38), a la composición farmacéutica (reivindicaciones 38-40) y al uso de dichos compuestos (reivindicaciones 41-43).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 hace referencia a pequeñas moléculas de ácidos nucleicos, tales como siNA (short interfering nucleic acid), siRNA (short interfering RNA), dsRNA (double-strand RNA), miRNA (micro-RNA) y shRNA (short hairpin RNA) capaces de modular la expresión genética en las células por medio de RNAi (RNA de interferencia) (véase página 6, líneas 10-26). Se trata de RNAi de doble cadena sintetizado químicamente, en donde la cadena complementaria tiene una modificación química en 3' ó 5' o en ambos (véase reivindicación 1). Presenta también una molécula de unión que puede ser un polinucleótido o una molécula que no se encuentre formada por nucleótidos (véase reivindicaciones 10-12).

El documento D02 se refiere a siRNAs que presentan modificaciones para mejorar la estabilidad de dichos siRNAs. Las modificaciones incluyen reticulaciones químicas entre las dos cadenas complementarias de un siRNA y modificaciones químicas en el extremo 3' de una cadena de un siRNA. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones en la molécula de azúcar, en las bases nitrogenadas o en la propia estructura (véase resumen y página 2, líneas 25-página 3, línea 14; y reivindicaciones 1-83).

El documento D03 trata sobre siRNA que comprende dos cadenas de RNA separadas que son complementarias en al menos 15 nucleótidos, cuyas cadenas son de 49 nucleótidos o menos, y al menos una de las cadenas presentan una modificación química (véase resumen y reivindicaciones 1-23).

El documento D04 describe la síntesis de compuestos oligómeros que contienen unidades cromóforas, llevándose a cabo dicha síntesis en fase sólida (véase página 2306, columna derecha). Para ello se utilizaron derivados de treoninol (véase página 2307-2309).

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados, considerados solos o en combinación, revelan los compuestos de pARNi de la presente invención. Ni tampoco, en dichos documentos citados existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-43, por lo que el objeto de las reivindicaciones 1-43 cumple el requisito de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6 Y 8 de la LP.