

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 098**

51 Int. Cl.:

A23L 33/13 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2016** **E 22175377 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2024** **EP 4104687**

54 Título: **Composiciones y métodos para sintetizar ARN con caperuza 5'**

30 Prioridad:

21.09.2015 US 201562221248 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.06.2024

73 Titular/es:

TRILINK BIOTECHNOLOGIES, LLC (100.0%)
10770 Wateridge Circle, Suite 200
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

HOGREFE, RICHARD I.;
LEBEDEV, ALEXANDRE;
MCCAFFREY, ANTON P. y
SHIN, DONGWON

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 972 098 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para sintetizar ARN con caperuza 5'

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos para la síntesis de ARN con caperuza 5'. En aspectos particulares, la presente invención se refiere a novedosos cebadores oligonucleotídicos iniciadores que contienen caperuza que tienen estructuras 5'-Cap 0, Cap 1 o trimetilguanosina-Cap (TMG-Cap) naturales o modificadas. La presente solicitud también describe métodos para generar y usar eficientemente los mismos para preparar ARN con caperuza 5'.

Antecedentes de la invención

La siguiente descripción se proporciona para ayudar a la comprensión del lector. Ninguna de la información que se proporciona o las referencias que se citan se admiten como técnica anterior en la presente invención.

El ARN mensajero (ARNm), que codifica proteínas fisiológicamente importantes para aplicaciones terapéuticas, ha mostrado ventajas significativas sobre los plásmidos basados en ADN y los vectores virales para suministrar el material genético. Las más importantes de estas ventajas son:

- (i) alto nivel de seguridad (reduce el daño potencial del genoma debido a la integración viral o plasmídica),
- (ii) el suministro de ARNm da como resultado la expresión inmediata de proteínas (a diferencia de las respuestas retardadas que generalmente ocurren con los plásmidos),
- (iii) el ARNm permite un fuerte control dependiente de la dosis sobre la expresión de proteínas y
- (iv) la simplicidad de la síntesis a gran escala de ARNm en comparación con la fabricación de plásmidos y vectores virales.

Los ARN mensajeros pueden codificarse para prácticamente cualquier proteína conocida y pueden suministrarse a tejidos y órganos específicos mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Una vez que se suministran, estos ARNm dirigen la expresión de proteínas ribosómicas dentro de los tejidos objetivo, lo que da como resultado la producción de muchos centenares de proteínas por molécula de ARNm.

Se utilizan varios elementos estructurales, presentes en cada molécula de ARNm activa, para traducir eficientemente las proteínas codificadas. Uno de estos elementos es una estructura de caperuza en el extremo 5' de los ARNm, que está presente en todos los organismos eucariotas (y algunos virus). Las estructuras de caperuza que se producen naturalmente comprenden un residuo de riboguanosina que se metila en la posición N7 de la base de guanina. Esta 7-metilguanosina (^{7m}G) se une mediante un enlace trifosfato 5'-5' al extremo 5' de la molécula de ARNm. A lo largo de esta solicitud, 7m y m7 se usan indistintamente con un significado equivalente. La presencia del fragmento ^{7m}Gppp en el extremo 5' es esencial para la maduración del ARNm, ya que:

- protege los ARNm de la degradación por exonucleasas,
- facilita el transporte de ARNm desde el núcleo al citoplasma y
- juega un papel clave en el ensamble del complejo de iniciación de la traducción (Cell 9:645-653, (1976); Nature 266:235, (1977); Federation of Experimental Biologists Society Letter 96:1-11, (1978); Cell 40:223-24, (1985); Prog. Nuc. Acid Res. 35:173-207, (1988); Ann. Rev. Biochem. 68:913-963, (1999); J. Biol. Chem. 274:30337-3040, (1999)).

Solo los ARNm que llevan la estructura de caperuza son activos en la traducción dependiente de la caperuza; la "decapitación" del ARNm da como resultado una pérdida casi completa de su actividad de plantilla para la síntesis de proteínas (Nature, 255: 33-37, (1975); J. Biol. Chem., Vol. 253: 5228-5231, (1978); y Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 1189-1193, (1975)).

Otro elemento del ARNm eucariota es la presencia de residuos de nucleósido 2'-O-metil en la posición 1 del transcrito (Cap 1) y, en algunos casos, en las posiciones 1 y 2 del transcrito (Cap 2). La 2'-O-metilación del ARNm es necesaria para una mayor eficacia de la traducción del ARNm *in vivo* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3952-3956 (1980)) y mejora aún más la estabilidad frente a nucleasas del ARNm con caperuza 5'. El ARNm con Cap 1 (y Cap 2) es una marca distintiva que permite a las células reconocer el extremo 5' del ARNm *auténtico* y, en algunos casos, para discriminar los transcritos que se derivan de elementos genéticos infecciosos (Nucleic Acid Research 43: 482-492 (2015)).

Un transcrito de ARNm primario lleva un grupo 5'-trifosfato (5'-pppARNm) que resulta de la iniciación de la síntesis de ARN que comienza con NTP (típicamente GTP) *in vivo*. La conversión del extremo 5'-trifosforilado del transcrito de ARNm en una estructura de caperuza (Cap 0) ocurre en varias etapas enzimáticas (J. Biol. Chem. 250: 9322, (1975); J. Biol. Chem. 271: 11936, (1996)); J. Biol. Chem. 267: 16430, (1992)). Estas etapas de reacciones enzimáticas incluyen:

Etapas 1: La ARN trifosfatasa convierte el 5'-trifosfato del ARNm en un 5'-difosfato, $pppN_1(pN)_x \rightarrow ppN_1(pN)_x + \text{fosfato}$

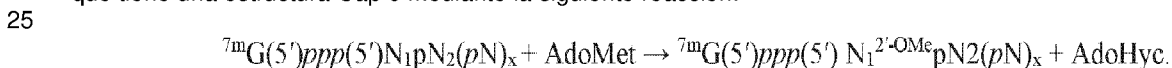
inorgánico;

Etapla 2: La ARN guaniltransferasa usa GTP para transferir un residuo de GMP al 5'-difosfato del ARNm, $ppN_1(pN)_x + GTP \rightarrow G(5')ppp(5')N_1(pN)_x + \text{pirofosfato inorgánico}$; y

5 Etapla 3: guanina-7-metiltransferasa, usa S-adenosil-metionina (AdoMet) como cofactor y transfiere el grupo metilo de AdoMet al 7-nitrógeno de la base de guanina, $G(5')ppp(5')N_1(pN)_x + \text{AdoMet} \rightarrow {}^mG(5')ppp(5')N_1(pN)_x + \text{AdoHyc}$.

10 El ARN que resulta de estas actividades enzimáticas se refiere como "ARN con caperuza 5'" o "ARN con caperuza", y la combinación de enzimas implicadas en este proceso que resulta en la formación de "ARN con caperuza" se refiere como "enzima de adición de caperuzas". Las enzimas de adición de caperuzas, que incluyen las formas clonadas de tales enzimas, se han identificado y purificado a partir de muchas fuentes y son bien conocidas en la técnica (Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 66:1-40, (2001); Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 50:101-129, (1995); y Microbiol. Rev. 44:175, (1980)). El ARN con caperuza que resulta de la adición del nucleótido caperuza al extremo 5' del ARN primario por las enzimas de adición de caperuzas se ha referido como ARN con caperuza que tiene una "estructura Cap 0" (J. Biol. Chem. 269: 14974-14981, (1994); J. Biol. Chem. 271: 11936-11944, (1996)). Se han usado enzimas de adición de caperuzas para sintetizar ARN con caperuza que tiene una estructura Cap 0 *in vitro* (J. Biol. Chem. 255:11588, (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:9573, (1997); J. Biol. Chem. 267:16430, (1992); J. Biol. Chem. 269:14974, (1994); y J. Biol. Chem. 271:11936, (1996)).

20 El ARN con caperuza que tiene una estructura 5'-Cap 0 puede transformarse adicionalmente *in vivo* a una estructura "Cap 1" por la acción de (nucleósido-2'-O-) metiltransferasa (J. Biol. Chem. 269: 14974-14981, (1994); J. Biol. Chem. 271: 11936-11944, (1996)); y EMBO 21: 2757-2768, (2002)). Por ejemplo, la ARNm (nucleósido-2'-O) metiltransferasa de vaccinia puede catalizar la metilación del grupo 2'-hidroxilo del penúltimo nucleótido 5' del ARN con caperuza 5' que tiene una estructura Cap 0 mediante la siguiente reacción:



30 Se ha reportado que los ARN con caperuza dimetilados que tienen una estructura de caperuza 1 se traducen de manera más eficiente que los ARN con caperuza que tienen una estructura Cap 0 (Nucleic Acids Res. 26:3208, (1998)). Las células eucariotas utilizan otra (nucleósido-2'-O) metiltransferasa (por ejemplo, hMTR2 en células humanas (Nucleic Acids Res. 39: 4756 (2011)) para catalizar la metilación del grupo 2'-hidroxilo del segundo nucleótido transcrito del ARN con caperuza 5' para convertir la estructura de caperuza 1 en una estructura de caperuza 2 mediante la siguiente reacción:



Aproximadamente el 50 % de los ARNm eucariotas tienen una estructura de caperuza 2.

40 Con el fin de producir ARN largos y funcionales para varios estudios biológicos, un método de síntesis enzimática *in vitro* de ARN primario se desarrolló a mediados de la década de 1980 (Methods Enzymol. 180:51-62, (1989); Nucl. Acids Res., 10:6353-6362, (1982); Meth. Enzymol., 180:42-50 (1989); Nucl. Acids Res., 12:7035-7056, (1984) y Nucleic Acid Research 15: 8783-8798, (1987)).

45 Después de la transcripción *in vitro*, el transcrito de ARNm primario que lleva el grupo 5'-trifosfato puede además protegerse con caperuza con la enzima de adición de caperuzas. Sin embargo, el complejo enzimático de adición de caperuzas 5' *in vitro* es caro, laborioso, ineficaz y difícil de controlar.

50 En vista de estas desventajas, se desarrolló otro método para la síntesis *in vitro* de ARN con caperuza donde un dinucleótido sintetizado químicamente ${}^mG(5')ppp(5')G$ (también referido como mCAP) se usa para iniciar la transcripción (RNA 1: 957-967, (1995)). El dinucleótido mCAP contiene la estructura 5'-Cap 0 del ARNm maduro pero no tiene 2'-O-metil nucleósidos característicos de las estructuras Cap 1 y Cap 2.

55 Sin embargo, hay dos desventajas principales que se atribuyen al inicio de la transcripción *in vitro* mediante el uso de dinucleótido mCAP sintético. El primero es una fuerte competencia de mCAP y pppG por la iniciación de la síntesis de ARNm. Cuando el ARNm se inicia con pppG, el ppp-ARNm resultante es inactivo en la traducción e inmunogénico debido a la presencia del 5'-trifosfato. De manera correspondiente, cuando el ARNm se inicia con mCAP, el ARNm con caperuza 5' resultante es activo en la traducción y no es tan inmunogénico.

60 Con el fin de mejorar la proporción de ARNm con caperuza 5' a ARNm sin caperuza 5' (o 5'-trifosforilado; ppp-ARNm), un exceso de mGpppG sobre pppG (de 4:1 a 10:1) debe usarse para favorecer la producción de los transcritos de ARNm con estructura 5'-Cap (hasta 80-90 %). El lado negativo de este enfoque es una reducción significativa del rendimiento global de ARNm debido a un rápido agotamiento del suministro de GTP durante la transcripción y al requisito de grandes cantidades de un dímero sintético de mCAP que puede resultar costoso. Después de la transcripción, es necesario un tratamiento adicional de la mezcla cruda, que contiene tanto ARNm con caperuza 5' como 5'-pppARNm, con fosfatasa alcalina, necesaria para eliminar los grupos 5'-trifosfato sin caperuza del pppARNm

con el fin de reducir la inmunogenicidad del ARNm sintetizado. La forma de ARNm 5'-OH sin caperuza obtenida después del tratamiento con fosfatasa es inactiva y no participa en el proceso de traducción.

5 Otra desventaja, una iniciación bidireccional, puede surgir cuando se usa un dinucleótido mCAP no simétrico. Existe una tendencia a que el grupo 3'-hidroxilo del resto G o 7^mG de 7^mGpppG sirva como punto de iniciación para la elongación transcripcional con una probabilidad casi igual. Por lo general, conduce a una síntesis de dos ARN isoméricos de la forma $7^m\text{G}(5')\text{pppG}(\text{pN})_n$ y $\text{G}(5')\text{ppp}7^m\text{G}(\text{pN})_n$, en proporciones aproximadamente iguales, en dependencia de las condiciones de la reacción de transcripción (RNA 1: 957-967, (1995)).

10 Para eliminar la iniciación bidireccional de la síntesis de ARNm con dinucleótido mCAP un novedoso análogo de mCAP modificado en el que el grupo 3'-OH del residuo 7^mG se reemplaza con OCH_3 ("OMe"): $7^m\text{G}(3'\text{-O-Me})\text{pppG}$ (también conocido como Anti-Reverse Cap Analog (ARCA)) se desarrolló. ARCA inicia la síntesis de ARNm solo en la orientación directa correcta (RNA 7: 1486-1495 (2001)). Se conocen en la técnica varios tipos de análogos de ARCA (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos núm. 7,074,596). Sin embargo, todavía se requiere un gran exceso molar de ARCA sobre pppG para asegurar que la mayoría de las moléculas de transcritos de ARNm tengan la estructura 5'-Cap. Una desventaja adicional es que un ARNm con una estructura de caperuza 1 no puede sintetizarse mediante el uso de un dímero $7^m\text{GpppG}^{2'\text{-OMe}}$ Cap (RNA 1: 957, (1995)) o su análogo ARCA.

20 En la actualidad, las rutas conocidas para la producción de ARNm largos y activos que contienen una estructura de caperuza 1 consisten en la adición enzimática de caperuzas y la 2' O-metilación enzimática del transcrito de ARNm 5'-trifosforilado o la 2' O-metilación enzimática de mCAP-con caperuza o del precursor de ARNm con caperuza ARCA (Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, 25:337-340, (2006) and Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids 25(3):307-14, (2006)). Ambos enfoques son bastante laboriosos, difíciles de controlar e, incluso con una optimización sustancial, ninguno de los enfoques puede garantizar un alto rendimiento de un precursor de ARNm metilado y con caperuza (J. Gen. Virol, 91: 112-121, (2010)). Además, los métodos para preparar ARNm con una estructura de caperuza 2 son incluso más difíciles y los resultados son menos predecibles. Las enzimas para convertir Cap 1 en Cap 2 no están actualmente disponibles comercialmente.

30 Otra complicación significativa de la síntesis *in vitro* de ARNm, especialmente en la fabricación a gran escala, es la necesidad de aislar y purificar las moléculas de ARNm activo que llevan Cap de todas las formas de ARNm sin caperuza que son inactivas y en algunos casos inmunogénicas. Desafortunadamente, estos métodos no son triviales y, a menudo, requieren una síntesis de análogos de mCAP modificados con restos de etiquetas de afinidad conjugadas que permiten un aislamiento y purificación más fáciles del transcrito de ARN con caperuza. Se conocen en la técnica métodos para sintetizar análogos de mCAP con etiquetas de afinidad como un resto reportero/de afinidad y protocolos novedosos para el aislamiento de ARN con caperuza a partir de la mezcla de reacción de transcripción (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos núm. 8,344,118). Si bien estos enfoques son eficientes, requieren el uso de análogos de mCAP más costosos y permiten la preparación y el aislamiento de ARNm que contienen únicamente la estructura Cap 0.

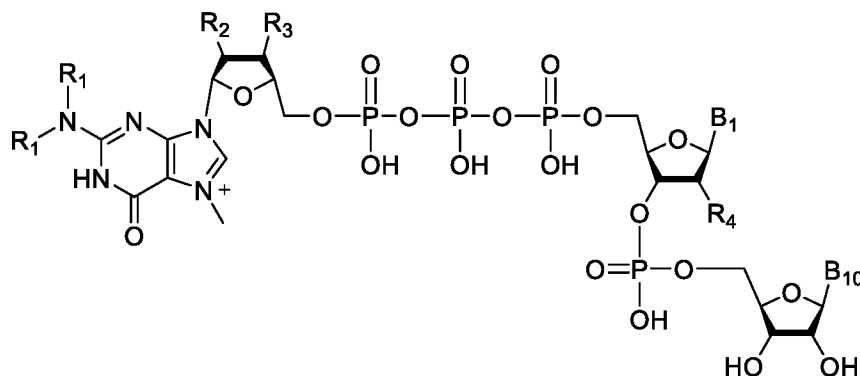
40 La síntesis *in vitro* de ARN naturales y modificados encuentra uso en una variedad de aplicaciones, que incluye estudios de ribozimas, antisentido, biofísicos y bioquímicos. Además, los transcritos de ARNm con caperuza se usan para solicitudes que requieren síntesis de proteínas, tales como experimentos de expresión *in vivo* (mediante el uso de microinyección, transfección e infección), experimentos y ensayos de traducción *in vitro*, así como también diversas aplicaciones en terapéutica, diagnóstico, desarrollo de vacunas, identificación y detección.

45 En consecuencia, existe una necesidad en la industria de composiciones y métodos que permitan la síntesis a gran escala de ARNm que sean (a) menos laboriosos que los métodos convencionales, (b) eliminen o reduzcan la iniciación bidireccional durante la transcripción, (c) den como resultado mayores rendimientos de ARNm, a un (d) coste reducido en comparación con los métodos actuales, (e) reduzcan la producción de productos heterogéneos con diferentes secuencias 5' y (f) no requieran reacciones enzimáticas adicionales para incorporar estructuras de caperuza 1 y Cap 2 en el ARNm sintetizado. También existe la necesidad de la síntesis de varios ARNm que contienen nucleósidos modificados y/o no naturales, que llevan modificaciones específicas y/o etiquetas de afinidad como tintes fluorescentes, un radioisótopo, una etiqueta de masa y/o una pareja de un par de unión molecular tales como la biotina en o cerca del extremo 5' de la molécula.

55 En el documento WO 2008/016473 se describen análogos con caperuza que están metilados en la posición N7 de una o ambas guanosinas de la caperuza del dinucleótido así como también en la posición 3' del anillo de ribosa. En el documento WO 2009/058911 se describe la síntesis de ARN con caperuza/etiqueta, métodos de uso y kits que los proporcionan. Thillier y otros, (RNA, **2012**, doi: 10.1261/rna.030932.111) describen la síntesis de ARN 5' Cap-0 y Cap-1 mediante química en fase sólida acoplada a metilación enzimática por (guanina-N⁷)-metiltransferasa humana. Sawai y otros, (J Org Chem, 1999, 64(16), 5836-5840) describen la síntesis y las reacciones del nucleósido 5'-difosfato imidazolidina. Koukhareva y otros, (Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, **2004**, 23(10), 1667-1680) describen un enfoque químico para la preparación de cantidades de miligramos de oligonucleótidos de ARN cortos y con caperuza, basado en el uso de un precursor reactivo, m7GppQ [P1-7-metilguanosa-5'-O-ilo, P2-O-8- (5-cloroquinolil) pirofosfato].

Resumen de la invención

En el presente documento se proporcionan compuestos para sintetizar ARN con caperuza 5'. En un aspecto de la presente invención, los compuestos tienen la estructura general de Fórmula I:



en donde

- B₁ es guanina;
- B₁₀ es una base nucleosídica natural;
- R₁ es H o metilo;
- R₂ y R₃ son independientemente H, OH, alquilo, O-alquilo o halógeno; y
- R₄ es H, OH u O-metilo.

La invención también proporciona un cebador oligonucleotídico de iniciación con caperuza, seleccionado de ^{m7}GpppGpA, ^{m7}GpppGpC, ^{m7}GpppGpG, ^{m7}GpppGpU, ^{m7}G^{3'}OmepppGpA, ^{m7}G^{3'}OmepppGpC, ^{m7}G^{3'}OmepppGpG, ^{m7}G^{3'}OmepppGpU, ^{m7}G^{3'}OmepppG2'omepA, ^{m7}G^{3'}OmepppG2'OmepC, ^{m7}G^{3'}OmepppG2'OmepG, ^{m7}G^{3'}OmepppG2'OmepU, ^{m7}GpppG2'OmepA, ^{m7}GpppG2'OmepC, ^{m7}GpppG2'OmepG y ^{m7}GpppG2'OmepU.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan moléculas de ARN que comprenden un cebador oligonucleotídico de iniciación de Fórmula I, o un cebador oligonucleotídico de iniciación seleccionado de ^{m7}GpppGpA, ^{m7}GpppGpC, ^{m7}GpppGpG, ^{m7}GpppGpU, ^{m7}G^{3'}OmepppGpA, ^{m7}G^{3'}OmepppGpC, ^{m7}G^{3'}OmepppGpG, ^{m7}G^{3'}OmepppGpU, ^{m7}G^{3'}OmepppG2'omepA, ^{m7}G^{3'}OmepppG2'OmepC, ^{m7}G^{3'}OmepppG2'OmepG, ^{m7}G^{3'}OmepppG2'OmepU, ^{m7}GpppG2'OmepA, ^{m7}GpppG2'OmepC, ^{m7}GpppG2'OmepG y ^{m7}GpppG2'OmepU. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden dicho ARN y células que contienen dicho ARN.

También se proporciona un método de producción de una célula que contiene una proteína traducida a partir de dicho ARN, que comprende la introducción de dicha molécula de ARN que contiene un cebador oligonucleotídico con caperuza de iniciación de la presente invención en una célula que utiliza dicha molécula de ARN para producir dicha proteína.

La presente invención también describe métodos para sintetizar moléculas de ARN que comprenden introducir un cebador oligonucleotídico de iniciación de Fórmula I que contiene Cap en una mezcla que comprende una plantilla polinucleotídica y una ARN polimerasa en condiciones propicias para la transcripción por la ARN polimerasa de la plantilla polinucleotídica y luego incubar la mezcla resultante durante un tiempo suficiente para permitir la transcripción de dicha plantilla.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un método ilustrativo para preparar 5-difosfato de 7-metilguanosina (pp^{m7}G) a partir de guanosina 5'-difosfato;

La Figura 2 muestra un método ilustrativo para preparar imidazolda de 7-metilguanosina 5'-difosfato (Im-p^{m7}G) de pp^{m7}G;

La Figura 3 muestra un método ilustrativo para preparar 3'-O-metilguanosina 5'-fosfato (pG^{3'}Ome) a partir de 3'-O-metilguanosina;

La Figura 4 muestra un método ilustrativo de preparar 3'-O-metilguanosina 5'-fosforimidazolda (Im-pG^{3'}Ome) de pG^{3'}Ome;

La Figura 5 muestra un método ilustrativo de preparación de 3'-O-metilguanosina 5'-difosfato (ppG^{3'}Ome) de Im-

pG3'Ome,

La Figura 6 muestra un método ilustrativo para preparar 5-difosfato de 7-metil-3'-O-metilguanosina (pp^{7m}G3'Ome) de

La Figura 7 muestra un método ilustrativo para preparar imidazolidina de 7-metil-3'-O-metilguanosina 5-difosfato (Im-pp^{7m}G3'Ome) de pp^{7m}G3'Ome;

La Figura 8 muestra un procedimiento general para la preparación de pN_{2'-OR1}oligonucleótidos pN (R₁ = H o Me);

La Figura 9 muestra un procedimiento general para la síntesis de oligonucleótidos iniciadores con estructuras Cap 0, Cap 1 o Cap 2;

La Figura 10A muestra la estructura de cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza que se usan en ejemplos de acuerdo con la Fórmula I en donde: B₁ es guanina; M es 0; L es 1; q₁ a través de q₉ son 0; R₁ es H; R₂ es H; R₃ es O-metilo; X₁ es O; X₂ es O; X₁₃ es O; Y₁₃ es OH; Z₀ es O; Z₁ es O; Z₂ es O; Z₂₂ es O;

La Figura 10B muestra la estructura de cebadores oligonucleótidos con caperuza de iniciación usados en los ejemplos de acuerdo con la Fórmula I en donde: B₁ es guanina; B₁₀ es guanina; M es 0; L es 1; q₁ es 1; q₂ a través de q₉ son 0; R₁ es H; R₂ es H; R₃ es H; X₁ es O; X₂ es O; X₄ es O; X₁₃ es O; Y₁ es OH; Y₂ es OH; Y₄ es OH; Y₁₃ es OH; Z₀ es O; Z₁ es 0; Z₂ es 0; Z₄ es O; Z₅ es 0; Z₂₂ es O; R₄ es O-metilo;

La Figura 10C muestra la estructura de cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza usados en los ejemplos de acuerdo con la Fórmula I en donde: B₁ es guanina; B₁₀ es guanina; M es 0; L es 1; q₁ es 1; q₂ a través de q₉ son 0; R₁ es H; R₂ es H; R₃ es O-metilo; X₁ es O; X₂ es O; X₄ es 0; X₁₃ es 0; Y₁ es OH; Y₂ es OH; Y₄ es OH; Y₁₃ es OH; Z₀ es O; Z₁ es O; Z₂ es 0; Z₄ es O; Z₅ es O; Z₂₂ es 0; R₄ es O-metilo;

La Figura 10D muestra la estructura de cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza usados en los ejemplos de acuerdo con la Fórmula I en donde: B₁ es adenina; B₁₀ es guanina; M es 0; L es 1; q₁ es 1; q₂ a través de q₉ son 0; R₁ es H; R₂ es H; R₃ es H; X₁ es O; X₂ es O; X₄ es 0; X₁₃ es O; Y₁ es OH; Y₂ es OH; Y₄ es OH; Y₁₃ es OH; Z₀ es O; Z₁ es 0; Z₂ es 0; Z₄ es O; Z₅ es 0; Z₂₂ es O; R₄ es O-metilo;

La Figura 10E muestra la estructura de cebadores oligonucleótidos con caperuza de iniciación usados en los ejemplos de acuerdo con la Fórmula I en donde: B₁ es adenina; B₁₀ es guanina; M es 0; L es 1; q₁ es 1; q₂ a través de q₉ son 0; R₁ es H; R₂ es H; R₃ es O-metilo; X₁ es 0; X₂ es O; X₄ es 0; X₁₃ es 0; Y₁ es OH; Y₂ es OH; Y₄ es OH; Y₁₃ es OH; Z₀ es O; Z₁ es O; Z₂ es 0; Z₄ es O; Z₅ es O; Z₂₂ es 0; R₄ es O-metilo;

La Figura 10F muestra la estructura de cebadores oligonucleótidos con caperuza de iniciación usados en los ejemplos de acuerdo con la Fórmula I en donde: B₁ es citosina; B₁₀ es guanina; M es 0; L es 1; q₁ es 1; q₂ a través de q₉ son 0; R₁ es H; R₂ es H; R₃ es H; X₁ es O; X₂ es O; X₄ es O; X₁₃ es O; Y₁ es OH; Y₂ es OH; Y₄ es OH; Y₁₃ es OH; Z₀ es O; Z₁ es 0; Z₂ es 0; Z₄ es O; Z₅ es 0; Z₂₂ es O; R₄ es O-metilo;

La Figura 10G muestra la estructura de cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza usados en ejemplos de acuerdo con la Fórmula I en donde: B₁ es citosina; B₁₀ es guanina; M es 0; L es 1; q₁ es 1; q₂ a través de q₉ son 0; R₁ es H; R₂ es H; R₃ es O-metilo; X₁ es 0; X₂ es O; X₄ es 0; X₁₃ es 0; Y₁ es OH; Y₂ es OH; Y₄ es OH; Y₁₃ es OH; Z₀ es 0; Z₁ es O; Z₂ es 0; Z₄ es O; Z₅ es O; Z₂₂ es 0; R₄ es O-metilo;

La Figura 10H muestra la estructura de cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza usados en ejemplos de acuerdo con la Fórmula I en donde: B₁ es adenina; B₂ es guanina; B₁₀ es guanina; M es 0; L es 1; q₁ es 1; q₂ es 1; q₃ a través de q₉ son 0; R₁ es H; R₂ es H; R₃ es O-metilo; X₁ es O; X₂ es O; X₄ es O; X₅ es O; X₁₃ es O; Y₁ es OH; Y₂ es OH; Y₄ es OH; Y₅ es OH; Y₁₃ es OH; Z₀ es 0; Z₁ es 0; Z₂ es O; Z₄ es 0; Z₅ es O; Z₆ es O; Z₂₂ es 0; R₄ es O-metilo; R₅ es O-metilo;

La Figura 11 muestra la actividad luciferasa de los ARNm con adición cotranscripcional de caperuza;

Las Figuras 12A-12H muestran colectivamente la eficiencia de la adición de caperuzas de los ARNm con adición cotranscripcional de caperuza con 12A) ARCA, 12B) ^{m7}GpppG_{2'Ome}pG, 12C) ^{m7}G_{3'Ome}pppG_{2'Ome}pG, 12D) ^{m7}GpppA_{2'Ome}pG, 12E) ^{m7}G_{3'Ome}pppA_{2'-Ome}pG, 12F) ^{m7}GpppC_{2'Ome}pG, 12G) ^{m7}G_{3'Ome}pppC_{2'Ome}pG, 12H) ^{m7}G_{3'Ome}pppA_{2'Ome}pG_{2'Ome}pG. La eficiencia de la adición de caperuzas en las Figuras 12B-12G es igual o supera significativamente a la observada en la Figura 12A;

Las Figuras 13A-13D muestran colectivamente la eficacia de la adición de caperuzas y la fidelidad de la iniciación de los ARNm con adición cotranscripcional de caperuza ^{m7}GpppA_{2'Ome}pG en una plantilla de transcripción, en donde la Figura 13A ilustra el uso de residuos de 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en las posiciones de plantilla +1 y +2 mediante el uso de la formulación 2 de cebador/NTP; la Figura 13B ilustra el uso de residuos de 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en las posiciones de plantilla +1 y +2 mediante el uso de la formulación 3 de

cebador/NTP; la Figura 13C ilustra el uso de residuos de 2'-desoxicitidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2 mediante el uso de la formulación 2 de cebador/NTP; y la Figura 13D ilustra el uso de residuos de 2'-desoxicitidina en las posiciones de plantilla +1 y +2 mediante el uso de la formulación 3, y

- 5 Las Figuras 14A y 14B muestran colectivamente la comparación de la traducción en células THP-1 diferenciadas de ARNm elaborado con oligonucleótidos con caperuza de iniciación m7GpppA2'OmepG en una plantilla de transcripción con residuos de 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en las posiciones de plantilla +1 y +2 vs. una plantilla de transcripción con residuos de citidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2.

10 Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para un término en la presente descripción, prevalecerán las de esta sección.

- 15 Como se usa en la presente en relación con valores numéricos, el término "aproximadamente" o "aproximadamente" significa más o menos el 30 % del valor indicado, que incluye todos los valores dentro del intervalo definido, que incluye el valor declarado.

- 20 Como se usa en la presente descripción, los términos "ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refieren a un oligonucleótido, polinucleótido o cualquier fragmento de este, cualquier derivado de ribo o desoxirribo y a moléculas naturales o sintéticas que contienen naturales y/o residuos de nucleótidos modificados y enlaces internucleotídicos. Estas frases también se refieren al ADN o ARN de natural (*por ejemplo*, genómico) o de origen sintético que puede ser monocatenario, bicatenario, triple o tetracatenario y puede representar la hebra codificante o no codificante, o cualquier material similar al ADN o al ARN. Un "equivalente de ARN", en referencia a una secuencia de ADN, se compone de la misma secuencia lineal de nucleótidos que la secuencia de ADN de referencia, con la excepción de que todas o la mayoría de las ocurrencias de la base nitrogenada timina se reemplazan con uracilo, y la cadena principal del azúcar es compuesto de ribosa en lugar de 2'-desoxirribosa. Las cadenas principales de ácidos nucleicos alternativos adicionales adecuadas para los métodos y composiciones proporcionadas en la presente descripción incluyen pero no se limitan a fosforotioato, fosforoselenoato, alquilfosfotriéster, arilfosfotriéster, alquilfosfonato, arilfosfonato, fosfoboronato, ácido morfolinucleico (MNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

- 35 Como se usa en la presente, el término "cebador" o "cebador oligonucleotídico" se refiere a un ribo- o desoxirribo- o ribo/desoxirriboligonucleótido, monocatenario, puede ser de origen natural o sintético, y normalmente incluye una secuencia de entre aproximadamente 2 a aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 3 a aproximadamente 8 nucleótidos o aproximadamente 3 a aproximadamente 5 nucleótidos. Los cebadores oligonucleotídicos pueden contener uno o más grupos de modificación. Los cebadores oligonucleotídicos pueden incluir ARN, ADN y/u otros nucleósidos modificados. El experto en la materia es capaz de diseñar y preparar cebadores oligonucleotídicos que sean apropiados para la transcripción de la secuencia de la plantilla de ADN.

- 45 Como se usa en la presente, los términos "análogos de oligonucleótidos con caperuza de iniciación" o "cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza" se refieren a un cebador oligonucleotídico de iniciación que contiene Cap 0, Cap 1 o estructura TMG-Cap en el extremo 5' del cebador. El cebador con caperuza tiene un grupo 3'-OH abierto o sin modificar y puede extenderse por la ARN polimerasa mediante la incorporación de un NTP en el extremo 3' del cebador. Es capaz de iniciar la transcripción *in vitro* bajo el control de un promotor en un sistema de transcripción que contiene los componentes necesarios: Plantilla de ADN (por ejemplo, plásmido de ADN), ARN polimerasa, nucleósidos 5'-trifosfatos y tampón apropiado. También se usa en la presente descripción, "cebador de iniciación" o "cebador oligonucleotídico de iniciación" que se refiere a un oligonucleótido, que lleva un grupo 3'-OH terminal que es un sustrato válido para la ARN polimerasa. En ciertas realizaciones, el cebador oligonucleotídico de iniciación es un sustrato para la ARN polimerasa y puede elongarse mediante la incorporación de NTP en el extremo 3' del cebador. El cebador oligonucleotídico de iniciación es complementario a la plantilla de ADN en el sitio de iniciación.

- 55 Como se usa en la presente, el término "no sustituido" o "no modificado" en el contexto del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y NTP se refiere a un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y NTP que no se han modificado.

- Como se usa en la presente, el término "cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza modificado" se refiere a un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza que contiene uno o más grupos de modificación adicionales.

- 60 Como se usa en la presente, el término "grupo de modificación" se refiere a cualquier resto químico que pueda unirse al cebador de iniciación en ubicaciones, que incluyen, pero no se limitan a, el azúcar, la base nucleosídica, el puente trifosfato y/o el fosfato internucleotídico (*por ejemplo*, solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 20070281308). El grupo de modificación de un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza puede ser un grupo de cualquier naturaleza compatible con el proceso de transcripción.

- 65 Como se usa en la presente, el término "enlace internucleotídico" se refiere al enlace o enlaces que conectan dos

nucleósidos de un cebador oligonucleotídico o ácido nucleico y puede ser un enlace fosfodiéster natural o enlace modificado.

Como se usa en la presente, el término "identificador" o "identificador detectable" se refiere a cualquier compuesto o combinación de compuestos que pueden unirse o asociarse de cualquier otra manera con una molécula de modo que la molécula puede detectarse directa o indirectamente por la detección del identificador. Un identificador detectable puede ser un radioisótopo. (*por ejemplo*, carbono, fósforo, yodo, indio, azufre, tritio *etc.*), un isótopo de masa (*por ejemplo*, H², C¹³ o N¹⁵), un tinte o fluoróforo (*por ejemplo*, cianina, fluoresceína o cumarina), un hapteno (*por ejemplo*, biotina) o cualquier otro agente que pueda detectarse directa o indirectamente.

Como se usa en la presente, el término "hibridar" o "hibridar específicamente" se refiere a un proceso en el que el oligonucleótido con caperuza de iniciación se hibrida con una plantilla de ADN en condiciones apropiadamente estrictas durante una reacción de transcripción. Las hibridaciones con ADN se llevan a cabo con un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza que tiene una longitud de 3 nucleótidos, que incluye la estructura de caperuza invertida 5'-5'. Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son bien conocidas en la técnica. (*por ejemplo*, Sambrook, y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.(1989); Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J. (1994)).

Como se usa en la presente, el término "complemento", "complementario" o "complementariedad" en el contexto de un complejo de un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y una plantilla de ADN se refiere a las reglas estándar de emparejamiento de bases Watson/Crick. Por ejemplo, la secuencia "5'-AGTC-3'" es complementaria a la secuencia "3'-TCAG-5'". Ciertos nucleótidos no naturales o sintéticos pueden incluirse en los ácidos nucleicos descritos en la presente descripción; estos incluyen, pero no se limitan a nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados con base y azúcar, tales como inosina, 7-deazaguanosina, 2'-O-metilguanosina, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, pseudouridina, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). La complementariedad no necesita ser perfecta; los dúplex pueden contener pares de bases no apareados, nucleótidos degenerativos o no apareados. Los expertos en la técnica pueden determinar empíricamente la estabilidad del dúplex y consideran una serie de variables que incluyen, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición de bases y la secuencia del oligonucleótido, la incidencia de pares de bases mal emparejados, la fuerza iónica, los componentes del tampón de hibridación y las condiciones de la reacción.

La complementariedad puede ser "completa" o "total" cuando todas las bases de nucleótidos de dos hebras de ácido nucleico coinciden de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases reconocidas, puede ser "parcial" en el que solo algunas de las bases de nucleótidos de un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y un ADN objetivo se empareja de acuerdo con reglas de emparejamiento de bases reconocidas o puede estar "ausente" cuando ninguna de las bases de nucleótidos de dos cadenas de ácido nucleico se empareja de acuerdo con reglas de emparejamiento de bases reconocidas. El grado de complementariedad entre un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y una plantilla de ADN puede tener un efecto significativo sobre la fuerza de hibridación entre el oligonucleótido con caperuza de iniciación y la plantilla de ADN y, en consecuencia, la eficacia de la reacción. El término complementariedad también puede usarse en referencia a nucleótidos individuales. Por ejemplo, un nucleótido determinado dentro de un oligonucleótido puede destacarse por su complementariedad, o falta de esta, con un nucleótido dentro de otra hebra, en contraste o en comparación con la complementariedad entre el resto de un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y una hebra de ADN.

Como se usa en la presente, el término "completo", "total" o "perfectamente" complementario significa que cada una de las bases de nucleótidos de un cebador oligonucleotídico con caperuza iniciación y un ADN objetivo coinciden exactamente de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases reconocidas.

Como se usa en la presente, el término "sustancialmente complementario" se refiere a dos secuencias que se hibridan en condiciones rigurosas de hibridación. Los expertos en la técnica entenderán que las secuencias sustancialmente complementarias no necesitan hibridar a lo largo de toda su longitud. En particular, las secuencias sustancialmente complementarias pueden comprender una secuencia contigua de bases que no hibridan con una secuencia objetivo y pueden estar posicionadas 3' o 5' con una secuencia contigua de bases que hibridan en condiciones rigurosas de hibridación con la secuencia objetivo.

Como se usa en la presente, el término "específico" cuando se usa en referencia a una secuencia de cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y su capacidad para hibridar con una plantilla de ADN es una secuencia que tiene al menos 50 % de identidad de secuencia con una porción de la plantilla de ADN cuando se inicia el cebador oligonucleotídico con caperuza y la hebra de ADN están alineados. Los niveles más altos de identidad de secuencia que pueden ser preferidos incluyen al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % y lo más preferible 100 % de identidad de secuencia.

Como se usa en la presente, el término "nucleósido" incluye todos los nucleósidos de origen natural, incluidas todas las formas de bases nucleosídicas y furanosídicas que se encuentran en la naturaleza. Los anillos de base que se encuentran con mayor frecuencia en los nucleósidos naturales son los anillos de purina y pirimidina. Los anillos de purina de origen natural incluyen, por ejemplo, adenina, guanina y N⁶-metiladenina. Los anillos de pirimidina de origen

natural incluyen, por ejemplo, citosina, timina, 5-metilcitosina, pseudouracilo. Los nucleósidos de origen natural incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a derivados ribo, 2'-O-metil o 2'-desoxirribo de adenosina, guanosina, citidina, timidina, uridina, inosina, 7-metilguanosina o pseudouridina.

5 Como se usa en la presente, los términos "análogos de nucleósidos", "nucleósidos modificados" o "derivados de nucleósidos" incluyen nucleósidos sintéticos como se describe en la presente descripción. Los derivados de nucleósidos también incluyen nucleósidos que tienen restos de base y/y azúcar modificados, con o sin grupos protectores e incluyen, por ejemplo, 2'-desoxi-2'-fluorouridina, 5-fluorouridina y similares. Los compuestos y métodos descritos en la presente descripción incluyen tales anillos de base y análogos sintéticos de estos, así como también
10 azúcares de base sustituidos con heterociclo no naturales y azúcares de base sustituidos acíclicos. Otros derivados de nucleósidos que pueden ser útiles incluyen, por ejemplo, nucleósidos de LNA, purinas sustituidas con halógeno (*por ejemplo*, 6-fluoropurina), pirimidinas sustituidas con halógeno, N⁶-etiladenina, N⁴-(alquil)-citosinas, 5-etilcitosina y similares (patente de Estados Unidos núm. 6,762,298).

15 Como se usa en la presente, los términos "base universal", "base degenerada", "análogo de base universal" y "análogo de base degenerada" incluyen, por ejemplo, un análogo de nucleósido con una base artificial que, en ciertas realizaciones, es reconocible por la ARN polimerasa como sustituto de uno de los NTP naturales (*por ejemplo*, ATP, UTP, CTP y GTP) u otro NTP específico. Las bases universales o bases degeneradas se describen en Loakes, D., Nucleic Acids Res., 29: 2437-2447 (2001).; Crey-Desbiolles, C., y otros, Nucleic Acids Res., 33: 1532-1543 (2005);
20 Kincaid, K., y otros, Nucleic Acids Res., 33: 2620-2628 (2005); Preparata, FP, Oliver, JS, J. Comput. Biol. 753-765 (2004); y Hill, F., y otros, Proc Natl Acad. Sci. USA, 95:4258-4263 (1998)).

Como se usa en la presente, el término "NTP modificado" se refiere a un nucleósido 5'-trifosfato que tiene un grupo de resto químico unido en cualquier posición, que incluye el azúcar, la base, la cadena de trifosfato o cualquier
25 combinación de estas tres ubicaciones. Pueden encontrarse ejemplos de dichos NTP, por ejemplo, en "Nucleoside Triphosphates and Their Analogs: Chemistry, Biotechnology and Biological Applications," Vaghefi, M., ed., Taylor and Francis, Boca Raton (2005).

Como se usa en la presente, el término "oligonucleótido modificado" incluye, por ejemplo, un oligonucleótido que contiene un nucleósido modificado, un enlace internucleotídico modificado o que tiene cualquier combinación de
30 nucleósidos modificados y enlaces internucleotídicos. Ejemplos de modificaciones de enlaces internucleotídicos de oligonucleótidos que incluyen fosforioato, fosfotriéster y derivados de metilfosfonato (Stec, WJ y otros, Chem. En t. Ed. Inglés, 33: 709-722 (1994); Lebedev, AV y otros, E., Perspect. Drug Discov. Des., 4:17-40 (1996); y Zon, y otros, Solicitud de Patente de Estados Unidos núm. 20070281308). Otros ejemplos de modificaciones de enlaces internucleotídicos pueden encontrarse en Waldner y otros, Bioorg. Med. Chem. Letters 6: 2363-2366 (1996).

El término "promotor", como se usa en la presente, se refiere a una región de la plantilla de ADNdc que dirige y controla la iniciación de la transcripción de una secuencia determinada de ADN (por ejemplo, un gen). Los promotores están
40 ubicados en la misma hebra y cadena arriba en el ADN (hacia la región 5' de la hebra codificante). Típicamente, los promotores están inmediatamente adyacentes (o se solapan parcialmente) con la secuencia de ADN que se va a transcribir. Las posiciones de nucleótidos en el promotor se designan en relación con el sitio de inicio transcripcional, donde comienza la transcripción del ADN (posición +1). El cebador oligonucleotídico de iniciación es complementario al sitio de iniciación de la secuencia promotora (que, en ciertas realizaciones, está en las posiciones +1 y +2).

45 Como se usa en la presente, los términos "transcripción" o "reacción de transcripción" se refieren a métodos conocidos en la técnica para fabricar enzimáticamente el ARN que es complementario de la plantilla de ADN, de esta manera se produce el número de copias de ARN de una secuencia de ADN. La molécula de ARN sintetizada en la reacción de transcripción se llama "transcrito de ARN", "transcrito primario" o "transcrito". La reacción de transcripción que implica las composiciones y métodos proporcionados en la presente descripción emplea "iniciadores de oligonucleótidos con
50 caperuza". La transcripción de la plantilla de ADN puede ser exponencial, no lineal o lineal. Una plantilla de ADN puede ser un ADN lineal bicatenario, un ADN lineal parcialmente bicatenario, un ADN circular bicatenario, un plásmido de ADN, un amplicón de PCR, una plantilla de ácido nucleico modificado que es compatible con la ARN polimerasa.

Como se usa en la presente descripción, el término "acilo" denota el grupo -C(O)R^a, donde R^a es hidrógeno, alquilo inferior, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo y similares.
55

Como se usa en la presente descripción, el término "acilo sustituido" denota el grupo -C(O)R^{a'}, donde R^{a'} es alquilo inferior sustituido, cicloalquilo sustituido, heterociclilo sustituido, arilo sustituido, heteroarilo sustituido y similares.

60 Como se usa en la presente descripción, el término "aciloxi" denota el grupo -OC(O)R^b, donde R^b es hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y similares.

Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo" se refiere a una cadena de enlace simple de hidrocarburos que varía, en algunas realizaciones, de 1-20 átomos de carbono, y que varía en algunas realizaciones, de 1-8 átomos
65 de carbono; los ejemplos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo,

isoamilo, hexilo, octilo, dodecanilo y similares.

Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo inferior" se refiere a una cadena lineal o una cadena ramificada de hidrocarburos que varían, en algunas realizaciones, de 1-6 átomos de carbono, y que varían en algunas realizaciones de 2-5 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen etilo, propilo, isopropilo y similares.

Como se usa en la presente, el término "alquenilo" se refiere a un hidrocarbilo de cadena lineal o de cadena ramificada, que tiene uno o más dobles enlaces y, a menos que se especifique lo contrario, contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono, y en algunas realizaciones varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono y, en algunas realizaciones, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono, y en algunas realizaciones de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los ejemplos de radicales alquenilo incluyen vinilo, alilo, 1,4-butadienilo, isopropenilo y similares.

Como se usa en la presente, el término "alquenilarilo" se refiere a grupos arilo sustituidos con alquenilo y "alquenilarilo sustituido" se refiere a grupos alquenilarilo que portan además uno o más sustituyentes como se expone en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "alquenileno" se refiere a grupos hidrocarbilo divalentes de cadena lineal o de cadena ramificada que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono, y que contienen típicamente de 2-20 átomos de carbono, y que varían en algunas realizaciones de 2-12 átomos de carbono, y que varían en algunas realizaciones de 2-8 átomos de carbono, y "alquenileno sustituido" se refiere a grupos alquenileno que portan además uno o más sustituyentes como se expone en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "alquileo" se refiere a un grupo hidrocarbilo divalente que contiene de 1-20 átomos de carbono, y que varía en algunas realizaciones de 1-15 átomos de carbono, de cadena lineal o ramificada, de los cuales se toman dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de diferentes átomos de carbono. Los ejemplos de alquileo incluyen, pero no se limitan a, metileno ($-\text{CH}_2-$), etileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), y similares.

Como se usa en la presente, el término "alquinilo" se refiere a un hidrocarbilo de cadena lineal o de cadena ramificada, que tiene uno o más enlaces triples y contiene de aproximadamente 2-20 átomos de carbono, y en algunas realizaciones varía de aproximadamente 2-10 átomos de carbono, y, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 2-8 átomos de carbono y, en algunos ejemplos, entre aproximadamente 2-6 átomos de carbono. Los ejemplos de radicales alquinilo incluyen etinilo, propinilo (propargilo), butinilo y similares.

Como se usa en la presente, el término "alquilarilo alquinilo" se refiere a grupos arilo sustituidos con alquinilo y "alquilarilo alquinilo sustituido" se refiere a grupos alquilarilo alquinilo que portan además uno o más sustituyentes como se expone en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "alcoxi" denota el grupo $-\text{OR}^c$, donde R^c es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, heteroalquilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo o cicloheteroalquilo sustituido como se define.

Como se usa en la presente, el término "alcoxi inferior" denota el grupo $-\text{OR}^d$, donde R^d es alquilo inferior.

Como se usa en la presente, el término "alquilarilo" se refiere a grupos arilo sustituidos con alquilo y "alquilarilo sustituido" se refiere a grupos alquilarilo que portan además uno o más sustituyentes como se expone en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "alquiltio" se refiere al grupo $-\text{SR}^h$, donde R^h es alquilo.

Como se usa en la presente, el término "alquiltio sustituido" se refiere al grupo $-\text{SR}^i$, donde R^i es alquilo sustituido.

Como se usa en la presente, el término "alquinileno" se refiere a grupos hidrocarbilo divalentes de cadena lineal o de cadena ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, y que típicamente tienen en el intervalo de aproximadamente 2-12 átomos de carbono, y que varían en algunas realizaciones de aproximadamente 2-8 átomos de carbono, y "alquinileno sustituido" se refiere a grupos alquinileno que portan además uno o más sustituyentes como se expone en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "amido" denota el grupo $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^i\text{R}^j$, donde R^i y R^j puede ser independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido.

Como se usa en la presente, el término "amido sustituido" denota el grupo $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^k\text{R}^k$, donde R^k y R^k son independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido, siempre que al menos uno de R^k y R^k no sea hidrógeno. R^kR^k en combinación con el nitrógeno puede formar un anillo heterocíclico o heteroarilo opcionalmente sustituido.

Como se usa en la presente, el término "amino" o "amina" denota el grupo $-NR^nR^n$, donde R^n y R^n puede ser independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido como se define en la presente descripción. Una "amina divalente" denota el grupo $-NH-$. Una "amina divalente sustituida" indica el grupo $-NR-$ donde R es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido.

Como se usa en la presente, el término "amino sustituido" o "amina sustituida" denota el grupo $-NR^pR^p$, donde R^p y R^p son independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, siempre que al menos uno de R^p y R^p no sea hidrógeno. R^pR^p en combinación con el nitrógeno puede formar un anillo heterocíclico o heteroarilo opcionalmente sustituido.

Como se usa en la presente, el término "arilo" se refiere a especies de aril-carbonilo tales como benzoilo y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que portan además uno o más sustituyentes como se expone en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "arilo" solo o en combinación se refiere a fenilo, naftilo o heterocíclico aromático condensado opcionalmente con un cicloalquilo de 5-10 miembros del anillo, y en algunas realizaciones 5-6, miembros del anillo y/u opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos o sustituyentes de halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, aciloxi, ariloxi, heteroariloxi, amino opcionalmente mono o disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, amidino, urea opcionalmente sustituido con alquilo, arilo, grupos heteroarilo o heterocíclico, aminosulfonilo opcionalmente N-mono- o N, N-disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, o similares.

Como se usa en la presente, el término "ariloxi" denota el grupo $-OAr$, donde Ar es un arilo, o un grupo arilo sustituido.

Como se usa en la presente, el término "carbociclo" se refiere a un grupo saturado, insaturado o aromático que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados compuestos por átomos de carbono enlazados. El anillo o anillos pueden estar opcionalmente sin sustituir o sustituidos con, por ejemplo, halógeno, alquilo inferior, alcoxi, alquiltio, acetileno ($-C\equiv CH$), amino, amido, azido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, heteroarilo, heteroarilo sustituido, nitro ($-NO_2$), ciano ($-CN$), tiol ($-SH$), sulfamido ($-S(O)_2NH_2$), y similares.

Como se usa en la presente, el término "guanidinilo" denota el grupo $-N=C(NH_2)_2$ y "guanidinilo sustituido" indica el grupo $-N=C(NR_2)_2$, donde cada R es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido como se expone en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "halo" o "halógeno" se refiere a todos los halógenos, *es decir*, cloro (Cl), flúor (F), bromo (Br) y yodo (I).

Como se usa en la presente, el término "heteroarilo" se refiere a una estructura de anillo aromático monocíclico que contiene 5 o 6 átomos en el anillo, o un grupo aromático bicíclico que tiene 8-10 átomos, que contiene uno o más, y en algunas realizaciones 1-4, y en algunas realizaciones 1-3, y en algunas realizaciones 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente del grupo O, S y N, y opcionalmente sustituidos con 1-3 grupos o sustituyentes de halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, aciloxi, ariloxi, heteroariloxi, amino opcionalmente mono o disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, amidino, urea opcionalmente sustituido con grupos alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico, aminosulfonilo opcionalmente N-mono o N, N disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino o similares. También se pretende que heteroarilo incluya S o N oxidado, tales como sulfonilo, sulfonilo y N-óxido de un nitrógeno de anillo terciario. Un átomo de carbono o nitrógeno es el punto de unión de la estructura del anillo heteroarilo de manera que se retiene un anillo aromático estable. Ejemplos de grupos heteroarilo son ftalimida, piridinilo, piridazinilo, pirazinilo, quinazolinilo, purinilo, indolilo, quinolinilo, pirimidinilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, tienilo, isoxazolilo, oxatiadiazolilo, isotiazolilo, tetracilo, imidazolilo, triazinilo, furanilo, benzofurilo, indolilo y similares. Un heteroarilo sustituido contiene un sustituyente unido a un carbono o nitrógeno disponible para producir un compuesto estable.

Como se usa en la presente, el término "heteroarilo sustituido" se refiere a un heterociclo opcionalmente mono o poli sustituido con uno o más grupos funcionales, por ejemplo, halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, heterociclo sustituido, hetarilo, hetarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

Como se usa en la presente, el término "heterociclo" se refiere a un grupo saturado, insaturado o aromático que tiene un solo anillo (*por ejemplo*, morfolino, piridilo o furilo) o múltiples anillos condensados (*por ejemplo*, naftpiridilo, quinoxalilo, quinolinilo, indolizínilo o benzo[b]tienilo) y que tienen átomos de carbono y al menos un heteroátomo, tales como N, O o S, dentro del anillo, que opcionalmente puede estar sin sustituir o sustituido con, *por ejemplo*, halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, hetarilo, hetarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

Como se usa en la presente descripción, el término "heterociclo sustituido" se refiere a un heterociclo sustituido con 1 o más, *por ejemplo*, 1, 2 o 3, sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, aciloxi, arilo, arilo sustituido, ariloxi, heteroariloxi, amino, amido, amidino, urea opcionalmente sustituido con grupos alquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo, aminosulfonilo opcionalmente N-mono o N, N-disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, acilo, carboxilo, heterociclo, heterociclo sustituido, heterarilo, heterarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfonamido y oxo, unidos en cualquier punto disponible para producir un compuesto estable.

Como se usa en la presente, el término "hidrocarbilo" se refiere a cualquier radical orgánico en el que la cadena principal de este comprende carbono e hidrógeno solamente. Así, hidrocarbilo abarca alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, arilalquenilo, alquenilarilo, arilalquinilo, alquinilarilo y similares.

Como se usa en la presente, el término "hidrocarbilo sustituido" se refiere a cualquiera de los grupos hidrocarbilo mencionados que portan además uno o más sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, ariltio, ariltio sustituido, amino, alquilamino, sustituido alquilamino, carboxi, -C(S)SR, -C(O)SR, -C(S)NR₂, donde cada R es independientemente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, nitro, ciano, halo, -SO₃M o -OSO₃M, donde M es H, Na, K, Zn, Ca o meglumina, guanidinilo, guanidinilo sustituido, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo sustituido, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo sustituido, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo sustituido, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo sustituido, heterocíclico, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroarilcarbonilo, heteroarilcarbonilo sustituido, carbamoilo, monoalquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, un grupo carbamato, un grupo ditiocarbamato, aroilo, aroilo sustituido, organosulfonilo, alquilsulfonilo sustituido, alquil sulfonil amino sustituido, alquil-alquilsulfino sustituido arilsulfonilamino sustituido, un grupo sulfonamida, sulfurilo y similares, incluidos dos o más de los grupos descritos anteriormente unidos al resto hidrocarbilo mediante restos enlazador/espaciador como -O-, -S-, -NR-, donde R es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, -C(O)-, -C(S)-, -C(=NR')-, -C(=CR'2)-, donde R 'es alquilo o alquilo sustituido, -OC(O)-, -OC(O)-O-, -OC(O)-NR- (o -NR-C(O)-O-), -NR-C(O)-, -NR-C(O)-NR-, -SC(O)-, -SC(O)-O-, -SC(O)-NR-, -O-S(O)₂-, -OS(O)₂-O-, -OS(O)₂-NR-, -OS(O)-, -OS(O)-O-, -OS(O)-NR-, -O-NR-C(O)-, -O-NR-C(O)-O-, -O-NR-C(O)-NR-, -NR-OC(O)-, -NR-OC(O)-O-, -NR-OC(O)-NR-, -O-NR-C(S)-, -O-NR-C(S)-O-, -O-NR-C(S)-NR-, -NR-OC(S)-, -NR-OC(S)-O-, -NR-OC(S)-NR-, -OC(S)-, -OC(S)-O-, -OC(S)-NR- (o -NR-C(S)-O-), -NR-C(S)-, -NR-C(S)-NR-, -SS(O)₂-, -SS(O)₂-O-, -SS(O)₂-NR-, -NR-OS(O)-, -NR-OS(O)-O-, -NR-OS(O)-NR-, -NR-OS(O)₂-, -NR-OS(O)₂-O-, -NR-OS(O)₂-NR-, -O-NR-S(O)-, -O-NR-S(O)-O-, -O-NR-S(O)-NR-, -O-NR-S(O)₂O-, -O-NR-S(O)₂-NR-, -O-NR-S(O)₂-, -OP(O)R₂, -SP(O)R₂, o -NR-P(O)R₂, donde cada R es independientemente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido y similares.

Como se usa en la presente, el término "hidroxilo" o "hidroxilo" se refiere al grupo -OH.

Como se usa en la presente, el término "oxo" se refiere a un sustituyente de oxígeno con doble enlace al carbono unido.

Como se usa en la presente, el término "sulfonilo" denota el grupo -S(O)-.

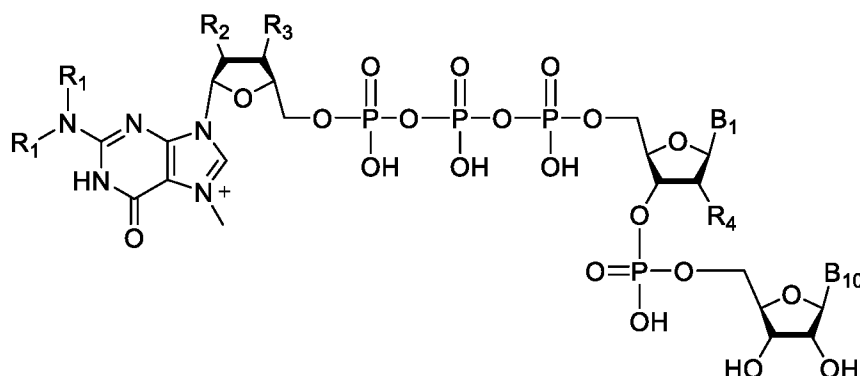
Como se usa en la presente, el término "sulfonilo sustituido" denota el grupo -S(O)R^t, donde R^t es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heterocicilalquilo, heterocicilalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo sustituido o heteroarilo sustituido.

Como se usa en la presente, el término "sulfonilo" denota el grupo -S(O)₂-.

Como se usa en la presente, el término "sulfonilo sustituido" denota el grupo -S(O)₂R^t, donde R^t es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heterocicilalquilo, heterocicilalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo sustituido o heteroarilo sustituido.

Como se usa en la presente, el término "sulfurilo" denota el grupo -S(O)₂-.

La presente solicitud describe métodos y composiciones para sintetizar ARN con caperuza 5' en donde los que los cebadores oligonucleótidos con caperuza de iniciación tienen la forma general ^{m7}Gppp[N2 ome]n[N]m en donde ^{m7}G es guanosina metilada en N7 o cualquier análogo de guanosina, N es cualquier nucleósido natural, modificado o no natural "n" puede ser cualquier número entero de 1 a 4 y "m" puede ser un número entero de 1 a 9. En un aspecto la invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



en donde

- B₁ es guanina;
 B₁₀ es una base nucleosídica natural;
 R₁ es H o metilo;
 R₂ y R₃ son independientemente H, OH, alquilo, O-alquilo o halógeno; y
 R₄ es H, OH u O-metilo.

Los compuestos de Fórmula I son útiles como cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza.

El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza es un trímero ($q^2 - q^9 = 0$). En la Tabla I a continuación se presentan varios ejemplos de los cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza triméricos:

Tabla 1

SEQ ID NO.	Secuencia del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza
9	m ⁷ GpppGpA
10	m ⁷ GpppGpC
11	m ⁷ GpppGpG
12	m ⁷ GpppGpU
25	m ⁷ G ^{3'} OmepppGpA
26	m ⁷ G ^{3'} OmepppGpC
27	m ⁷ G ^{3'} OmepppGpG
28	m ⁷ G ^{3'} OmepppGpU
41	m ⁷ G ^{3'} OmepppG ^{2'} OmepA
42	m ⁷ G ^{3'} OmepppG ^{2'} OmepC
43	m ⁷ G ^{3'} OmepppG ^{2'} OmepG
44	m ⁷ G ^{3'} OmepppG ^{2'} OmepU
57	m ⁷ GpppG ^{2'} OmepA
58	m ⁷ GpppG ^{2'} OmepC
59	m ⁷ GpppG ^{2'} OmepG
60	m ⁷ GpppG ^{2'} OmepU

Otros cebadores oligonucleótidos con caperuza de iniciación descritos en la presente descripción incluyen aquellos cebadores que tienen análogos de bases conocidos o nuevos. Los métodos para sintetizar - los cebadores oligonucleotídicos con caperuza se ejemplifican en los ejemplos más abajo.

Transcripción

En eucariotas, la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm) se realiza mediante la ARN polimerasa II. Esta es una enzima compleja de múltiples subunidades con una regulación compleja. Para realizar transcripciones a gran escala *in vitro*, en las investigaciones se usan comúnmente polimerasas de fagos de una sola subunidad derivadas de los bacteriófagos T7, T3, SP6, K1-5, K1E, K1F o K11. Esta familia de polimerasas tiene secuencias promotoras simples y mínimas de ~17 nucleótidos que no requieren proteínas accesorias y tienen limitaciones mínimas de la secuencia de nucleótidos de iniciación. Si bien esta solicitud se centra en la ARN polimerasa de T7 (T7 ARNP), un experto en la técnica entendería que los métodos descritos en el presente documento podrían practicarse con otras ARN polimerasas.

T7 ARNP existe en al menos dos estados proteicos. El primero se refiere como "complejo abortivo" y se asocia con la iniciación transcripcional. La segunda es una conformación muy procesada llamada "complejo de elongación". *In vitro* la transcripción puede dividirse en seis pasos: 1) unión de la ARN polimerasa a la secuencia promotora, 2) iniciación

de la transcripción, 3) elongación no progresiva denominada transcripción abortiva durante la cual la polimerasa frecuentemente libera la plantilla de ADN y transcritos abortivos cortos 4) conversión del complejo abierto en cerrado complejo, 5) elongación progresiva y 6) terminación transcripcional. Una cantidad significativa de ARN producido durante la transcripción consiste en fragmentos abortivos cortos de ~ 2-8 nucleótidos de longitud (Biochemistry 19:3245-3253 (1980); Nucleic Acids Res. 9:31-45 (1981); Nucleic Acids Res. 15:8783-8798 (1987); Biochemistry 27:3966-3974 (1988)). Después de la síntesis de aproximadamente 10-14 bases, las ARN polimerasas escapan del ciclo abortivo, al mismo tiempo que pierden los contactos específicos de secuencia con el promotor de ADN y forman un complejo de elongación progresiva, en el que la cadena de ARN se extiende independientemente de la secuencia. (J. Mol. Biol. 183:165-177(1985); Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83:3614-3618(1986); Mol. Cell Biol. 7:3371-3379 (1987)).

La secuencia consenso para los promotores T7 de clase III más activos abarca 17 pb de secuencia cadena arriba y 6 pb cadena abajo, del sitio de inicio de la transcripción (Cell 16:815-25. (1979)). La posición del primer nucleótido transcrito se refiere comúnmente como el nucleótido del transcrito +1 del ARN, el segundo nucleótido transcrito como nucleótido del transcrito +2 y así sucesivamente (Tabla 2). Durante la transcripción, las dos cadenas se funden para formar una burbuja de transcripción y la hebra de la parte inferior del dúplex (mostrada de 3' a 5' en la Tabla 2) es la plantilla para la transcripción. Para los nucleótidos de transcrito +3 y posteriores, la hebra plantilla define la identidad de los nucleótidos transcritos principalmente a través de interacciones de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Aquí, el nucleótido que codifica el primer nucleótido del transcrito de ARN se define como el nucleótido +1 de la plantilla. En el ejemplo que se muestra en la Tabla 2, el nucleótido del transcrito +1 es G y el nucleótido de plantilla +1 es C. Asimismo, el nucleótido del transcrito +4 es A y el nucleótido de plantilla +4 es T.

Tabla 2

Posición en el transcrito	5' → 3'	SEQ ID NO. 49
Secuencia del transcrito	pppGGGAGA	
Hebra superior del promotor	5' → 3'	SEQ ID NO. 50
Hebra inferior del promotor	3' → 5'	SEQ ID NO. 51
Posición en plantilla	3' → 5'	

A diferencia de las ADN polimerasas, T7 ARNP inicia la síntesis de ARN en ausencia de un cebador. El primer etapa en la iniciación se llama síntesis de novo de ARN, en el que la ARN polimerasa reconoce una secuencia específica en la plantilla de ADN, selecciona el primer par de nucleótidos trifosfatos complementarios a los residuos de la plantilla en las posiciones +1 y +2, y cataliza la formación de un enlace fosfodiéster para formar un dinucleótido. Los nucleótidos de iniciación tienen menos afinidades por la polimerasa que los usados durante la elongación. El valor de Kd es 2 mM para el primer NTP de iniciación y 80 µM para el segundo, mientras que el valor de Kd es aproximadamente 5 µM para los NTP durante la elongación (J. Mol. Biol. (2007) 370, 256-268). Se ha descubierto que la síntesis de novo es la etapa limitante de la velocidad durante la transcripción. T7 ARNP exhibe un fuerte sesgo para GTP como el nucleótido de iniciación (J. Biol. Chem. 248: 2235-2244 (1973)). Entre los 17 promotores de T7 en el genoma, 15 se inician con GTP (y 13 con pppGpG), mientras que no hay una preferencia obvia de NTP durante la elongación de la transcripción (J. Mol. Biol. 370: 256-268 (2007)). La ARN polimerasa de T7 se inicia con dificultad en los promotores que codifican A en la posición +1; la transcripción, en cambio, se inicia predominantemente con una G codificada en la posición +2 (J. Biol. Chem. 278: 2819-2823 (2003)).

Durante la síntesis *de novo* de ARN, la unión de los nucleótidos de iniciación se logra principalmente mediante la energía libre que se crea a partir del apilamiento de bases, las interacciones específicas entre los residuos de polimerasa, los restos de guanina de los nucleótidos de iniciación y las interacciones de complementariedad de bases (J. Mol. Biol. 370: 256-268 (2007)).

Se sabe que T7 ARNP también puede iniciarse con cebadores oligonucleótidos cortos. Por ejemplo, se sabe que 13 promotores en el genoma de T7 se inician con pppGpG (J. Mol. Biol. 370: 256-268 (2007)). Varios grupos demostraron que T7 ARNP puede iniciarse a partir de cebadores de dinucleótidos (Biochemistry 24:5716-5723 (1985)). Axelrod y otros mostraron que un dinucleótido GpA sin caperuza podía iniciarse a partir de nucleótidos de plantilla +1 y +2 que eran 2'-desoxicitidina y 2'-desoxitimidina, respectivamente (plantilla "CT") Sus condiciones de reacción fueron 200 micromolar (µM) de dímero y 100 µM de ATP, CTP, GTP y UTP. Su mezcla de reacción también contenía 100 µM de 3' dATP, 3' dCTP 3' dUTP o 50 µM de 3' dGTP. Ellos solo observaron ARN iniciados por GpA y no una mezcla de ARN iniciados por GpA y ARN trifosfato 5' de iniciación por GTP. Es probable que esto se deba a las condiciones de reacción empleadas. 100 µM de GTP está muy por debajo de la Kd de 2 mM de la T7 polimerasa para la primera guanosina de iniciación (J. Mol. Biol. (2007) 370, 256-268). Dado que GTP compite por la iniciación con el oligonucleótido de iniciación, mediante el uso de una concentración baja de GTP que favorece la iniciación de GpA pero da como resultado un bajo rendimiento de transcripción (el rendimiento máximo calculado se estima en <150 µg/ml de reacción). Al iniciar la transcripción en la plantilla "CT" con ApG, CpG, UpG o GpG, observaron la formación de transcritos de ARN con un nucleótido 5' adicional sin plantilla (A, C, U o G, respectivamente).

Axelrod y *otros* también usaron dinucleótido GpG sin caperuza para iniciar la síntesis de ARN en un promotor donde los nucleótidos de plantilla +1 y +2 eran 2'-desoxicitidinas (plantilla "CC"). *Ellos observaron* baja fidelidad de iniciación y observaron tres productos de transcripción diferentes. Afirman: "Un examen de la autorradiografía *indica* que un miembro de cada triplete resultó de la iniciación con GpG en la posición normal (+1), el segundo miembro de cada triplete resultó de la iniciación con GpG en la posición anormal (-1), y el tercer miembro de cada triplete resultó de la iniciación con trifosfato de guanosina en la posición normal. Por lo tanto, GpG es un iniciador relativamente débil con el promotor ϕ 10 (plantilla "CC"), así como también con el promotor ϕ 1.1A (plantilla "CT"), y es incapaz de impedir la iniciación normal con trifosfato de guanosina a la concentración que se utilizó." No observaron iniciación con un dinucleótido GpA con promotor ϕ 10 (plantilla "CC"). CpA, ApC y ApA no sirvieron como iniciadores en ninguno de las plantillas "TC" y "CC" anteriores, presumiblemente porque estos no pueden hibridar con los nucleótidos de plantilla en las posiciones +1 y +2. El método descrito por Axelrod y *otros* fue diseñado para la producción de cantidades muy pequeñas de transcritos radiactivos para la secuenciación y no es adecuado para la producción a gran escala de cantidades farmacéuticas útiles de ARN. Si se usaran concentraciones más grandes (~ 5 mM) del dímero de iniciación y NTP, incluido GTP, para aumentar el rendimiento de ARN, el resultado esperado es una baja proporción de ARN que comienza con el dímero de iniciación, ya que GTP compite de manera eficiente con el dímero por la iniciación a partir del +1 nucleótidos a concentraciones de NTP más cercanas al Kd (2 mM), y se produce una gran proporción de ARN que comienza con pppG.

Pitulle y *otros* mostraron que la transcripción con T7 ARNP podría iniciarse con oligonucleótidos sin caperuza (2-mer a 6-mer) (Gene, 112: 101-105 (1992)). Estos oligonucleótidos tenían un 5'-OH o un 5' monofosfato. También iniciaron la transcripción con un oligonucleótido de estructura Biotina-ApG. Todos los oligonucleótidos usados en este estudio contenían un G en el terminal 3'. Pitulle y *otros* también mostraron que los residuos 2'-O-metilo y los residuos desoxi podrían incluirse dentro de la secuencia del cebador para producir transcritos de ARN con residuos 2'-O-metilados o 2'-desoxi en o cerca del extremo 5' del ARN. Está claro en esta publicación, que el residuo de guanosina en el terminal 3' de cualquier oligonucleótido de iniciación se emparejó con el nucleótido de plantilla +1. Esto da como resultado que nucleótidos sin plantilla se añadan al extremo 5' del ARN transcrito. Específicamente, los autores afirman que "También las variaciones de secuencia en este segmento son fácilmente posibles, ya que no se requiere ningún emparejamiento de bases con el ADN plantilla, aparte de la G del terminal Y." Por tanto, todos los cebadores oligonucleótidos de iniciación son complementarios sólo al nucleótido "C" de plantilla en la posición +1 y no a ningún nucleótido en las posiciones siguientes (+2, +3, etc.). Esto se confirma en artículos de métodos posteriores de este grupo (Methods Mol Biol. 74: 99-110 (1997), Methods Mol. Biol. 252: 9-17, (2004)). Sus métodos difieren del método descrito en la presente descripción en el que todos los nucleótidos del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza son completamente complementarios a los nucleótidos de plantilla en las posiciones +1 y siguientes. Kleineidam y *otros* crearon transcritos de ARNt modificado en 5' mediante la iniciación con dímeros o trímeros que se modificaron con azúcares 2'-desoxi o 2'-O-metilo (Nucleic Acids Research 21:1097-1101 (1993)). De nuevo, los autores afirman que la guanosina del extremo 3' del cebador se inicia en el nucleótido "C" de plantilla +1.

Otro estudio de Ishikawa y *otros* mostraron que los trímeros de oligonucleótidos de iniciación con caperuza de la estructura $m^7GpppApG$, $m^7Gppp^{m6}ApG$, $m^7GpppA^{2'O}pG$ o $m^7Gppp^{m6}A^{2'O}pG$ podría iniciar la transcripción en la plantilla con residuos de 2'-desoxicitidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2 (plantilla "CC"; Nucleic Acids Symposium Series No. 53: 129 (2009)). Los autores afirman: "El resultado diferente del caso del uso de $m^7G5'pppG$ puede deberse al apareamiento de bases entre adenosina (N1) adicional en $m^7G5'pppN1pG$ y 2'-desoxitimidina en el promotor T7 en la posición -1." Este método difiere claramente del método descrito en la presente descripción en el que los nucleótidos +1 y +2 del trímero de oligonucleótidos con caperuza de iniciación se emparejan con el +1 y +2 de los nucleótidos de plantilla. Ishikawa y *otros* usaron 6 mM de un trímero de oligonucleotídico de iniciación, 0,9 mM de GTP y 7,5 mM de ATP, CTP y UTP. Los autores usaron un exceso de más de 6 veces del cebador oligonucleotídico de iniciación con caperuza, el componente nucleotídico más caro de la reacción de transcripción, sobre el GTP competidor para impulsar la reacción de transcripción hacia ARN con caperuza sobre pppARN, lo que aumenta el coste total del ARN sintetizado. Por otro lado, una concentración baja de GTP (0,9 mM) limita el rendimiento total del ARN en la reacción de transcripción (teóricamente a menos de 1,4 mg/ml). Por el contrario, el método descrito en la presente descripción no requiere restringir la concentración de ningún NTP para lograr tanto una adición de caperuza eficiente del ARN como un mayor rendimiento de ARN (2 a 6 mg/ml) y permitir así una producción de ARNm de alta calidad a un coste comercialmente útil.

Ninguna de las publicaciones discutidas anteriormente midió directamente la eficiencia de la adición de caperuzas al ARN, por lo que se desconoce el alcance de la adición de caperuzas en esos estudios.

Es importante destacar que, en todos los estudios descritos anteriormente, el nucleótido de plantilla +1 es 2'-desoxicitidina (Biochemistry 24:5716-5723 (1985), Gene, 112:101-105 (1992), Methods Mol. Biol. 74: 99-110 (1997), Methods Mol. Biol. 252:9-17, (2004), Nucleic Acids Research 21:1097-1101 (1993), Nucleic Acids Symposium Series No. 53: 129 (2009)).

En más de 20 años desde la publicación de los estudios de iniciación de la transcripción con cebadores oligonucleotídicos, no se han publicado ejemplos de iniciación de la transcripción con cebadores oligonucleotídicos iniciadores que contengan estructuras de cap invertida de 5' a 5' hasta una publicación de un breve informe en Nucleic

Acids Symposium Series No. 53: 129 (2009).

Los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción para la preparación de ARN con caperuza 5' incluyen, pero no se limitan a, ARNm, ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN nucleolar pequeño (ARNnop), ARN específico de cuerpo de cajal pequeño (ARNcc). Estos métodos implican el uso de un Cap que contiene cebadores oligonucleotídicos, nucleósidos 5'-trifosfatos (NTP) y ARN polimerasa para la síntesis de ARN controlada por el promotor y la plantilla de ADN. Los métodos descritos en el presente documento normalmente usan un cebador oligonucleotídico con caperuza que proporciona utilidad en la síntesis de ARN, en particular síntesis de ARNm con caperuza. El cebador oligonucleotídico de iniciación tiene una estructura que se asemeja a Cap 0, Cap 1 o TMG-Cap de moléculas de ARN naturales, que incluyen unidades de nucleósidos 2'-O-metilados en las posiciones 5' Cap 1 penúltimas del ARN. La estructura natural de Cap 0 no tiene unidades de nucleósidos 2'-O-metilados.

Los métodos y composiciones para la preparación de ARN, que incluyen, pero no se limita a, ARNm, ARNnp, ARNnop, ARNcc, ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr) y ARN mensajero de transferencia (ARNtm) que llevan modificaciones en o cerca del extremo 5' de la molécula. Estos métodos implican el uso de cebadores oligonucleotídicos iniciadores con o sin Cap, nucleósidos 5'-trifosfatos (NTP) y ARN polimerasa para la síntesis de ARN controlada por el promotor y la plantilla de ADN. Los métodos pueden usar un cebador oligonucleotídico de iniciación modificado que lleve modificaciones estructurales que proporcionen utilidad en la síntesis de ARN; en particular síntesis de ARN modificados en el 5'.

El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza tiene un grupo 3'-OH abierto que permite el inicio de la síntesis de ARN mediada por ARN polimerasa en una plantilla de ADN mediante la adición de unidades de nucleótidos al extremo 3' del cebador. El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza es sustancialmente complementario a la secuencia de ADN de plantilla en el sitio de inicio de la transcripción (*es decir*, el sitio de iniciación está ubicado más cerca del extremo 3' de una secuencia promotora y puede solaparse con la secuencia promotora). El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza puede dirigir la síntesis de ARN predominantemente en una dirección ("directa") que comienza en el extremo 3' del cebador. El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza puede competir con cualquier nucleósido 5'-trifosfato para el inicio de la síntesis de ARN, de esta manera se maximiza la producción del ARN que comienza con el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y se minimiza la producción de ARN que comienza con 5'-trifosfato-nucleósido (típicamente GTP).

La fabricación de ARNm por transcripción *in vitro* utiliza ARN polimerasas de fagos altamente activas (T3, T7, SP6 y otras). La ARN polimerasa funciona bajo el control de un promotor específico que se incorpora en la construcción del plásmido de ADN frente a una secuencia de nucleótidos de plantilla. El proceso de transcripción generalmente comienza con el nucleósido de purina 5'-trifosfato (típicamente GTP) y continúa hasta que la ARN polimerasa encuentra una secuencia de terminación o completa la plantilla de ADN.

Como se discutió anteriormente, los análogos de dinucleótidos mCAP, $^{7m}G(5')ppp(5')N$, que contienen Cap 0 se han usado para la iniciación *in vitro* de la transcripción *por ejemplo*, RNA 1: 957-967 (1995)). Las moléculas de ARN con caperuza producidas mediante el uso de estos análogos de dinucleótidos que contienen Cap 0. Sin embargo, solo alrededor del 50 % de las moléculas de ARN con caperuza sintetizadas tienen la orientación "directa" correcta de Cap 0. Para convertir ARN con Cap 0 en ARN con Cap 1, se debe realizar una reacción enzimática adicional mediante el uso de la (nucleósido-2'-O) metiltransferasa. Sin embargo, esta conversión no puede ser cuantitativa; no es fácil de controlar y es difícil separar los ARN Cap 0 restantes de los ARN Cap 1. Además, la competencia de los NTP (específicamente GTP) por la iniciación de la transcripción reduce aún más la cantidad de moléculas activas de ARN con caperuza producidas.

Además, los análogos de dinucleótidos modificados, tales como $^{7m}G_{3'Ome}(5')ppp(5')N$ y otros análogos ARCA relacionados, que llevan modificados el residuo ^{7m}G con la posición 3' y/o 2' bloqueada en la ribosa, se han usado para la iniciación *in vitro* de la transcripción *por ejemplo*, RNA 7: 1486-1495 (2001)). Estos análogos de la cap de ARCA dirigen la síntesis de ARN solo en la orientación "directa" y, por lo tanto, producen una molécula de ARN con la capa 0 (natural) en el extremo 5' (que tiene modificaciones 2' y/o 3' para el residuo ^{7m}G). Dichos ARN son más activos en los sistemas de traducción en comparación con los ARN preparados mediante el uso de análogos de dinucleótidos estándar, $^{7m}G(5')ppp(5')N$. Para convertir ARN con ARCA Cap 0 en ARN con ARCA Cap 1, se debe realizar una reacción enzimática adicional con (nucleósido-2'-O) metiltransferasa similar a la requerida para los análogos de dinucleótidos discutidos anteriormente. Este método tiene las mismas desventajas que el elaborado para los análogos de dinucleótidos mCAP; la conversión de ARN con Cap 0 en ARN con ARCA Cap 1 no puede ser cuantitativa; la reacción no es fácil de controlar, es difícil separar los ARN de Cap 0 restantes de los ARN de Cap 1 y la competencia de los NTP (específicamente GTP) para el inicio de la transcripción reduce aún más la cantidad de moléculas activas de ARN con caperuza producidas.

Se han utilizado cebadores oligonucleotídicos cortos (2 a 6-mer) con residuo de guanosina 3'-terminal para la iniciación de la transcripción *in vitro* Pitulle, C. y otros, Gene, 112: 101-105 (1992)). Estos cebadores oligonucleotídicos contenían residuos de ribonucleósidos modificados y no modificados (*por ejemplo*, los residuos de ribonucleósidos modificados incluían residuos de nucleósidos 2'-O-metilados y residuos 2'-desoxirribonucleósidos). Los cebadores oligonucleotídicos más cortos (dímeros a tetrámeros) superan sustancialmente a GTP en el inicio de la transcripción, mientras que los

cebadores más largos (pentámero a hexámero) son mucho menos eficaces en el inicio de la transcripción en comparación con GTP. Puede deberse a que estos cebadores más largos (tal como se diseñaron) tienen un porcentaje bajo de complementariedad con la plantilla de ADN en el sitio de iniciación. Por el contrario, el dímero AG (como se diseñó) fue complementario a la plantilla de ADN en el sitio de iniciación. Las moléculas de ARN producidas mediante el uso de cebadores oligonucleotídicos, discutidas en esta sección, tenían nucleósido 2'-O-metilado interno pero no contenían 5'-Cap 0, Cap1, Cap 2 o TMG-cap. Para convertir el ARN sin estructura de cap en el ARN con estructura de Cap 1, Cap 2 o TMG-cap, tendrían que realizarse reacciones enzimáticas adicionales mediante el uso de enzimas de adición de caperuzas. Sin embargo, dicha conversión tiene las mismas desventajas que las mencionadas anteriormente.

Se han preparado químicamente otros oligonucleótidos de ARN cortos que contienen estructuras de cap y residuos de nucleósidos metilados en 2'-O-internos (Ohkubo y otros, Org. Letters 15:4386-4389 (2013)). Estos oligonucleótidos cortos con caperuza se ligaron con un fragmento "decapitado" (sin estructura de caperuza 5') de ARN largo mediante el uso de ligasa de T4 y un oligonucleótido escindido de ADN complementario. El ARN final sintetizado mediante el uso de este método químico-enzimático tenía tanto residuos nucleósidos internos 2'-O-metilados como una estructura de 5'-TMG-cap. Sin embargo, solo se prepararon ARN cortos con caperuza (<200-mer) mediante el uso de este enfoque de ligación. Además, los rendimientos fueron bajos (15-30 %). No es fácil controlar y optimizar la reacción de ligación del ADN de T4 y requiere un laborioso proceso de separación mediante el uso de la electroforesis en gel de poliacrilamida y el aislamiento de los ARN con caperuza de los restantes ARN abiertos. No es factible la separación de ARNm largos (500 -10 000 bases) con caperuza de los ARNm restantes sin caperuza mediante el método PAGE.

Finalmente, el nucleósido modificado en 5' o el mononucleótido modificado en 5' o el dinucleótido modificado en 5', típicamente un derivado de la guanosina, se han usado para la iniciación *in vitro* de la transcripción de ARN (Gene, 112: 101-105 (1992)) y Bioconjug. Chem., 10371-378 (1999)). Estos nucleósidos y nucleótidos iniciadores pueden llevar marcadores o grupos de afinidad (por ejemplo, biotina) y, cuando se incorporan en el extremo 5' del ARN, permitirían una fácil detección, aislamiento y purificación del ARN sintetizado. Estos ARN marcados o etiquetados en el 5' pueden ser necesarios para algunas aplicaciones. Sin embargo, esta estrategia no se usó para la preparación de ARNm con estructuras Cap 0, Cap 1, Cap 2 o TMG-cap.

En determinados aspectos de la presente invención se proporcionan composiciones de cebadores oligonucleótidos con caperuza iniciadores de Fórmula I. En el presente documento también se describen métodos en los que se sintetiza ARN mediante el uso de los cebadores oligonucleótidos con caperuza de iniciación de Fórmula I.

Cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza

Los cebadores oligonucleótidos con caperuza de iniciación de la presente invención tienen una secuencia de hibridación que puede ser complementaria a una secuencia en la plantilla de ADN en el sitio de iniciación. La longitud de la secuencia de hibridación de los cebadores para su uso en los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción depende de varios factores que incluyen la identidad de la secuencia de nucleótidos de plantilla y la temperatura a la que este cebador se hibrida con la plantilla de ADN o se usa durante la transcripción *in vitro*. La determinación de la longitud deseada de una secuencia de nucleótidos específica de un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza para su uso en la transcripción puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica o mediante experimentación rutinaria. Por ejemplo, la longitud de un ácido nucleico u oligonucleótido puede determinarse basándose en una especificidad o selectividad de hibridación deseada.

La longitud de nucleótidos del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza (que incluye Cap) es de 3. La longitud de la secuencia de hibridación dentro del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza puede ser igual o más corta que la longitud total del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza.

La presencia de la secuencia de hibridación obliga a un cebador oligonucleotídico con caperuza a que se alinee predominantemente con la secuencia complementaria de la plantilla de ADN en el sitio de iniciación solo en la orientación deseada (*es decir*, la orientación "directa"). En la orientación directa, el transcrito de ARN comienza con el residuo de guanosina invertido (*es decir*, ^{7m}G(5')ppp(5') N ...). El predominio de la orientación hacia adelante de la alineación del cebador en la plantilla de ADN (Figura 1) sobre la orientación "inversa" incorrecta se mantiene mediante la termodinámica del complejo de hibridación. Este último está determinado por la longitud de la secuencia de hibridación del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y la identidad de las bases implicadas en la hibridación con la plantilla de ADN. La hibridación en la orientación directa deseada también puede depender de la temperatura y las condiciones de reacción en las que la plantilla de ADN y el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza se hibridan o se usan durante la transcripción *in vitro*.

El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza de la presente invención mejora la eficacia del inicio de la transcripción en comparación con la eficacia de la iniciación con GTP, ATP, CTP o UTP estándar. La iniciación de la transcripción puede considerarse mejorada cuando la síntesis de ARN comienza predominantemente a partir de la iniciación del cebador de oligonucleótidos con caperuza y no a partir de ningún NTP en la mezcla de transcripción. La eficacia mejorada de la iniciación de la transcripción da como resultado un mayor rendimiento del transcrito de ARN. La eficiencia mejorada de inicio de la transcripción puede aumentarse hasta aproximadamente el 10 %,

aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 150 %, aproximadamente el 200 % o aproximadamente el 500 % sobre la síntesis de ARN con métodos convencionales sin el cebador con caperuza de iniciación. Los "cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza" pueden competir con cualquier NTP (incluido GTP) para la iniciación de la transcripción. Un experto en la técnica es capaz de determinar fácilmente el nivel de actividad del sustrato y la eficacia de cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza. Un ejemplo de un método para determinar la eficacia del sustrato se ilustra en el Ejemplo 13). En ciertas realizaciones, la iniciación tiene lugar a partir del cebador oligonucleotídico con caperuza en lugar de un NTP, lo que da como resultado un mayor nivel de protección con caperuza del ARNm transcrito.

En el presente documento se describen métodos en los que se sintetiza ARN utilizando un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza que tiene sustituciones o modificaciones. Las sustituciones y modificaciones del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza pueden no perjudicar sustancialmente la síntesis de ARN. Pueden realizarse síntesis de prueba de rutina para determinar si pueden obtenerse resultados de síntesis deseables con los cebadores oligonucleotídicos con caperuza iniciadores modificados. Los expertos en la técnica pueden realizar tal experimentación rutinaria para determinar si pueden obtenerse resultados deseables. La sustitución o modificación del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza incluye, por ejemplo, una o más bases nucleosídicas modificadas, uno o más azúcares modificados, uno o más enlaces internucleotídicos modificados y/o uno o más puentes trifosfato modificados.

El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza modificado, que puede incluir uno o más grupos de modificación de los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción, puede elongarse mediante ARN polimerasa en la plantilla de ADN por la incorporación de NTP en un grupo 3'-OH abierto. El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza puede incluir nucleósidos de ADN y ARN natural, nucleósidos modificados o análogos de nucleósidos. El cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza puede contener enlaces fosfodiéster internucleotídicos naturales o modificaciones de estos o sus combinaciones.

El grupo de modificación puede ser un grupo térmicamente lábil que se disocia de un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza modificado a una velocidad creciente a medida que aumenta la temperatura del medio de reacción enzimática. Ejemplos de grupos térmicamente lábiles para oligonucleótidos y NTP se describen en Nucleic Acids Res., 36:e131 (2008), Collect. Symp. Ser., 10:259-263 (2008) and Analytical Chemistry, 81:4955-4962 (2009).

En el presente documento se describen métodos en los que se sintetiza ARN en los que se añaden al menos uno o más NTP a una reacción de transcripción que pueden tener una modificación como se describe en la presente descripción. La modificación de al menos un NTP puede no alterar sustancialmente la síntesis de ARN mediada por la ARN polimerasa. La modificación de NTP puede incluir, por ejemplo, una o más bases nucleosídicas modificadas, uno o más azúcares modificados o uno o más 5'-trifosfato modificados. El NTP modificado puede incorporarse en el extremo 3' del cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y no bloquea la transcripción y soporta una mayor elongación del cebador.

En otra realización, el grupo de modificación de un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza puede ser un identificador detectable o un marcador detectable. Por tanto, después de la transcripción, el ARN objetivo, que contiene un identificador o marcador detectable, puede identificarse por tamaño, masa, color y/o captura por afinidad. En algunas realizaciones, el identificador o marcador detectable es un tinte fluorescente; y el identificador de captura por afinidad es biotina. En ciertas realizaciones, uno o más componentes de una reacción de transcripción (cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza y/o NTP) pueden marcarse con un identificador o marcador detectable. Por tanto, después de la transcripción, la molécula de ARN puede identificarse, por ejemplo, por tamaño, masa, captura por afinidad o color. En algunas realizaciones, el identificador detectable es un tinte fluorescente; y el identificador de captura por afinidad es biotina.

Pueden utilizarse métodos de síntesis química y enzimática estándar para sintetizar los "cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza" de la presente invención y se describen en la presente descripción en la sección de Ejemplos.

Kits

También se contemplan kits que incluyen el "cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza" para realizar la transcripción. Por ejemplo, los kits pueden contener todos los reactivos de transcripción para la síntesis de ARN comunes (*por ejemplo*, FLuc ARNm). Más específicamente, un kit puede contener: un "cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza"; un contenedor marcado para transcripción; instrucciones para realizar la síntesis de ARN; y uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en uno o más cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza modificados o no modificados, uno o más NTP sin modificar, uno o más NTP modificados (*por ejemplo*, pseudouridina 5'-trifosfato), una ARN polimerasa, otras enzimas, un tampón de reacción, magnesio y una plantilla de ADN.

Los cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza de la presente descripción tienen una ventaja significativa

sobre los métodos y composiciones actuales que implican el uso de varios nucleósidos, nucleótidos y oligonucleótidos iniciadores o el uso de derivados de dinucleótidos polifosfato que contienen estructura Cap 0, tales como mCAP y ARCA. Los cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza son compatibles con los sistemas y reactivos de transcripción existentes y no se requieren enzimas o reactivos adicionales. Además, el uso de iniciadores oligonucleotídicos con caperuza hace que varias etapas enzimáticas y no enzimáticas (como el bloqueo y la 2'-O-metilación) sean innecesarios, lo que reduce la complejidad del proceso y el coste de la síntesis de ARN.

Aunque los métodos ilustrativos descritos en la presente descripción se refieren a la reacción de transcripción mediada por la ARN polimerasa de T7, pueden utilizarse varias otras ARN polimerasas conocidas en la técnica por su uso en reacciones de transcripción con los compuestos de la presente descripción. Otras enzimas, que incluyen variantes naturales o mutadas que pueden utilizarse, incluyen, por ejemplo, ARN polimerasas SP6 y T3 y ARN polimerasas de otras fuentes, incluidas ARN polimerasas termoestables.

Algunos métodos de replicación y amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir la transcripción como parte del proceso. Entre estos métodos se encuentran: amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), secuenciación de ADN y ARN y otras reacciones de extensión de ácidos nucleicos conocidas en la técnica. El experto en la materia comprenderá que pueden usarse otros métodos en lugar de, o junto con, métodos de transcripción, incluidas variantes de reacciones de transcripción desarrolladas en el futuro.

Usos terapéuticos

En el presente documento también se describe la producción de ARNm que contienen el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza para su uso como agentes terapéuticos en una composición farmacéutica, la introducción de ARN que contienen el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza en las células para tratar una afección médica de las células o la introducción de ARN que contienen el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza en células que utilizan esos ARN para producir proteínas que pueden tener un efecto terapéutico en las células huésped.

Un método para tratar una afección utilizando un ARN que contiene un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza comprende la etapa de administrar el ARN que contiene un cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza de Fórmula I o una composición que comprende dicho ARN a un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, una condición cuyos síntomas/sintomatologías pueden reducirse en gravedad o eliminarse.

Un ARN que contiene el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza del "compuesto" de Fórmula I, cuando se formula en un portador farmacéuticamente aceptable y/o sal farmacéuticamente aceptable a una concentración de 4 mg/ml o menos, es eficaz para producir una reducción de los síntomas y/o sintomatologías en al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o mayor que un individuo no tratado con el portador farmacéuticamente aceptable solo.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para su administración mediante inyección u otras vías apropiadas conocidas por los expertos en la técnica para tratar una afección determinada. Una composición inyectable para administración parenteral contiene típicamente el compuesto activo en una solución adecuada y/o un portador farmacéutico tal como una solución salina fisiológica estéril. La composición también puede formularse como una suspensión en un lípido o fosfolípido, en una suspensión liposomal o en una emulsión acuosa.

Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar una variedad de composiciones y/o formulaciones. *ver* Remington's Pharmaceutical Sciences (19th Ed., Williams & Wilkins, 1995). La composición a administrar contendrá una cantidad del compuesto seleccionado en una cantidad farmacéuticamente segura y eficaz para aumentar la expresión de la proteína deseada en las células o tejido objetivo.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica contiene al menos 0,1 % (p/v) del compuesto, como se describió anteriormente, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica contiene más del 0,1 %, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica contiene hasta aproximadamente el 10 %, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica contiene hasta aproximadamente el 5 %, y en algunas realizaciones, la composición farmacéutica contiene hasta aproximadamente el 1 % (p/v) del compuesto. La elección de una concentración adecuada depende de factores tales como la dosis deseada, la frecuencia y el método de suministro del agente activo.

Para el tratamiento de un sujeto, como un mamífero o un ser humano, las dosis se determinan en función de factores como el peso y la salud general del sujeto, la afección tratada, la gravedad de los síntomas, *etc.* Las dosis y concentraciones se determinan para producir el beneficio deseado mientras se evitan efectos secundarios indeseables. Las dosis típicas de los compuestos sujeto están en el intervalo de aproximadamente 0,0005 a 500 mg/día para un paciente humano, y en algunas realizaciones oscilan entre aproximadamente 1-100 mg/día. Por ejemplo, las pautas de dosis más altas incluyen *por ejemplo* 50-100, 75-100 o 50-75 mg/día, y las pautas de dosis más bajas incluyen *por ejemplo* 1-50, 25-50 o 1-25 mg/día.

Varios aspectos de la presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos son a título ilustrativo y no pretenden limitar ninguna práctica de la presente invención. Un experto en la técnica sabrá

fácilmente cómo sintetizar u obtener comercialmente los reactivos y componentes descritos en la presente descripción.

Ejemplo 1

5 Preparación de 5-difosfato de 7-metilguanosina (pp^{7m}G) a partir de guanosina 5'-difosfato (Figura 1)

A una solución en agitación de guanosina 5'-difosfato (2,5 mmol) en 40,0 ml de agua, se le añade ácido acético para ajustar el pH de la solución a 4,0. A esta mezcla se le añade gota a gota sulfato de dimetilo (4,0 ml) durante un período de 30 minutos y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas mientras se mantiene el pH de la mezcla de reacción a aproximadamente 4,0 mediante el uso de una solución 0,1 M de NaOH. Después de 4 horas, la mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 50 ml) para eliminar el sulfato de dimetilo que no ha reaccionado. La capa acuosa se diluye con agua hasta 500 ml, se ajusta a pH 6,5 con TEAB 1 M y se carga en una columna DEAE Sephadex (3 x 50 cm). El producto se eluye mediante el uso de un gradiente lineal de TEAB 0-1 M, pH 7,5 (3 L). Fracciones que contienen pp^{7m}G puro (sal de trietilamonio) se agrupan, se evaporan y se secan al alto vacío para dar un polvo blanco fino (rendimiento: 80 %). Un procedimiento similar se describe en Bioorgan. Med. Chem. Letters 17: 5295-5299 (2007).

Ejemplo 2

20 Preparación de imidazolida de 7-metilguanosina 5'-difosfato (im-pp^{7m}G) a partir de pp^{7m}G (figura 2)

La sal de trietilamonio de pp^{7m}G (0,4 mmol) se hace reaccionar con imidazol (4 mmol), trifenilfosfina (2 mmol) y disulfuro de 2, 2'- dipiridilo (2 mmol) en DMF seca (20 ml) durante 8 h. Im-pp^{7m}G crudo se precipita por vertimiento de la mezcla de reacción en 250 ml de una solución de perclorato de sodio 0,2 M. La mezcla se enfría a -20 °C y el precipitado resultante se recoge por centrifugación, se lava con acetona (3 x 50 ml) y se seca a alto vacío. El rendimiento aislado de Im-pp^{7m}G es aproximadamente 100 %. Un procedimiento similar se describe en Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids 24:1131-1134 (2005) and J. Org. Chem. 64:5836-5840 (1999).

Ejemplo 3

30 Preparación de 3'-O-metilguanosina 5'-fosfato (pGf_{3'Ome}) a partir de 3'-O-metilguanosina (Figura 3)

Se disuelve 3'-O-metilguanosina (10 mmol) en trietilfosfato (40 ml) a 60-70 °C. La mezcla se enfría a 0 °C en un baño de agua helada, se añade oxocloruro de fósforo (30 mmol) y la mezcla se agita bajo argón durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se detiene mediante la adición lenta de TEAB 1 M (100 ml; pH 8,5) con agitación. La mezcla se agita durante 8 horas y se diluye con 1 l de agua. La solución resultante se carga en una columna DEAE Sephadex (3 x 40 cm) y el producto se eluye con un gradiente lineal de 0,05 a 1,0 M (3 l) de TEAB (pH 7,5). Las fracciones que contienen producto puro se combinan, se evaporan hasta un residuo sólido y se coevaporan con metanol (4 x 50 ml) para dar pG (3'_{ome}) (sal de trietilamonio) como un sólido blanco (rendimiento del 60 %). Un procedimiento similar se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 2012/0156751.

Ejemplo 4

45 Preparación de 3'-O-metilguanosina 5'-fosforimidazolida (Im-pG (3'_{ome})) a partir de pG(3'_{Ome}) (Figura 4)

La sal de trietilamonio de pG(3'_{Ome}) (0,5 mmol) se hace reaccionar con imidazol (5 mmol), trifenilfosfina (2,5 mmol) y disulfuro de 2,2'-dipiridilo (2,5 mmol) en DMF seca (25 ml) durante 5 h. Im-pG(3'_{Ome}) crudo se precipita por vertimiento de la mezcla de reacción en 400 ml de perclorato de sodio 0,2 M en una solución de acetona. La mezcla se enfría a -20 °C y el precipitado resultante se recoge por centrifugación, se lava con acetona (3 x 60 ml) y se seca a alto vacío (rendimiento: 100 %). Un procedimiento similar se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 2012/0156751.

Ejemplo 5

60 Preparación de 3'-O-metilguanosina 5'-difosfato (ppG (3'_{Ome})) a partir de Im-pG (3'_{Ome}) (Figura 5)

Se agrega cloruro de zinc sólido (14,0 mmol) con pequeñas porciones a una solución de Im-pG(3'_{Ome}) (7,0 mmol) en DMF seca (40 ml). La mezcla se agita durante 15 minutos bajo argón hasta que se disuelven todos los sólidos. Se añade una solución de fosfato de tributilamonio 1 M en DMF (40 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente. Después de 5 horas, la mezcla se diluye con 200 ml de agua y se extrae con diclorometano (2 x 200 ml). La capa

acuosa se diluye con agua (1 l), se carga en una columna DEAE Sephadex (5 x 40 cm) y se eluye con un gradiente lineal de 0,05 a 1,0 M (6 l) de TEAB (pH 7,5). Las fracciones que contienen el producto puro se combinan, se evaporan y se coevaporan con metanol (4 x 50 ml) para dar ppG(3'OMe) (sal de trietilamonio) como un sólido blanco (rendimiento: 60 %). Un procedimiento similar se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 2012/0156751.

Ejemplo 6

Preparación de 5-difosfato de 7-metil-3'-o-metilguanosina (pp^{7m}g(3'ome)) a partir de ppg (3'ome)

(Figura 6)

Una solución de ppG(3'OMe) (sal de trietilamonio; 3,0 mmol) en 50 ml de agua y se añade ácido acético glacial para ajustar el pH de la solución a 4,0. Se añade gota a gota sulfato de dimetilo (10,0 ml) a esta mezcla durante un período de 30 minutos y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas mientras se mantiene un pH de $4,0 \pm 0,5$ mediante el uso de una solución 0,1 M de NaOH. Después de 4 horas, la mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 150 ml) para eliminar el sulfato de dimetilo que no ha reaccionado. La capa acuosa se ajusta a pH 5,5, se diluye con agua (500 ml) y se carga en una columna DEAE Sephadex (3 x 50 cm). El producto se eluye mediante el uso de un gradiente lineal de TEAB 0-1,0 M, pH 7,5 (3 L). Fracciones que contienen pp^{7m}G(3'OMe) (sal de trietilamonio) puro, se agrupan, se evaporan y se secan a alto vacío para dar un polvo blanco fino (rendimiento: 80 %). Un procedimiento similar se describe en RNA 9:1108-1122(2003); Nucleoside Nucleotides & Nucleic acids 25:337-340 (2006); y solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 2012/0156751.

Ejemplo 7

Preparación de imidazolida de 7-metil-3'-O-metilguanosina 5-difosfato (Im-pp^{7m}G(3'OMe)) a partir de pp^{7m}G(3'OMe)

(Figura 7)

El protocolo descrito en el Ejemplo 1 se utiliza para la preparación de Im-pp^{7m}G(3'OMe). Un procedimiento similar se describe en RNA 14:1119-1131 (2008).

Ejemplo 8

Procedimiento general para la preparación de dinucleótidos pN(2'-OR₁)pN (R₁ = H o Me)

(Figura 8)

Se hace reaccionar el monómero de fosforamidita (i) (1,0 mmol) y el nucleósido 2', 3', N-prottegido (ii) (1,0 mmol) en 10 ml de acetonitrilo que contiene 2,5 equivalentes molares de activador (tetrazol). Después de 60 minutos de agitación a temperatura ambiente, el producto intermedio se oxida del estado P(III) a P(V) con yodo y se extrae con diclorometano (200 ml) y salmuera (200 ml). La capa orgánica se seca con sulfato de sodio y se evapora hasta obtener una espuma sólida (intermedio (iii)).

Para eliminar el grupo protector de DMT, el intermedio (iii) se disuelve en 10 ml de ácido acético al 80 % y, una vez completada la reacción (aproximadamente 1-2 horas), la mezcla se evapora y se coevapora con metanol (5 x 30 ml) para eliminar el ácido acético. El dímero 5'-OH crudo (iv) se aísla y se purifica mediante el uso de la cromatografía en gel de sílice usando metanol al 5 % en diclorometano como eluyente.

El dímero 5'-OH (iv) (1,0 mmol) se fosfita con 2 equivalentes de bis-cianoetil-N, N-diisopropilfosforamidita y 2 equivalentes de activador (tetrazol) en 10 ml de acetonitrilo. Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, el dímero 5'-fosfita se oxida del estado P(III) a P(V) con yodo y se extrae con diclorometano (150 ml) y salmuera (150 ml). La capa orgánica se evapora hasta obtener un residuo aceitoso, se coevapora con metanol (2 x 30 ml), se disuelve en 12 ml de metanol y se añade amoniaco concentrado (12 ml). La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante más de 48 horas hasta que se completa la desprotección del dímero pN_{2'OR1}pN (v). La mezcla se evapora y se coevapora con metanol (2 x 30 ml).

Cuando R = metilo, el dímero crudo (v) se purifica directamente mediante intercambio aniónico y cromatografía de fase inversa (Etapa 5). Las fracciones se evaporan para dar un dímero pN_{2'OR1}pN final (v) (v; R₁ = metilo; sal de trietilamonio) como un sólido blanco (35 % de rendimiento total).

Cuando R = TBDMS, el dímero crudo (v) se trata (Etapa 4B) con una mezcla de HF-3TEA para eliminar el grupo protector 2'-OTBDMS (Org. Biomol. Chem. 3: 3851-3868 (2005)) y Nucl. Acids Res. 22: 2430-2431 (1994)). Cuando se completa la reacción, la mezcla se diluye con TEAB 0,05 M y se purifica mediante intercambio aniónico y cromatografía de fase inversa (Etapa 5). Las fracciones se evaporan para dar un dímero pN_{2'OR1}pN final (v) (R₁ = H; sal de trietilamonio) como un sólido blanco (rendimiento total del 30 %).

Ejemplo 9

Procedimiento general para la síntesis de oligonucleótidos iniciadores con estructuras Cap 0, Cap 1 o Cap 2 (en el ejemplo se usa dinucleótido 5'-fosforilado)

(Figura 9)

A. Enfoque 1:

A una suspensión de Im-pp^{7m}G(3'Ome) o Im-pp^{7m}G (2 mmol; forma de sal de sodio) y dinucleótido 5'-fosforilado (1 mmol; sal de trietilamonio) en DMF (50 ml), ZnCl₂ anhidro (1 g) se agrega lentamente mientras la mezcla se agita a 35 °C. Después de 24 horas, la reacción se detiene mediante la adición de una solución 25 mM de EDTA en agua (500 ml) y se neutraliza con una solución 1 M de bicarbonato de sodio. La mezcla se diluye a 1 l con agua y se carga en una columna DEAE Sephadex (3 x 50 cm). El producto se eluye mediante el uso de un gradiente lineal de bicarbonato de amonio 0-1 M, pH 7,2 (2 i). Las fracciones que contienen producto puro se agrupan, se evaporan y se secan a alto vacío para dar un polvo blanco fino (rendimiento: 60 %). Un enfoque similar se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 2012/0156751; Bioorg. Med. Chem. Lett. 17: 5295-5299 (2007) y ARN 14: 1119-1131 (2008).

B. Enfoque 2:

Se disuelve Im-pp^{7m}G(3'Ome) o Im-pp^{7m}G (2 mmol) en tampón de N-metil morfolina (0,2 M, pH 7,0, 10 ml) que contiene MnCl₂ (2 mmol) y se añade al dinucleótido 5' fosforilado sólido (1 mmol; sal de trietilamonio). La reacción se agita a temperatura ambiente. Después de 24-40 horas, la reacción se detiene con 10 ml de solución 0,25 M de EDTA. La mezcla se carga en una columna DEAE Sephadex (3 x 50 cm). El producto se eluye mediante el uso de un gradiente lineal de bicarbonato de amonio 0-1,0 M, pH 7,2 (2 l). Las fracciones que contienen producto puro se agrupan, se evaporan y se secan a alto vacío para dar un polvo blanco fino (rendimiento del 50 %). Un enfoque similar se describe en Bioorganic & Medicinal Chemistry 21:7921-7928 (2013), Nucleic Acids Research 37:1925-1935 (2009); J. Org. Chem. 64:5836-5840 (1999). (Nota: 1. Puede usarse un oligonucleótido trímero, tetrámero, pentámero, hexámero, heptámero, octámero, nanómero o decámero 5' fosforilado en lugar del dinucleótido 5' fosforilado como se ilustra en el Ejemplo 9. 2. Con el fin de preparar el oligonucleótido con caperuza de iniciación con Cap 0, el oligonucleótido 5'-fosforilado no tiene grupos 2'-O-metilo en los primeros residuos 5'-nucleósidos, por ejemplo, pApG. 3. Con el fin de preparar el oligonucleótido con caperuza de iniciación con Cap 1, el oligonucleótido 5' fosforilado lleva un grupo 2'-O-metilo en el primer residuo 5'-nucleósido, *por ejemplo* pA(2'Ome)pG. 4. Con el fin de preparar el oligonucleótido con caperuza de iniciación con Cap 2, el oligonucleótido 5' fosforilado lleva dos grupos 2'-O-metilo en el primer y segundo residuos de 5'-nucleósido, *por ejemplo* pA(2'Ome)pG(2'Ome)pG).

Ejemplo 10

Estructuras de cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza de acuerdo con la Fórmula I

La Figura 10 muestra las estructuras de los cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza usados en los ejemplos A) ^{m7}G3'OmepppG, B) ^{m7}GpppG2'OmepG, C) ^{m7}G3'OmepppG2'OmepG, D) ^{m7}GpppA2'OmepG, E) ^{m7}G3'OmepppA2'OmepG, F) ^{m7}GpppC2'OmepG, G) ^{m7}G3'OmepppC2'OmepG, H) ^{m7}GpppA2'OmepG2'OmepG.

De estos, B) y C) son compuestos de acuerdo con la Fórmula I.

Ejemplo 11

Transcripción in vitro con cebador ARCA

Se generó una plantilla de transcripción de ADN de doble hebra que codifica luciferasa de luciérnaga mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El nucleótido de plantilla +1 era 2'-desoxicitidina. Las reacciones de transcripción se ensamblaron con una plantilla de transcripción de 25 ug/ml, Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), MgCl₂ 27 mM, Espermidina 2 mM, DTT 10 mM, Triton X-100 al 0,002 %, inhibidor de la ARNasa murina de 1000 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M0314), pirofosfatasa inorgánica de 2 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M2403), 4000 unidades/ml de ARN polimerasa T7 (New England Biolabs # de catálogo M0251), ARCA 6 mM (^{m7}G3'OmepppGG), GTP 1,5 mM, ATP 7,5 mM, CTP 7,5 mM y UTP 7,5 mM. Las transcripciones se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Las reacciones se complementaron con Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM y 100 unidades/ml de DNasa I (New England Biolabs # de catálogo M0303) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Los ARNm resultantes se purificaron mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm se eluyeron en agua y se desfosforilaron mediante el ajuste de la solución a bis-tris-propano HCl 50 mM (pH 6,0), MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM y 250 unidades/mg de fosfatasa Antarctic (New England Biolabs # de catálogo M0289). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Los ARNm resultantes se purificaron mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm

se eluyeron en agua.

Ejemplo 12

5 Transcripción in vitro con cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza triméricos

En la Tabla 1 se indican algunos cebadores oligonucleotídicos con caperuza de iniciación que se utilizan en las transcripciones. Se genera una plantilla de transcripción de ADN de luciferasa de luciérnaga de doble hebra específica para cada trímero mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Estas plantillas difieren en los nucleótidos de plantilla +1 y +2. Para un trímero dado, el nucleótido de plantilla +1 era complementario a B₁ (el nucleótido destinado a convertirse en el nucleótido del transcrito +1). Del mismo modo, el nucleótido de plantilla +2 era complementario de B₁₀ (el nucleótido destinado a convertirse en el nucleótido +2 del transcrito; véase el Ejemplo 10)). Las reacciones de transcripción se ensamblan con una plantilla de transcripción de 25 ug/ml, Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), MgCl₂ 27 mM, Espemidina 2 mM, DTT 10 mM, Triton X-100 al 0,002 %, inhibidor de la ARNasa murina de 1000 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M0314), pirofosfatasa inorgánica de 2 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M2403), 4000 unidades/ml de ARN polimerasa de T7 (New England Biolabs # de catálogo M0251) y 6 mM de cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza, GTP 1,5 mM y 7,5 mM cada uno de ATP, CTP y UTP. En los ejemplos siguientes, esta formulación de cebador/NTP se referirá como Formulación 1 de cebador/NTP. Está claro para un experto en la técnica que podrían usarse otras polimerasas tales como T7, T3 o SP6 ARN polimerasas en lugar de T7 ARN polimerasa para realizar la misma función mediante el uso de sus respectivos promotores. Las mezclas de reacción de transcripción se incuban a 37 °C durante 2 horas. Las reacciones se complementan con Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM y 100 unidades/ml de DNasa I (New England Biolabs # de catálogo M0303) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Los ARNm resultantes se purifican mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm se eluyen en agua y se desfosforilan mediante el ajuste de la solución a bis-tris-propano HCl 50 mM (pH 6,0), MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM y 250 unidades/mg de fosfatasa Antarctic (New England Biolabs # de catálogo M0289). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Los ARNm resultantes se purifican mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm se eluyen en agua.

30 Ejemplo 13 de referencia

Transcripción in vitro con cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza tetramérico ^{7m}G_{3'}OMepppA_{2'}OMePG_{2'}OMePG

Cebador oligonucleotídico con caperuza ^{7m}G_{3'}OMepppA_{2'}OMePG_{2'}OMePG se usaron en la transcripción. La transcripción se llevó a cabo como en el Ejemplo 11 con las siguientes modificaciones. Se generó una plantilla de transcripción de ADN de doble hebra específica para el tetrámero mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El nucleótido +1 de la plantilla (2'-desoxitimidina) era complementario a la adenosina (el primer nucleótido del cebador destinado a convertirse en un nucleótido +1 transcrito). Asimismo, el nucleótido +2 de la plantilla (2'-desoxicitidina) era complementario a la guanosina (el segundo nucleótido del cebador destinado a convertirse en el nucleótido +2 transcrito). Asimismo, el nucleótido +3 de la plantilla (2'-desoxicitidina) era complementario a la guanosina (el tercer nucleótido del cebador destinado a convertirse en el nucleótido +3 del transcrito). Las reacciones de transcripción se ensamblaron con una plantilla de transcripción de 25 ug/ml, Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), MgCl₂ 27 mM, Espemidina 2 mM, DTT 10 mM, Triton X-100 al 0,002 %, inhibidor de la ARNasa murina de 1000 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M0314), pirofosfatasa inorgánica de 2 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M2403), 4000 unidades/ml de polimerasa de ARN T7 (New England Biolabs # de catálogo M0251), 6 mM de cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza ^{7m}G_{3'}OMepppA_{2'}OMePG_{2'}OMePG, 1,5 mM de GTP, 7,5 mM de ATP, 7,5 mM de UTP y 7,5 mM de CTP. Está claro para un experto en la técnica que podrían usarse otras polimerasas tales como T7, T3 o SP6 ARN polimerasas en lugar de T7 ARN polimerasa para realizar la misma función mediante el uso de sus respectivos promotores. Las mezclas de reacción de transcripción se incubaron a 37 °C durante 2 horas, las reacciones se complementaron con Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM y 100 unidades/ml de DNasa I (New England Biolabs # de catálogo M0303) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los ARNm resultantes se purificaron mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm se eluyeron en agua y se desfosforilaron mediante el ajuste de la solución a bis-tris-propano HCl 50 mM (pH 6,0), MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM y 250 unidades/mg de fosfatasa Antarctic (New England Biolabs # de catálogo M0289). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Los ARNm resultantes se purificaron mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm se eluyeron en agua.

60 Ejemplo 14 de referencia

Transcripción in vitro con cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza ^{m7}GpppA_{2'}OMePG en una plantilla de transcripción con residuos de 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en las posiciones +1 y +2 de la plantilla, respectivamente.

Se utilizó una plantilla de transcripción de ADN de luciferasa de luciérnaga bicatenaria con residuos de 2'-

desoxitimidina y 2'-desoxicidina en las posiciones +1 y +2 de la plantilla, respectivamente. Se ensamblaron dos reacciones de transcripción con una plantilla de transcripción de 25 ug/ml, Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), MgCl₂ 27 mM, Espermidina 2 mM, DTT 10 mM, Triton X-100 al 0,002 %, inhibidor de la ARNasa murina de 1000 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M0314), pirofosfatasa inorgánica de 2 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M2403), 4000 unidades/ml de ARN polimerasa de T7 (New England Biolabs # de catálogo M0251). Las dos transcripciones difieren en la cantidad de oligonucleótido iniciador con caperuza, la cantidad de NTP y la identidad de los NTP. La primera transcripción fue diseñada para imitar las condiciones de transcripción de Ishicawa y otros. (Nucleic Acids Symposium Series No. 53:129 (2009)). Esta reacción de transcripción contenía 6 mM de ^{m7}GpppA_{2'}OmeP cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza, GTP 0,9 mM y 7,5 mM de ATP, CTP y UTP. En los ejemplos siguientes, esta formulación de cebador/NTP se referirá como Formulación 2 de cebador/NTP. En esta formulación, el cebador oligonucleotídico de iniciación tenía un exceso de más de 6 veces con respecto al GTP. La segunda transcripción se usaron 5 mM de ^{m7}GpppA_{2'}OmeP cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza de pG, GTP, ATP, CTP 5 mM y trifosfato de pseudouridina (ΨTP). En los ejemplos siguientes, esta formulación de cebador/NTP se referirá como Formulación 3 de cebador/NTP. En la Formulación 3 de cebador/NTP, se aumentó la concentración de GTP con el fin de producir cantidades de ARN comercialmente útiles. Está claro para un experto en la técnica que podrían usarse otras polimerasas tales como T7, T3 o SP6 ARN polimerasas en lugar de T7 ARN polimerasa para realizar la misma función mediante el uso de sus respectivos promotores. Las mezclas de reacción de transcripción se incuban a 37 °C durante 2 horas. Las reacciones se complementaron con Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM y 100 unidades/ml de DNasa I (New England Biolabs # de catálogo M0303) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Los ARNm resultantes se purificaron mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm se eluyeron en agua y se desfosforilaron mediante el ajuste de la solución a bis-tris-propano HCl 50 mM (pH 6,0), MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM y 250 unidades/mg de fosfatasa Antarctic (New England Biolabs # de catálogo M0289). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora para la Formulación 2 de cebador/NTP y durante 3 horas para la Formulación 3 de cebador/NTP. Los ARNm resultantes se purificaron mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm se eluyeron en agua. Los rendimientos de transcripción purificada con Formulación 2 y 3 de cebador/NTP fueron 0,7 miligramos/mililitro de reacción de transcripción (mg/ml) y 3,9 mg/ml de reacción de transcripción, respectivamente. El rendimiento con Formulación 3 de cebador/NTP fue muy superior al obtenido con Formulación 2 de cebador/NTP.

Ejemplo 15 de referencia

Transcripción in vitro con cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza ^{m7}GpppA_{2'}OmeP en una plantilla de transcripción con residuos de citidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2

Se utilizó una plantilla de transcripción de ADN de luciferasa de luciérnaga bicatenaria en la que los nucleótidos de plantilla +1 y +2 eran citidinas y, por lo tanto, no eran completamente complementarias al cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza ^{m7}GpppA_{2'}OmeP. Se ensamblaron dos reacciones de transcripción con una plantilla de transcripción de 25 ug/ml, Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), MgCl₂ 27 mM, Espermidina 2 mM, DTT 10 mM, Triton X-100 al 0,002 %, inhibidor de la ARNasa murina de 1000 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M0314), pirofosfatasa inorgánica de 2 unidades/ml (New England Biolabs # de catálogo M2403), 4000 unidades/ml de ARN polimerasa de T7 (New England Biolabs # de catálogo M0251). Las dos transcripciones diferían en la cantidad de oligonucleótidos con caperuza de iniciación y NTP. La primera transcripción fue diseñada para imitar las condiciones de transcripción de Ishikawa y otros, (Nucleic Acids Symposium Series No. 53: 129 (2009)). Esta reacción de transcripción contenía la Formulación 2 de cebador/NTP. En la segunda transcripción se usó Formulación 3 de cebador/NTP. Está claro para un experto en la técnica que podrían usarse otras polimerasas tales como T7, T3 o SP6 ARN polimerasas en lugar de T7 ARN polimerasa para realizar la misma función mediante el uso de sus respectivos promotores. Las mezclas de reacción de transcripción se incubaron a 37° C durante 2 horas. Las reacciones se complementaron con Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM y 100 unidades/ml de DNasa I ((New England Biolabs # de catálogo M0303) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Los ARNm resultantes se purificaron mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante o mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa. Los ARNm se desfosforilaron mediante el ajuste de la solución a bis-tris-propano HCl 50 mM (pH 6,0), MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM y 250 unidades/mg de fosfatasa Antarctic ((New England Biolabs # de catálogo M0289). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora para la Formulación 2 de cebador/NTP y 3 horas para la Formulación 3 de cebador/NTP. Los ARNm resultantes se purificaron mediante el uso de un kit RNeasy Maxi (Qiagen # de catálogo 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNm se eluyeron en agua. Los rendimientos de transcripción purificada con las Formulaciones 2 y 3 de cebador/NTP fueron 0,6 miligramos/mililitro de reacción de transcripción (mg/ml) y 3,9 mg/ml de reacción de transcripción, respectivamente. El rendimiento con Formulación 3 de cebador/NTP fue muy superior al obtenido con Formulación 2 de cebador/NTP.

Ejemplo 16**Traducción de ARNm en células Huh-7****(Figura 11)**

Se evaluó la actividad de traducción de los ARNm de luciferasa generados con cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza en hepatocitos cultivados por triplicado. Las células Huh-7 se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y penicilina/estreptomicina a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células se transfectaron con 400 ng de ARNm. A modo de comparación, las células también se transfectaron con un ARNm de luciferasa de CapO que se genera por iniciación con ARCA. A las 20 horas, se recogieron las células y se midió la actividad luciferasa mediante el uso de un kit del sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo (Promega # de catálogo E6120) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La luminiscencia se midió mediante el uso de un instrumento del sistema de detección GloMax-Multi + de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se detectó actividad luciferasa para todos los ARNm probados (Figura 11). El hecho de que los ARNm generados con cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza o cebadores oligonucleotídicos con caperuza de iniciación de 3'-O-metilo se traduzcan con eficiencias similares a los ARN con caperuza ARCA indica que la caperuza se añade cotranscripcionalmente de manera efectiva.

Ejemplo 17

Ensayo para determinar la eficacia de la adición de caperuzas del ARNm generado por la adición de caperuzas cotranscripcional con ARCA o el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza mediante el uso de la Formulación 1 de cebador/NTP.

(Figuras 12A-12H)

Cada cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza que se probó, se sometió a un ensayo de adición de caperuzas con cantidades suficientes de ARNm para su detección por espectroscopía de masas por cromatografía líquida (LC-MS). En este ensayo, se escindió un pequeño fragmento del extremo 5' de un ARNm de longitud completa y se analizó mediante LC-MS. Antes de la escisión del ARNm, se trató con fosfatasa Antarctic (New England Biolabs # de catálogo M0289) para convertir los monofosfatos, difosfatos y trifosfatos sin caperuza a 5' OH para facilitar el análisis. A continuación, el ARNm tratado con fosfatasa se escindió y se purificó. El ARN purificado se sometió a análisis LC-MS. La Figura 12 muestra los cromatogramas de LC. Los picos de LC correspondientes a sin caperuza (5' OH después del tratamiento con fosfatasa) y Cap 1 se indican con las masas observadas. El esquema de inserción muestra la alineación del cebador oligonucleotídico de iniciación en la plantilla de transcripción. Tenga en cuenta que "I" indica un par de bases del nucleótido de iniciación con caperuza con el nucleótido de plantilla en el esquema. El subíndice "m" indica un grupo 2'-O-metilo y el superíndice "m7" indica una metilación de bases. A modo de comparación, un ARNm con adición cotranscripcional de caperuza con ARCA se sometió al ensayo de adición de la caperuza. Se hizo una estimación de la eficacia de la adición de caperuza mediante el uso de la siguiente fórmula (intensidad de los picos sin caperuza)/[(intensidad del pico con caperuza) + (intensidad del pico de 5' OH)]. El % de adición de caperuza observado en la Figura 12 fue A) ^{m7}G_{3'}OmepppG = 79 %, B) ^{m7}GpppG_{2'}OmePG = 89 %, C) ^{m7}G_{3'}OmepppG_{2'}OmePG = 87 %, D) ^{m7}GpppA_{2'}OmePG = 99 %, E) ^{m7}G_{3'}OmepppA_{2'}OmePG = 99 %, F) ^{m7}GpppC_{2'}OmePG = 98 %, G) ^{m7}G_{3'}OmepppC_{2'}OmePG = 97 %, H) ^{m7}GpppA_{2'}OmePG_{2'}OmePG = 50 %. En cada caso, la eficacia de adición de caperuza de los transcritos con adición cotranscripcional de caperuza con cebadores oligonucleotídicos iniciadores con caperuza triméricos fue mayor que la observada con ^{m7}G_{3'}OmepppG (ARCA).

Ejemplo 18 de referencia

Comparación de la adición de caperuzas con oligonucleótido iniciador con caperuza ^{m7}GpppA_{2'}OmePG en una plantilla de transcripción con residuos de 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2 frente a una plantilla de transcripción con residuos de citidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2

(Figuras 13A-13D)

Los ARNm preparados en los Ejemplos 14 y 15 se sometieron a un ensayo de adición de caperuza para determinar la eficacia relativa y la especificidad de la adición de caperuzas de transcritos con residuos de 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en las posiciones de plantilla +1 y +2 frente a una plantilla de transcripción con residuos de citidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2. Cantidades suficientes de ARNm que se detectan por espectroscopía de masas por cromatografía líquida (LC-MS) se sometieron a un ensayo de adición de caperuza. En este ensayo, se escindió un pequeño fragmento del extremo 5' de un ARNm de longitud completa y se analizó mediante LC-MS. Antes de la escisión del ARNm, se trató con fosfatasa Antarctic (New England Biolabs # de catálogo M0289) para convertir los monofosfatos, difosfatos y trifosfatos sin caperuza a 5' OH para facilitar el análisis. A continuación, el ARNm tratado con fosfatasa se escindió y se purificó. El ARN purificado se sometió a análisis LC-MS. La Figura 13 muestra los cromatogramas de LC. Los picos de LC correspondientes a sin caperuza y Cap 1 se indican con masas observadas. El esquema de inserción muestra la alineación del cebador oligonucleotídico de iniciación en la plantilla de transcripción. El subíndice "m" indica un grupo 2'-O-metilo y el superíndice "m7" indica una metilación de bases. Los transcritos de la Figura 13A y 13B se transcribieron a partir de plantillas con 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en los nucleótidos de plantilla +1 y +2, respectivamente, mediante el uso de las Formulaciones 2 y 3 de cebador/NTP, respectivamente. Las Figuras 13C y 13D son transcritos que se transcribieron a partir de plantillas con 2'-desoxicitidinas en los nucleótidos de plantilla +1 y +2 mediante el uso de las Formulaciones 2 y 3 de cebador/NTP,

respectivamente. Cuando el oligonucleótido de iniciación de ^{m7}GpppA_{2'}Ome_pG era completamente complementario a los nucleótidos +1 y +2, el producto principal observado era el transcrito plantilla deseado Cap 1 que se inició con ^{m7}GpppA_{2'}Ome_pG... (Figuras 13A y 13B). Para las Figuras 13A y 13B, se hizo una estimación de la eficiencia de adición de caperuza mediante el uso de la siguiente fórmula (intensidad de los picos con caperuza)/[(intensidad de los picos con caperuza) + (intensidad del pico 5' OH)] y la eficiencia de adición de caperuzas con la Formulación 2 de cebador/NTP y la Formulación 3 de cebador/NTP fue del 99 % y 96 %, respectivamente. Sólo se detectaron productos de iniciación aberrantes menores. Por el contrario, cuando los nucleótidos de plantilla +1 y +2 son citidina, no existe una complementariedad perfecta entre el oligonucleótido de iniciación ^{m7}GpppA_{2'}Ome_pG y estos nucleótidos de plantilla. Las Figuras 13C y 13D muestran que el oligonucleótido iniciador con caperuza se inició en dos registros. En el primer registro, el residuo de oligonucleótido iniciador con caperuza de guanosina 3' se emparejó con la citidina de plantilla +1 para producir un transcrito con una adenosina 5' adicional sin plantilla (Cap 1 + A). Tenga en cuenta que "I" indica un par de bases del nucleótido de iniciación con caperuza con el nucleótido de plantilla en el esquema. Se indica la posición de nucleótido de plantilla designada. En el segundo registro, el residuo de oligonucleótido iniciador con caperuza de guanosina 3' emparejado con la citidina de plantilla +2 y el oligonucleótido iniciador con caperuza +1 adenosina no forma un híbrido completo con el nucleótido de plantilla +1. Esto produce una transcripción en la que la guanosina 5' con plantilla se ha reemplazado por una adenosina sin plantilla (Cap 1 GtoA). Se realizó una estimación de la eficiencia de adición de caperuza mediante el uso de la siguiente fórmula (intensidad de los picos con caperuza "Cap1 + A" + "Cap1 GtoA")/[(intensidad de los picos con caperuza "Cap 1 + A" + "Cap 1 GtoA") + (intensidad del pico 5' OH)]. La eficiencia de la adición de caperuza calculada en la Figura 13C y 13D fue de 97 y 77 %. Observamos el hallazgo sorprendente de que la eficacia de la limitación y la fidelidad del inicio de la transcripción con plantilla eran mucho más altas cuando el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza era completamente complementario al correspondiente plantilla +1 y +2 nucleótidos. Además, con nuestro método, puede lograrse una adición de caperuza eficiente sin reducir la concentración de un NTP para impulsar la adición de caperuza, lo que permite rendimientos de transcripción mucho mayores. Por lo tanto, el método de adición de caperuza que describimos es distinto y superior al de Ishikawa. y otros.

Ejemplo 19 de referencia

(Figuras 14A-14B)

Comparación de la traducción en células THP-1 diferenciadas de ARNm elaborado con oligonucleótidos iniciadores con caperuza ^{m7}GpppA_{2'}Ome_pG en una plantilla de transcripción con residuos de 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2 frente a una plantilla de transcripción con residuos de citidina en las posiciones de la plantilla +1 y +2

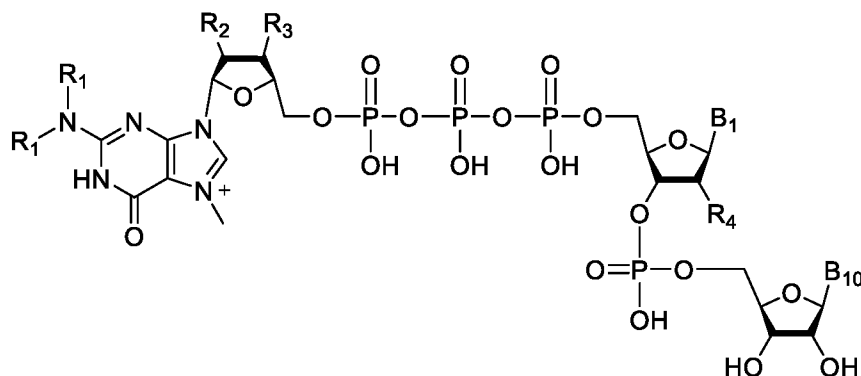
Con el fin de evaluar la expresión de los ARNm de luciferasa generados en los Ejemplos 14 y 15, los ARNm se transfectaron en células THP-1 (ATCC, # de catálogo TIB-202) con seis réplicas. Se cultivaron células THP-1 en RPMI-1640 formulado por ATCC (ATCC, # de catálogo 30-2001) suplementado con FBS al 10 %, piruvato de sodio y penicilina/estreptomicina a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células se sembraron a 2E + 05 células por pocillo en un formato de placa de 24 pocillos en presencia del éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA; Cell Signaling Technologies, # de catálogo 4174) para inducir la diferenciación. Las células se transfectaron con 100 ng de ARNm por pocillo 72 horas después de la siembra. A modo de comparación, las células también se transfectaron con un ARNm de luciferasa de CapO que se genera por iniciación con ARCA. A las 20 horas después de la transfección, se recolectaron las células y se midió la actividad de luciferasa mediante el uso de un kit ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega # de catálogo E6120) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La luminiscencia se midió mediante el uso de un instrumento del sistema de detección GloMax-Multi + de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los datos se representaron gráficamente como la media de seis réplicas +/- la desviación estándar de la media. Los datos se analizaron mediante el uso de la prueba t para datos no apareados para generar valores de p como medida de significación. Se indica el valor p entre pares. La traducción se comparó en células THP-1 para los transcritos que se generaron con oligonucleótido iniciador con caperuza ^{m7}GpppA_{2'}Ome_pG y una plantilla que comprende residuos de 2'-desoxitimidina y 2'-desoxicitidina en las posiciones de plantilla +1 y +2 (plantilla "TC") frente a una plantilla de transcripción con residuos de citidina en las posiciones de plantilla +1 y +2 ("CC" Plantilla). A) La transcripción se realizó con las Formulaciones 2 de cebador/NTP o B) Formulaciones 3 de cebador/NTP. Con ambas formulaciones, la traducción en células THP-1 cultivadas fue significativamente superior cuando el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza de ^{m7}GpppA_{2'}Ome_pG era completamente complementario a los nucleótidos de plantilla +1 y +2 (plantilla "TC") como se describe en el presente documento. En la Figura 14B, también evaluamos la actividad de un ARNm que se hizo con la plantilla "TC" y se protegió con caperuzas con ARCA (Cap 0). Este es el estándar actual de la industria para generar cotranscripcionalmente ARNm con caperuza. El ARN con caperuza ARCA tuvo una actividad significativamente menor que los transcritos realizadas donde el cebador oligonucleotídico iniciador con caperuza de ^{m7}GpppA_{2'}Ome_pG era completamente complementario a los nucleótidos de plantilla +1 y +2 (plantilla "TC").

En resumen, los ejemplos que se muestran aquí demuestran que, en relación con los métodos publicados anteriormente, los métodos descritos aquí generan ARN con una combinación de 1) alto rendimiento, 2) alto grado de adición de caperuza, 3) alta fidelidad de la transcripción con plantilla y 4) actividad superior en celdas.

El alcance de la invención y, por tanto, de la protección, se define mediante las reivindicaciones adjuntas y no está limitado por los ejemplos anteriores, que son meramente ilustrativos. Cualquier objeto de la descripción anterior que no esté incluido en las reivindicaciones adjuntas no debe entenderse como parte de la invención.

REIVINDICACIONES

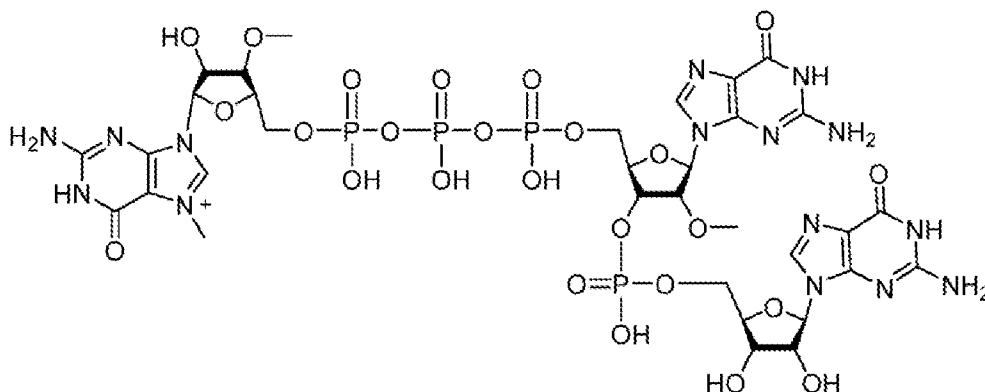
1. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:



5

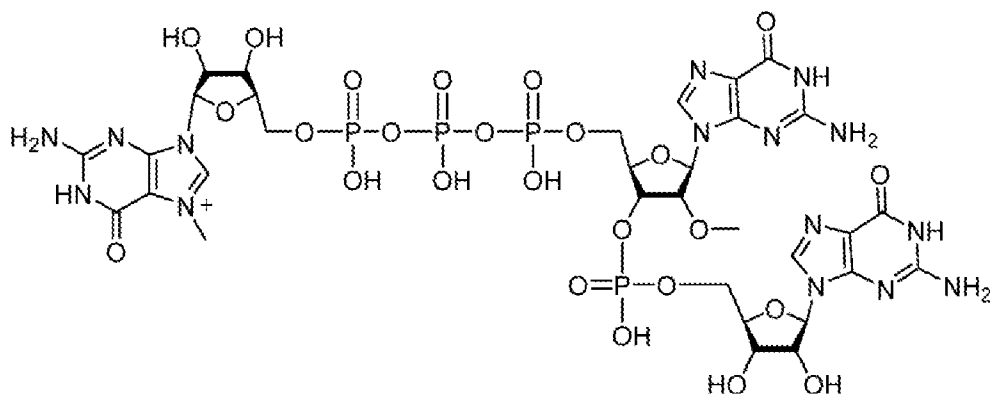
en donde

- B₁ es guanina;
 B₁₀ es una base nucleosídica natural;
 R₁ es H o metilo;
 R₂ y R₃ son independientemente H, OH, alquilo, O-alquilo o halógeno; y
 R₄ es H, OH u O-metilo.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el alquilo se selecciona de metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, isoamilo, hexilo, octilo y dodecanilo.
3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el O-alquilo se selecciona de O-metilo, O-etilo, O-propilo, O-isopropilo, O-n-butilo, O-sec-butilo, O-isobutilo, O-terc-butilo, O-pentilo, O-isoamilo, O-hexilo, O-octilo y O-dodecanilo.
4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde B₁₀ es adenina, N⁶-metiladenina, guanina, citosina o uracilo.
5. El compuesto de la reivindicación 4, en donde B₁₀ es adenina, guanina, citosina o uracilo
- 6.-El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



7. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

30



8. El compuesto de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto es un cebador oligonucleotídico de iniciación con caperuza.

9. Un cebador oligonucleotídico de iniciación con caperuza de acuerdo con la reivindicación 8, seleccionado de $m^7GpppGpA$, $m^7GpppGpC$, $m^7GpppGpG$, $m^7GpppGpU$, $m^7G3'OmepppGpA$, $m^7G3'OmepppGpC$, $m^7G3'omepppGpG$, $m^7G3'OmepppGpU$, $m^7G3'omepppG2'omepA$, $m^7G3'OmepppG2'Ome pC$, $m^7G3'OmepppG2'Ome pG$, $m^7G3'OmepppG2'Ome pU$, $m^7GpppG2'Ome pA$, $m^7GpppG2'Ome pC$, $m^7GpppG2'Ome pG$ y $m^7GpppG2'Ome pU$.

10. Una molécula de ARN que comprende el cebador oligonucleotídico de iniciación con caperuza de la reivindicación 8 o la reivindicación 9.

11. Una célula que contiene una molécula de ARN que comprende el cebador oligonucleotídico de iniciación con caperuza de la reivindicación 8 o la reivindicación 9.

12 Un método para producir una célula que contiene una proteína traducida a partir de una molécula de ARN que comprende el cebador oligonucleotídico de iniciación con caperuza de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que comprende la introducción de dicha molécula de ARN que contiene el cebador oligonucleotídico de iniciación con caperuza en una célula que utiliza dicha molécula de ARN para producir dicha proteína.

13. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de ARN de la reivindicación 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

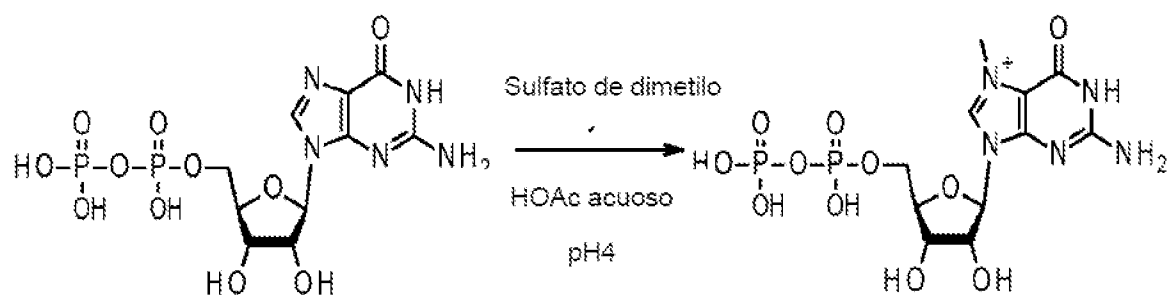


Figura 2

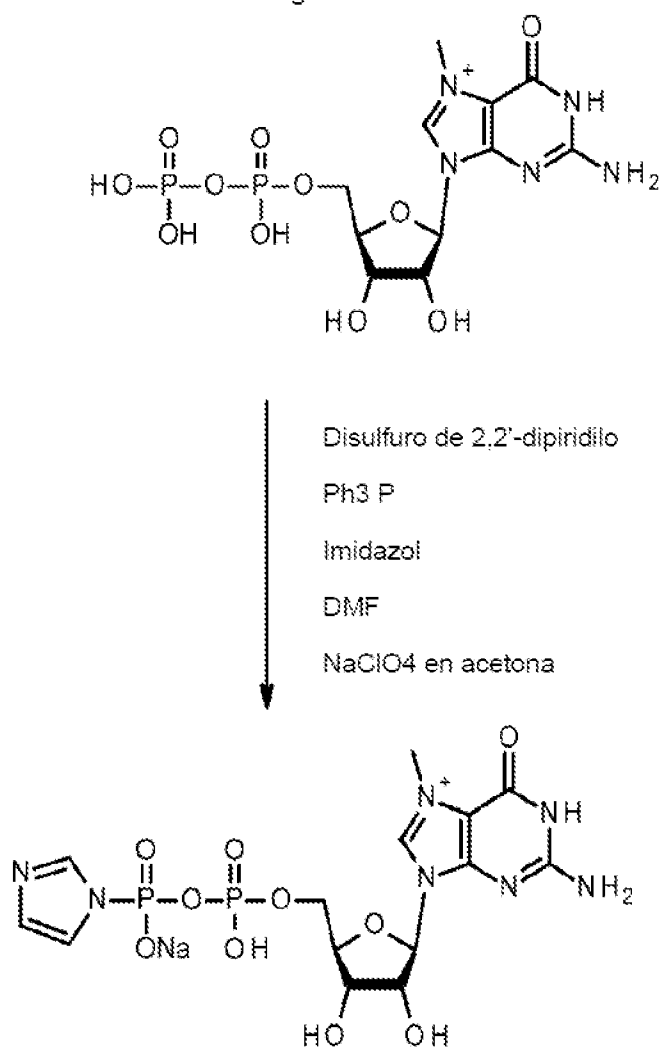


Figura 3

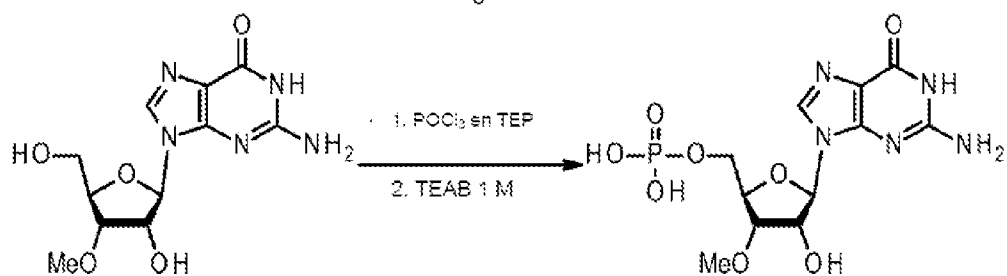


Figura 4

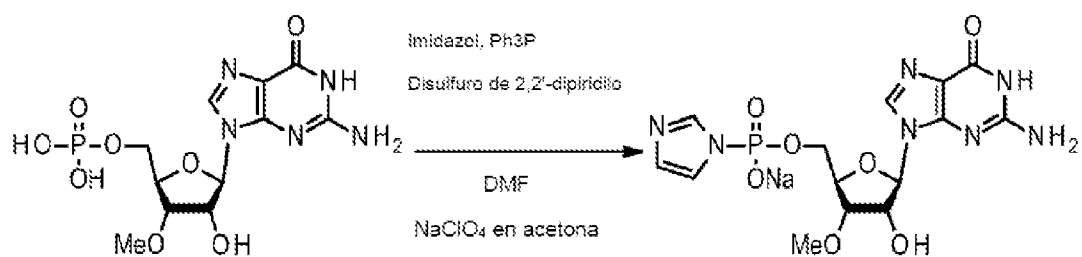


Figura 5

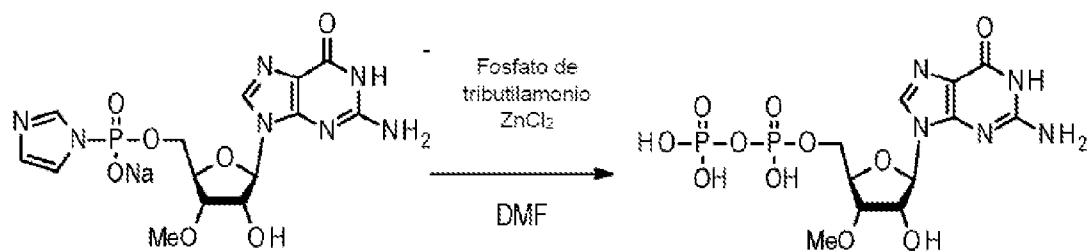


Figura 6

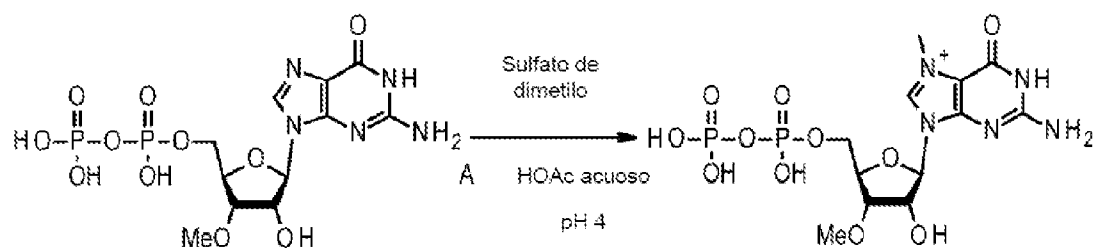


Figura 7

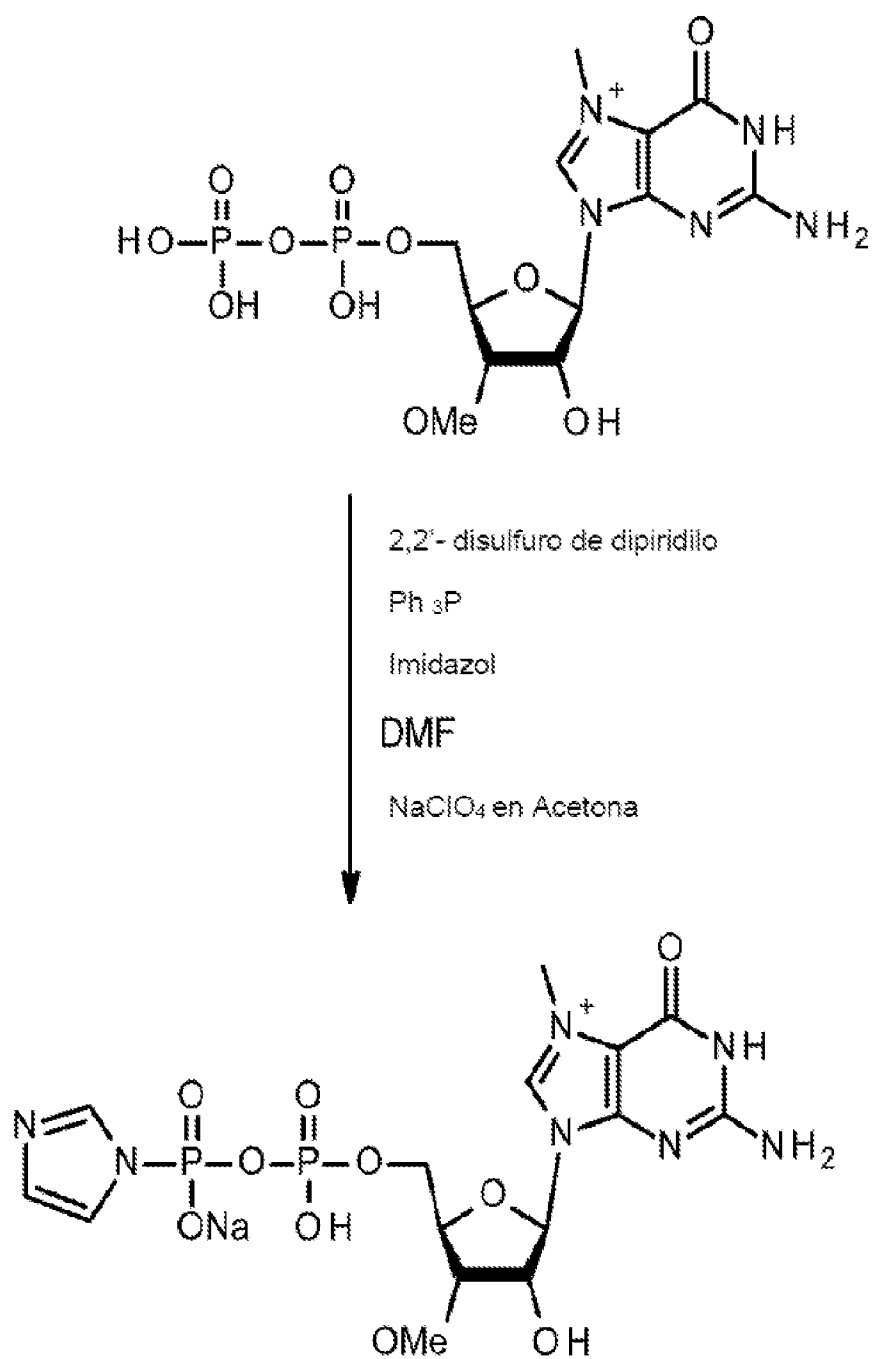
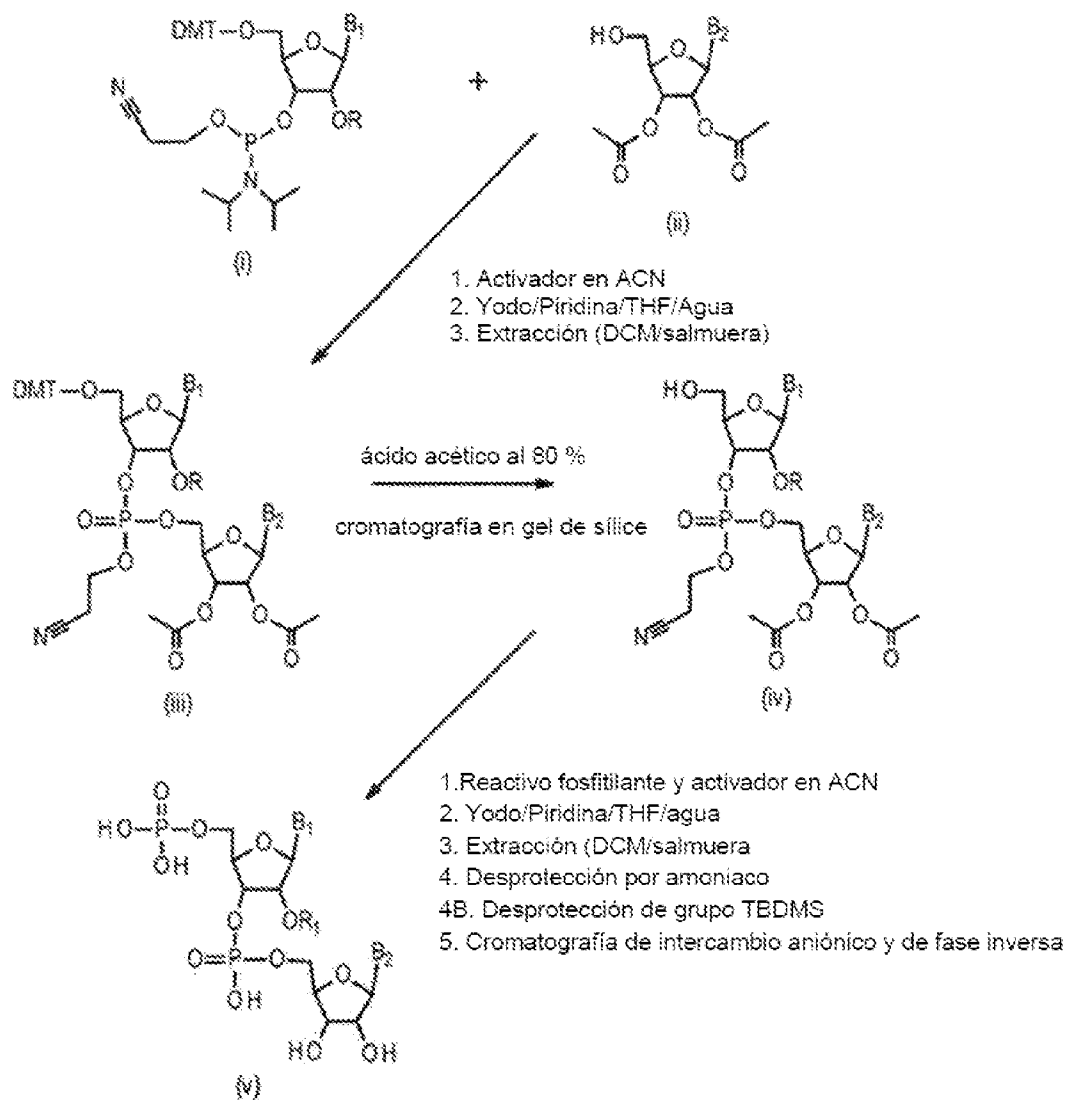


Figura 8



B₁ y B₂ son bases nucleosídicas debidamente protegidas o no protegidas

R = Me o TBDMS; R₁ = Me o H

Figura 9

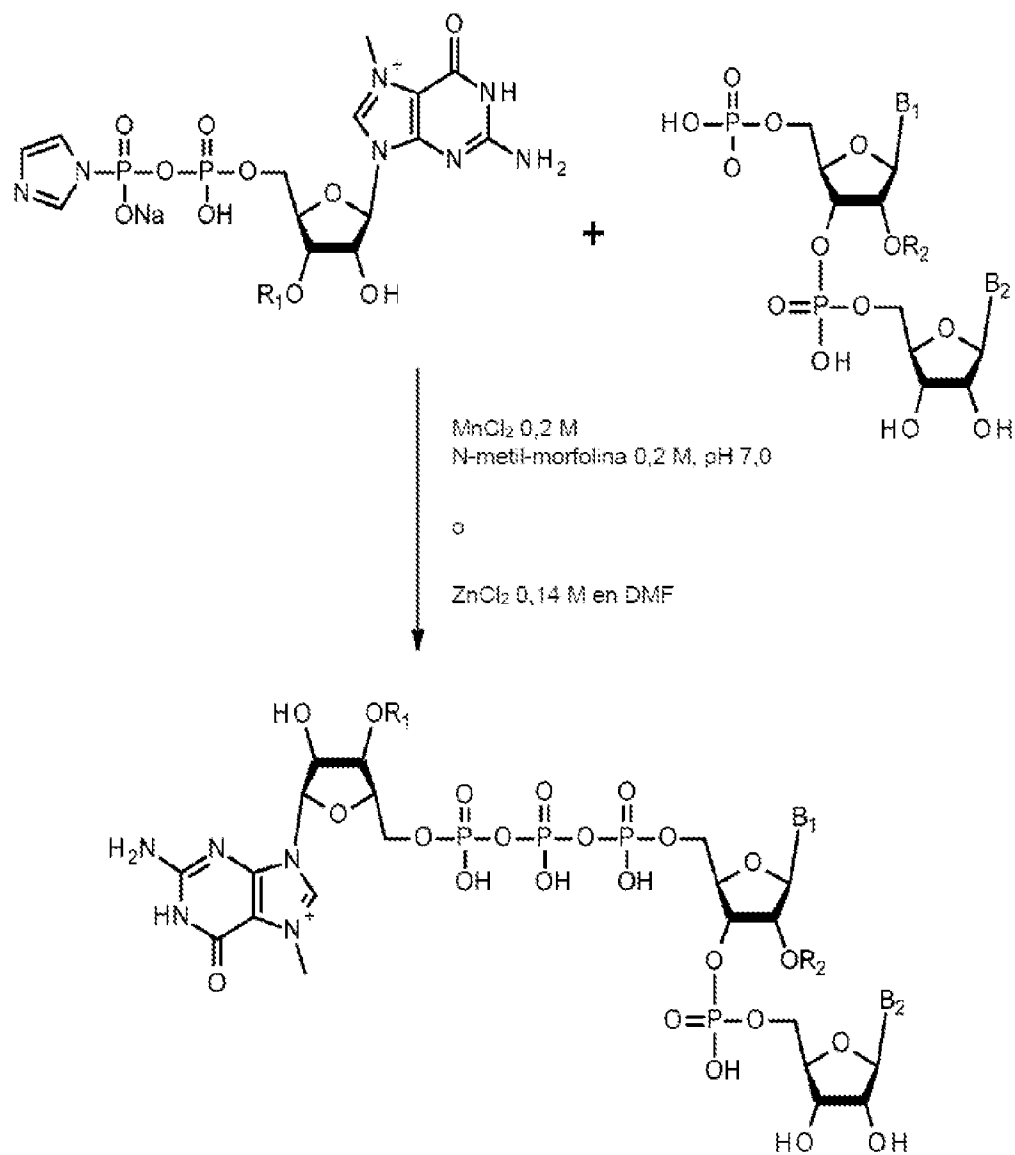


Figura 10A

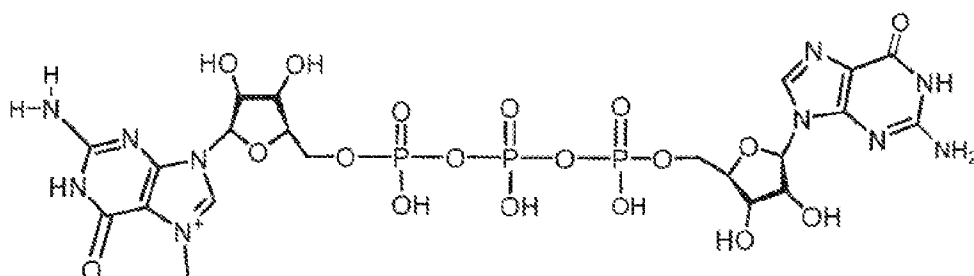


Figura 10B

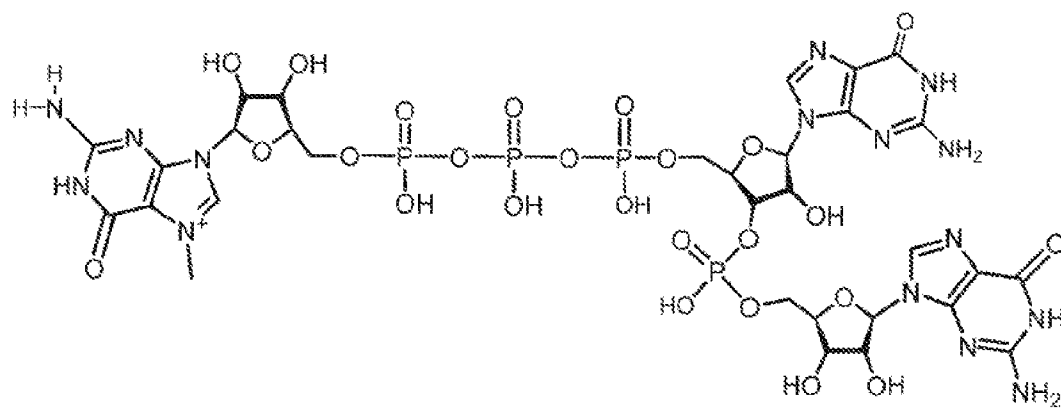


Figura 10C

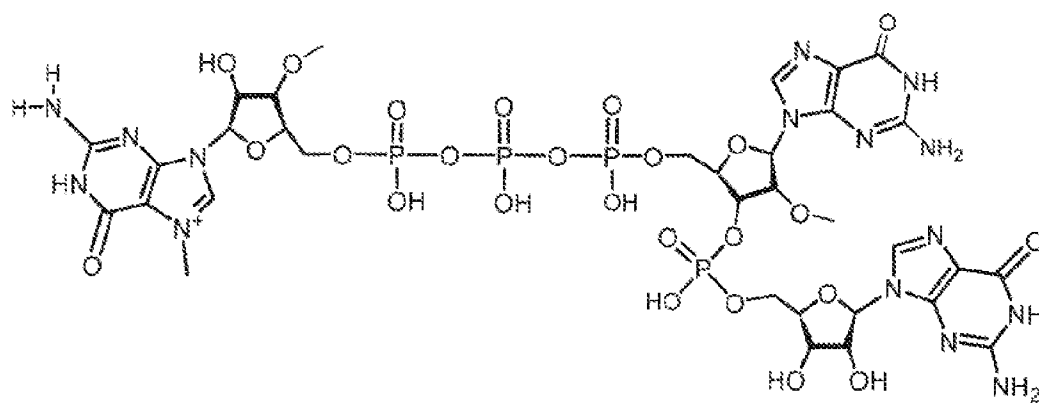


Figura 10D

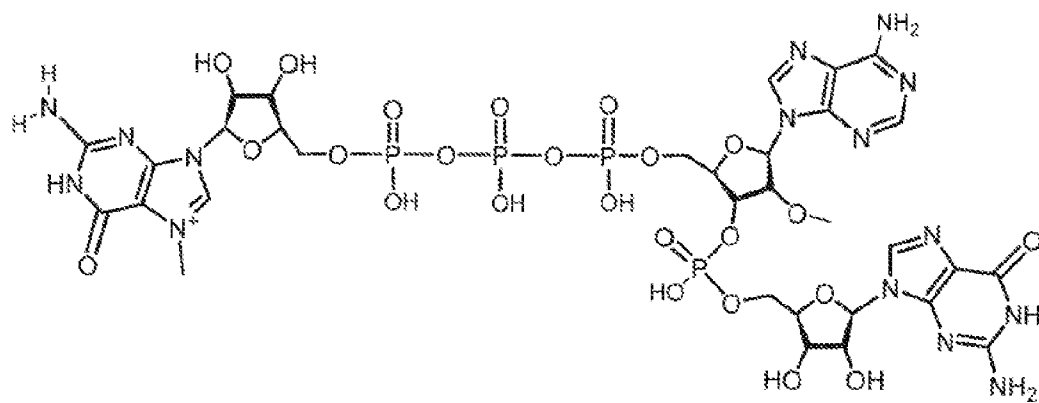


Figura 10E

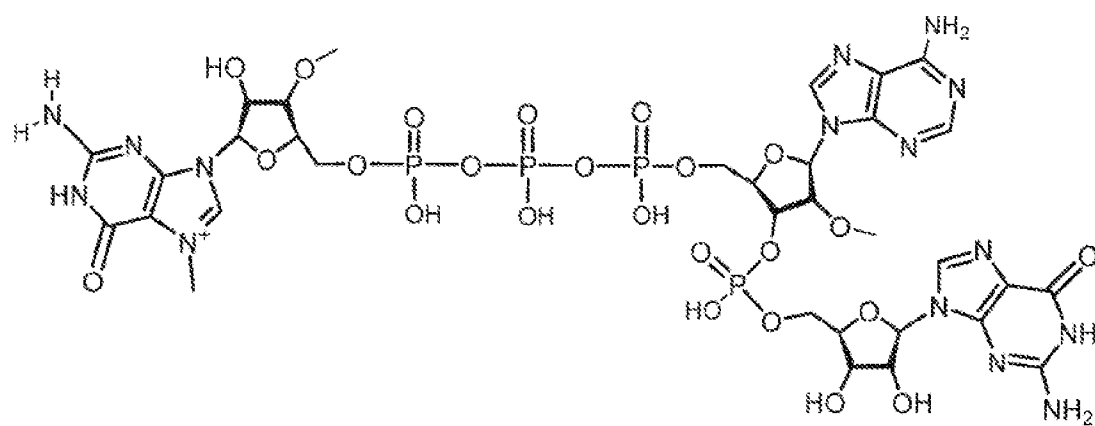


Figura 10F

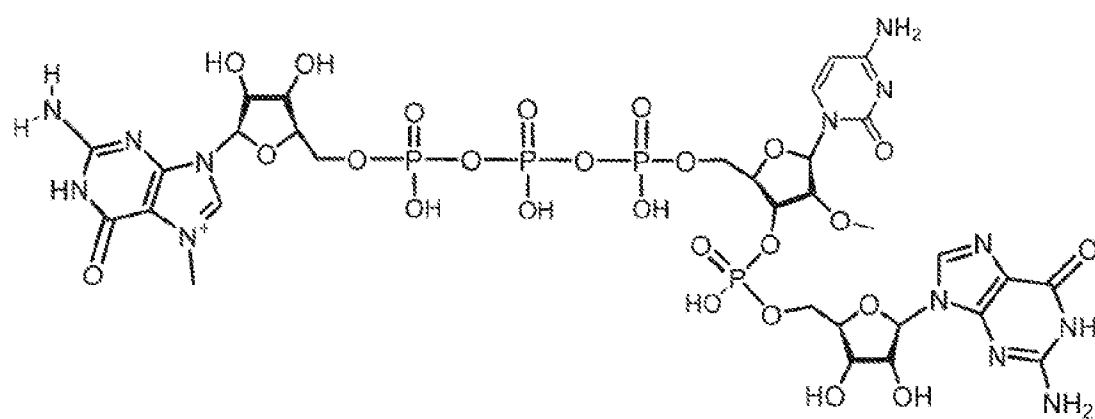


Figura 10G

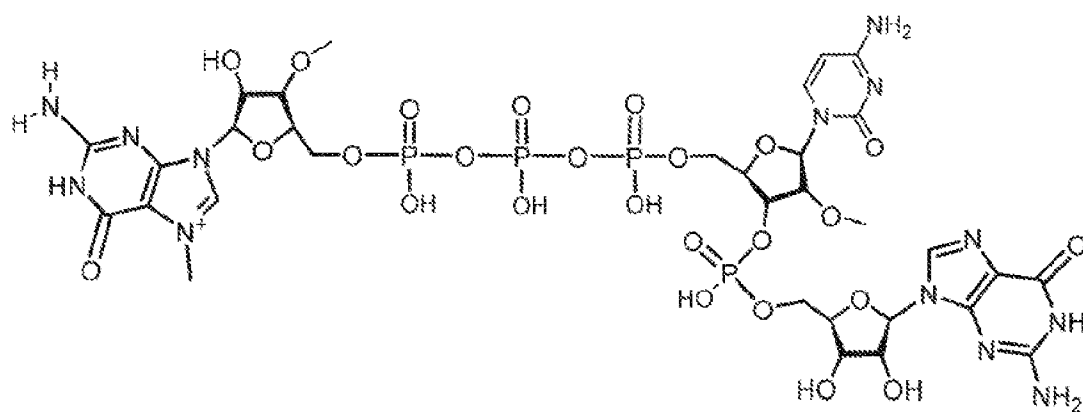


Figura 10H

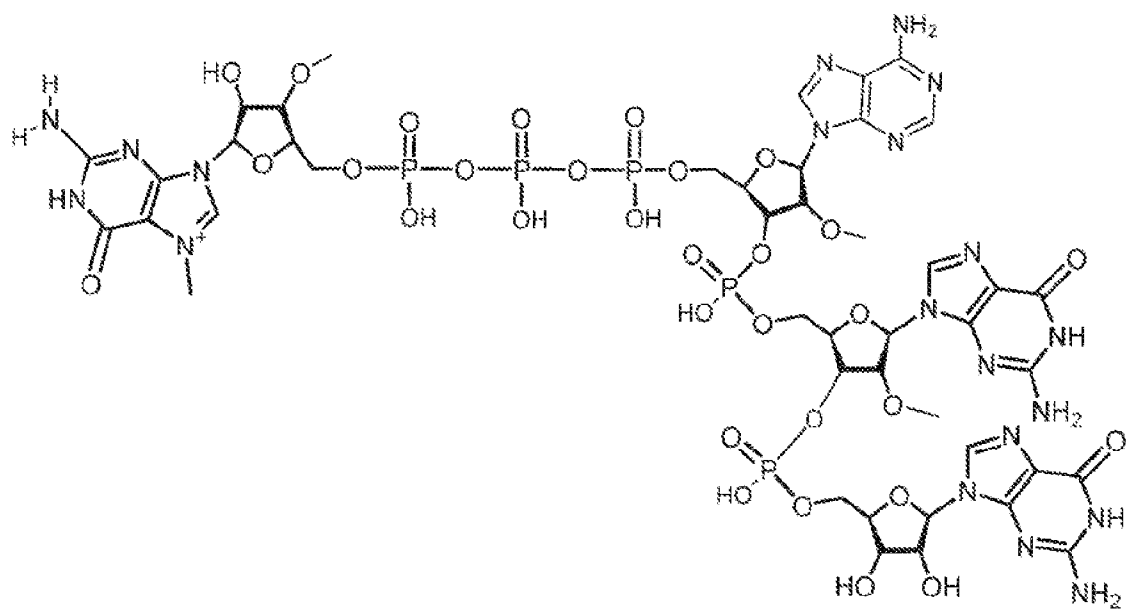
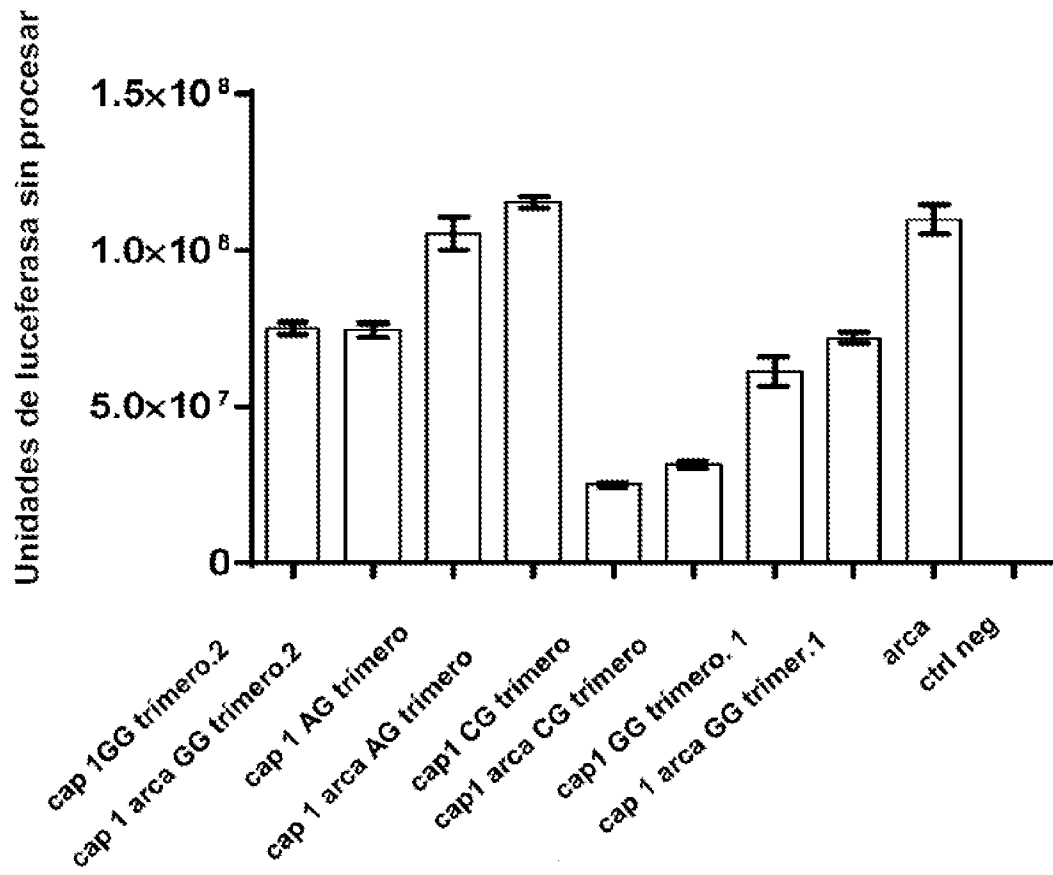


Figura 11



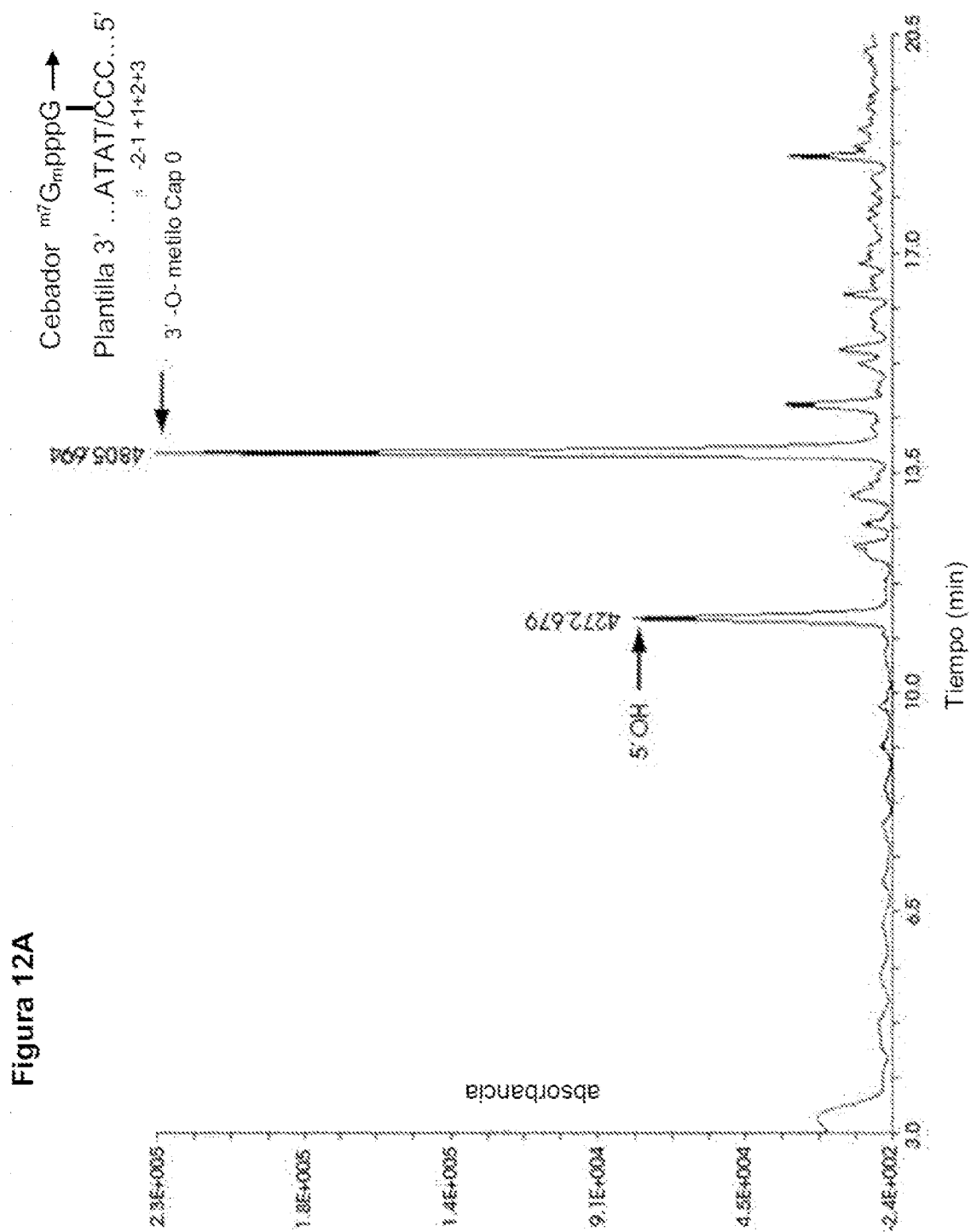


Figura 12B

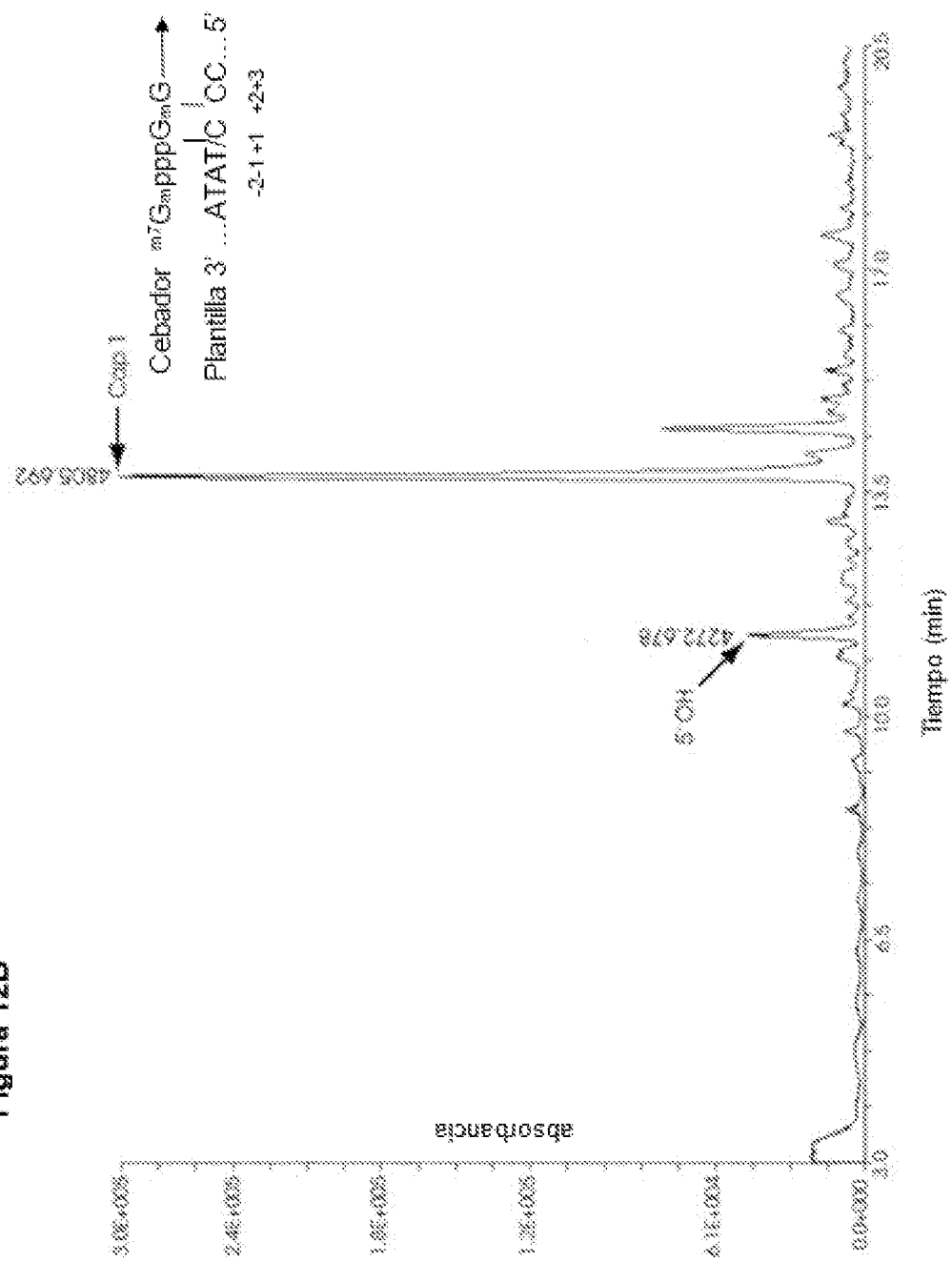


Figura 12 C

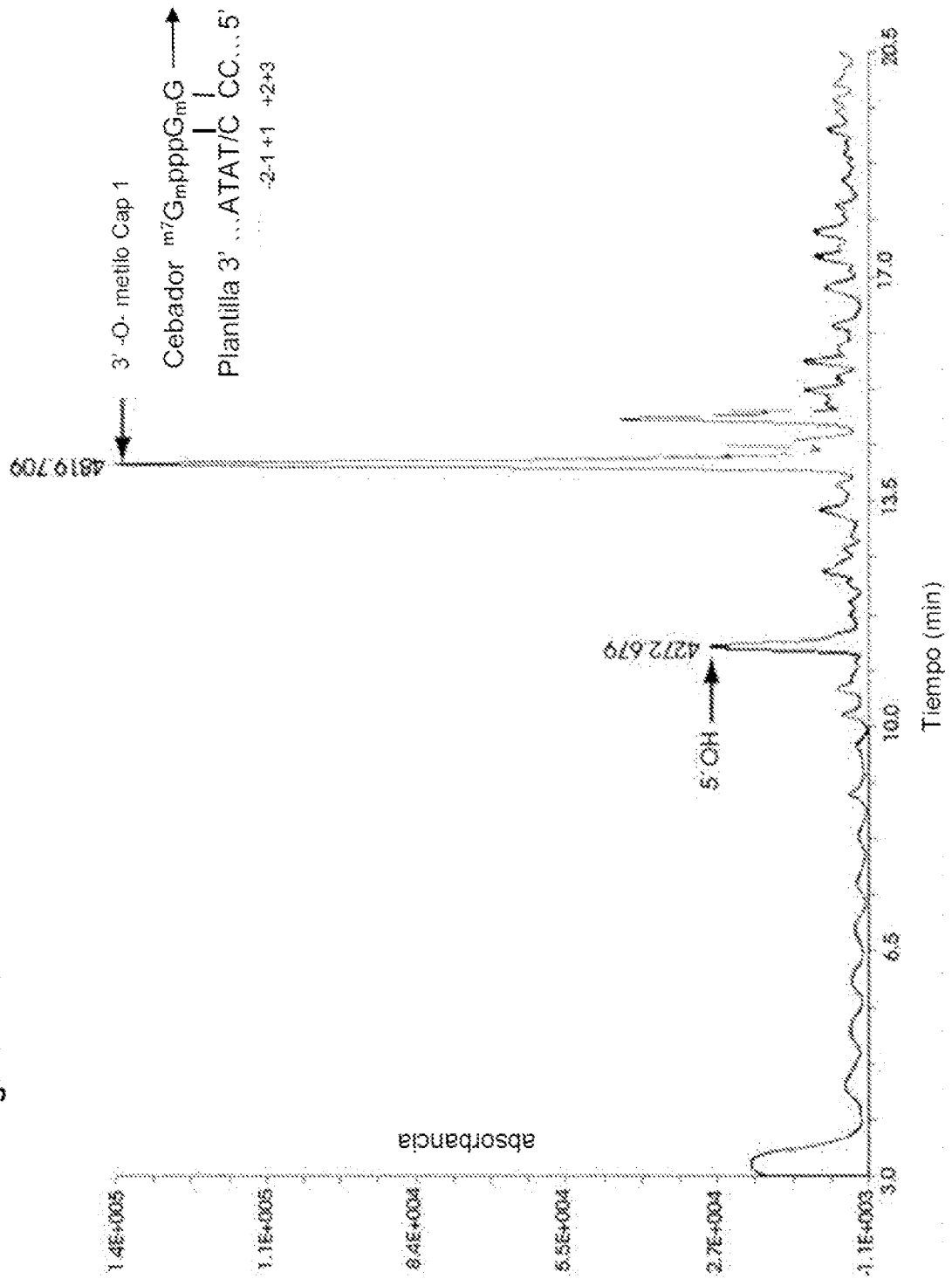
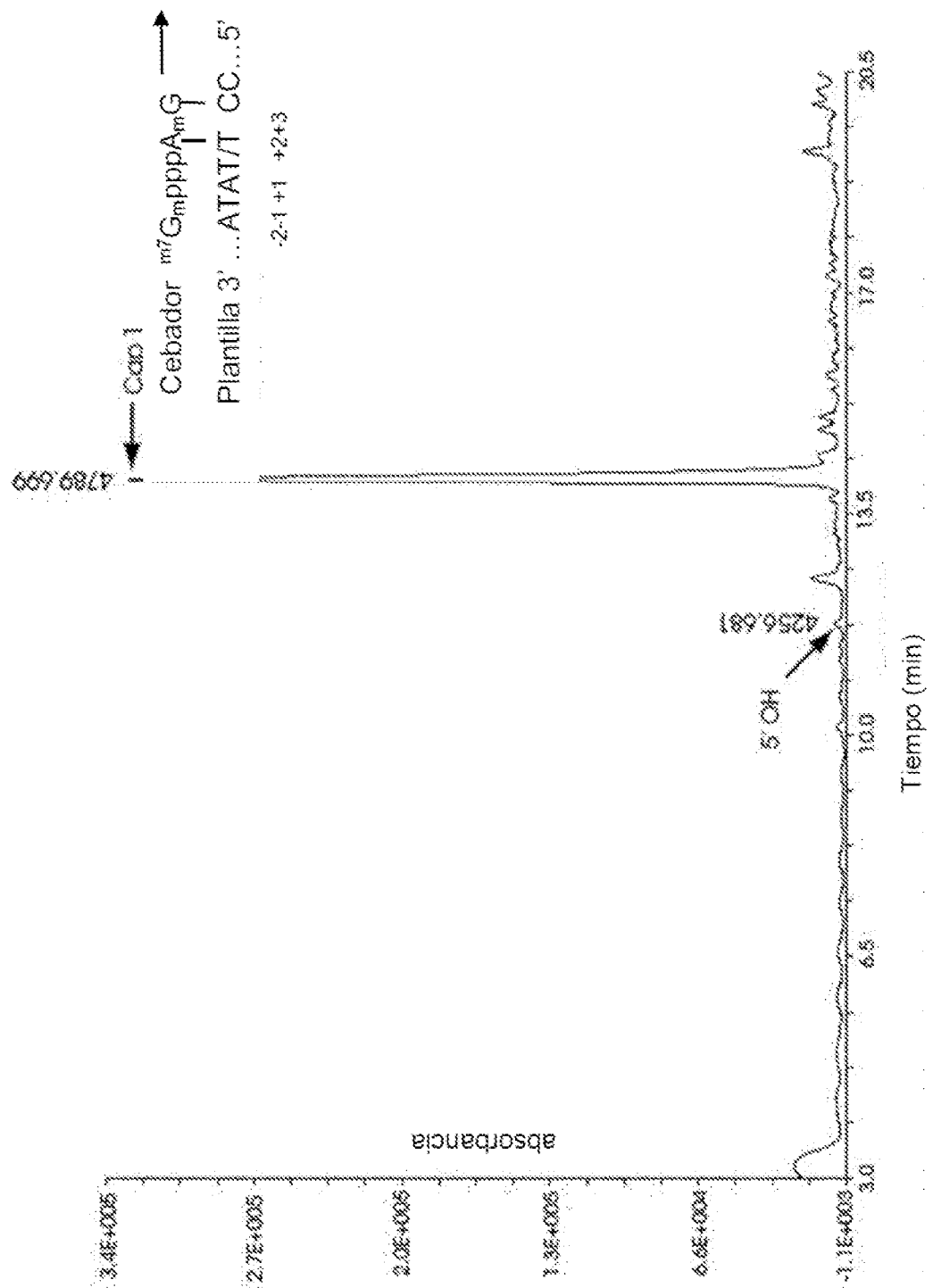


Figura 12 D



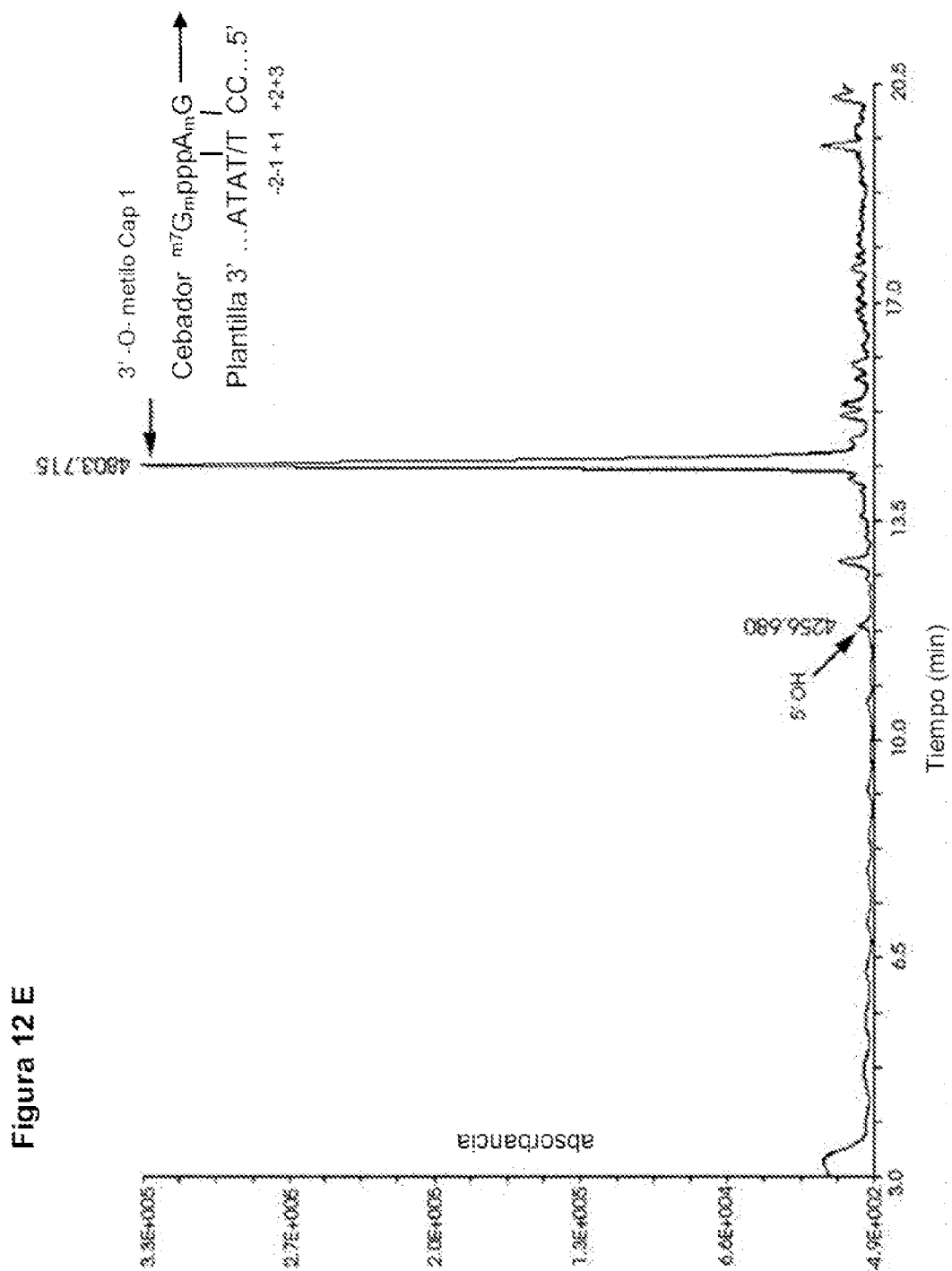


Figura 12 F

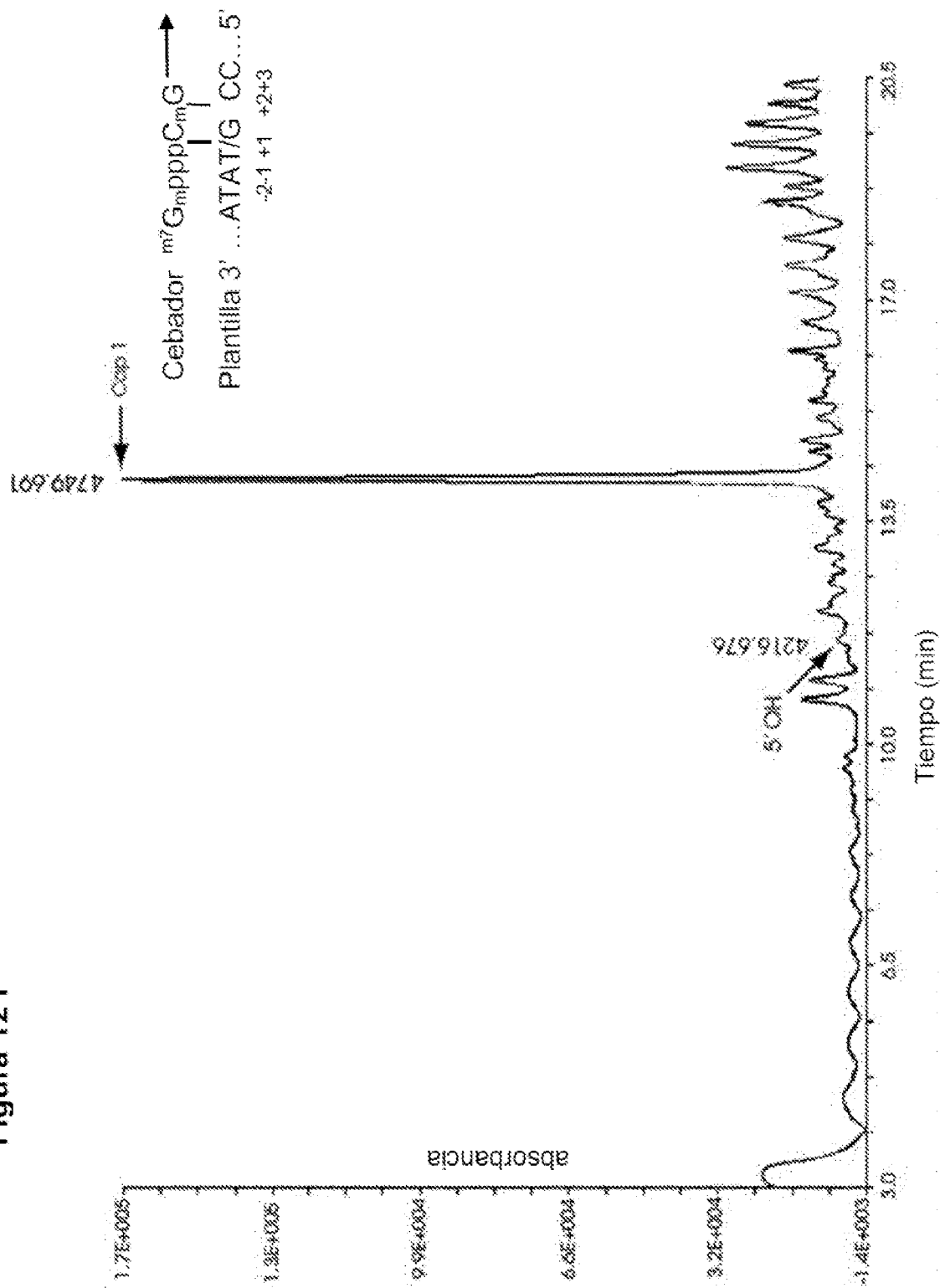


Figura 12 G

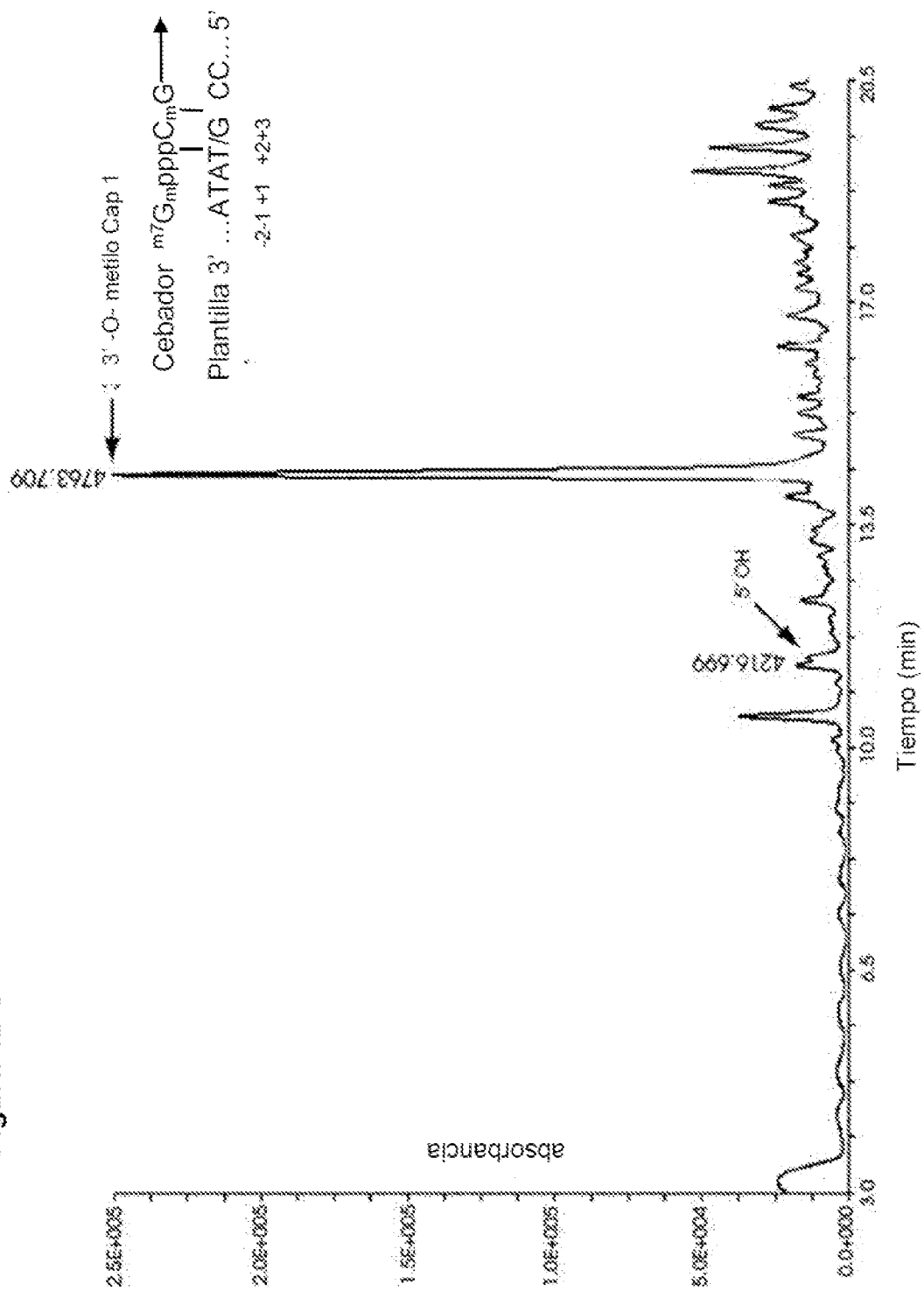


Figura 12 H

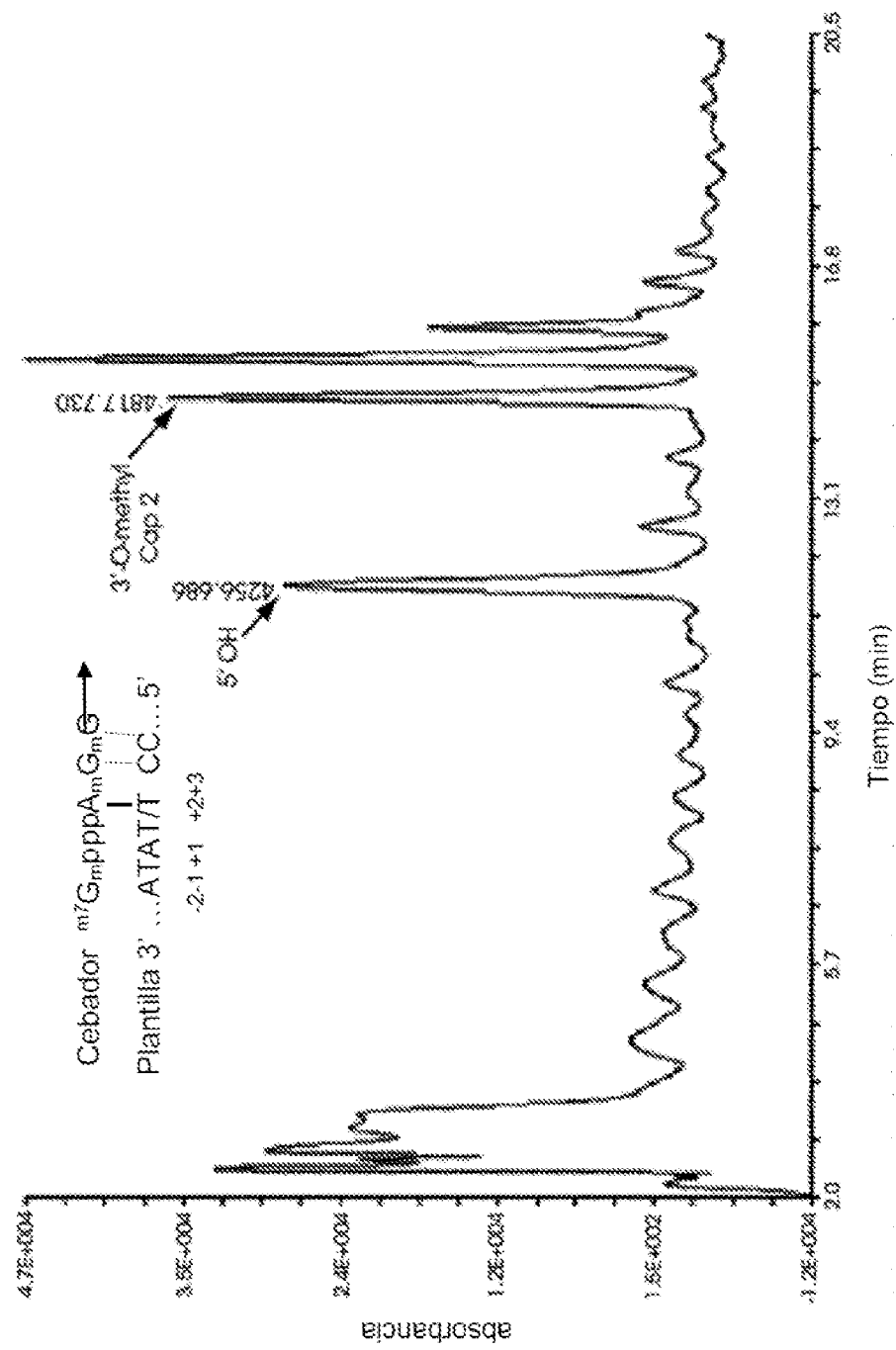


Figura 13 A

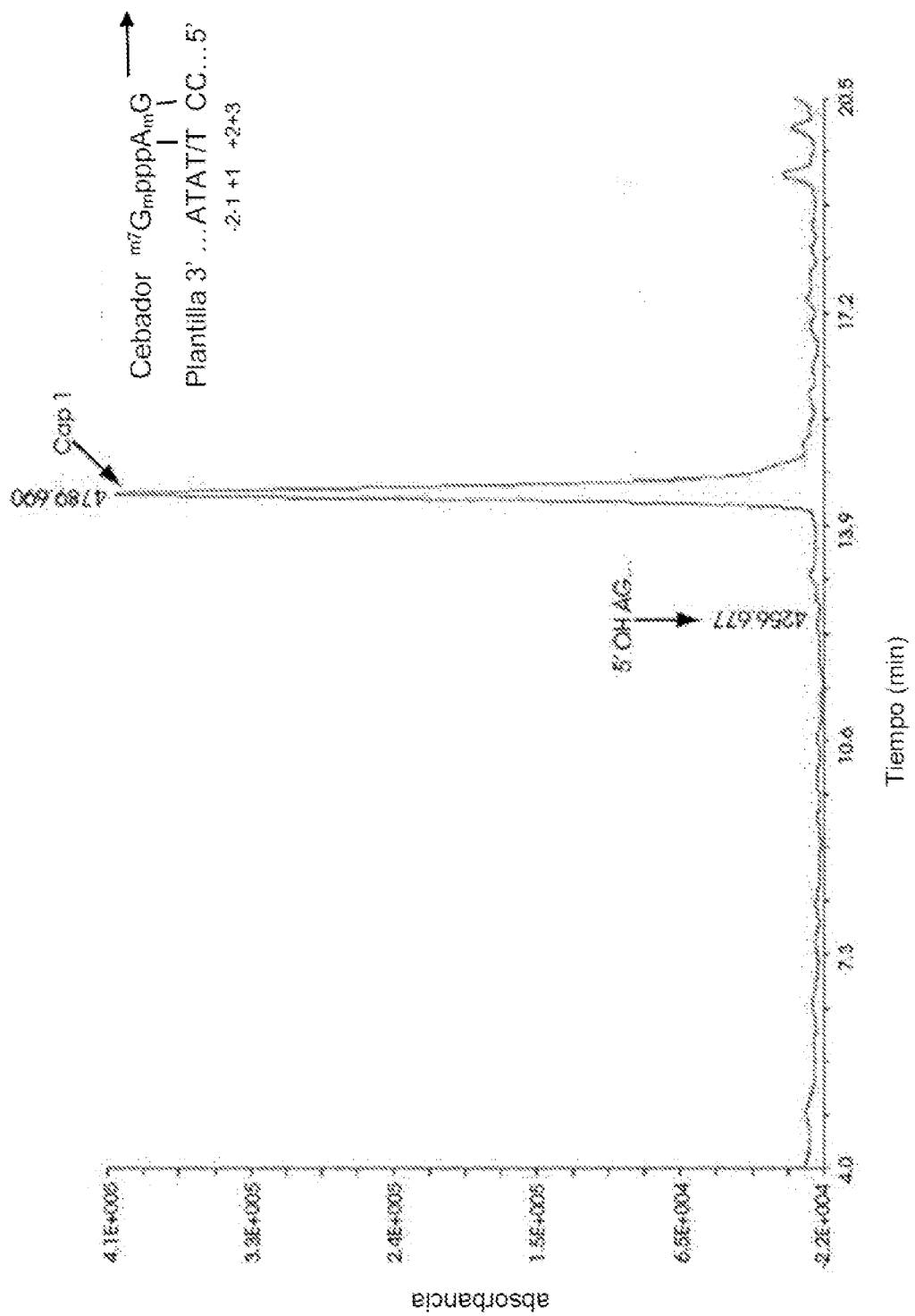


Figura 13 B

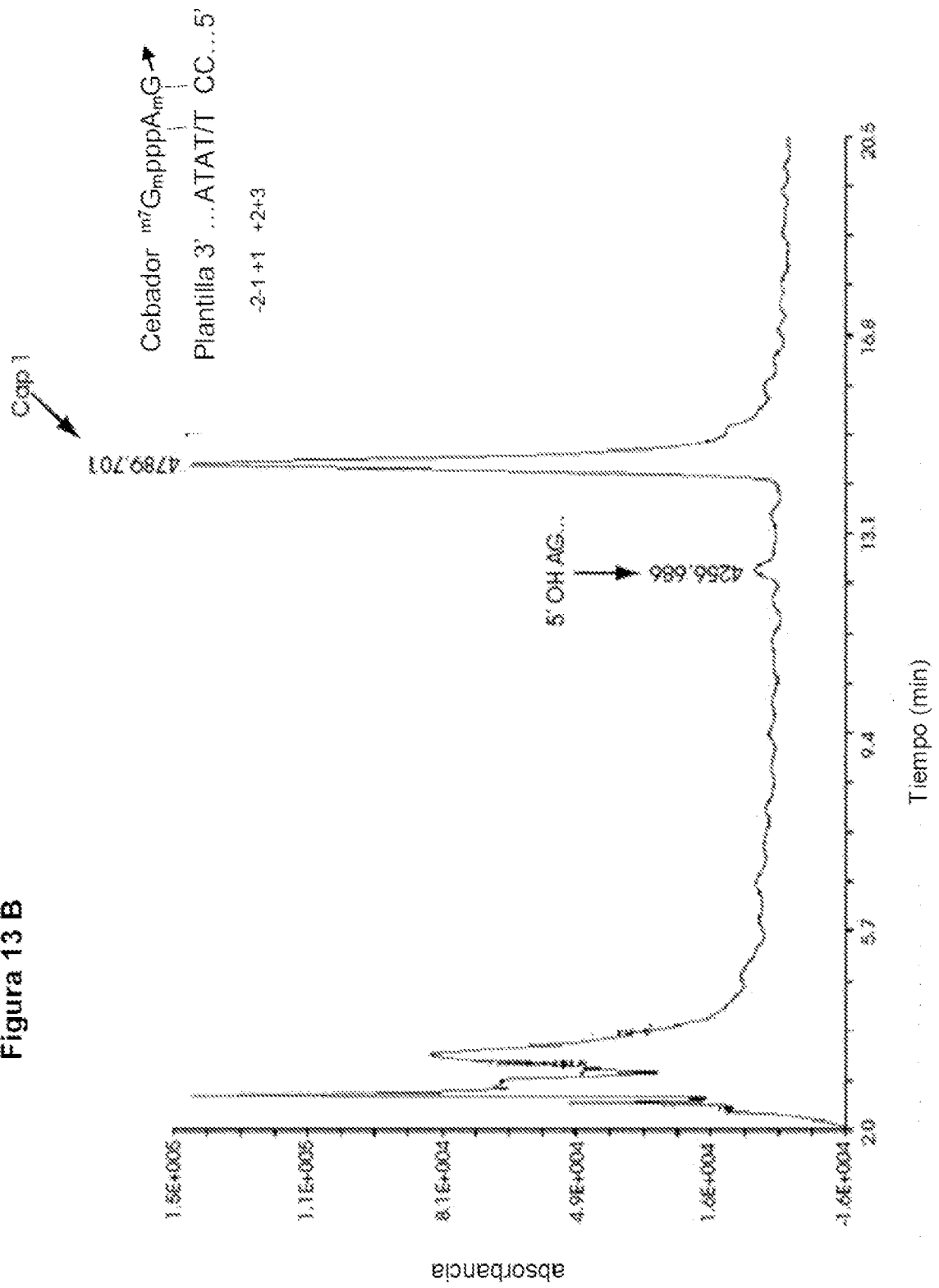


Figura 13 C

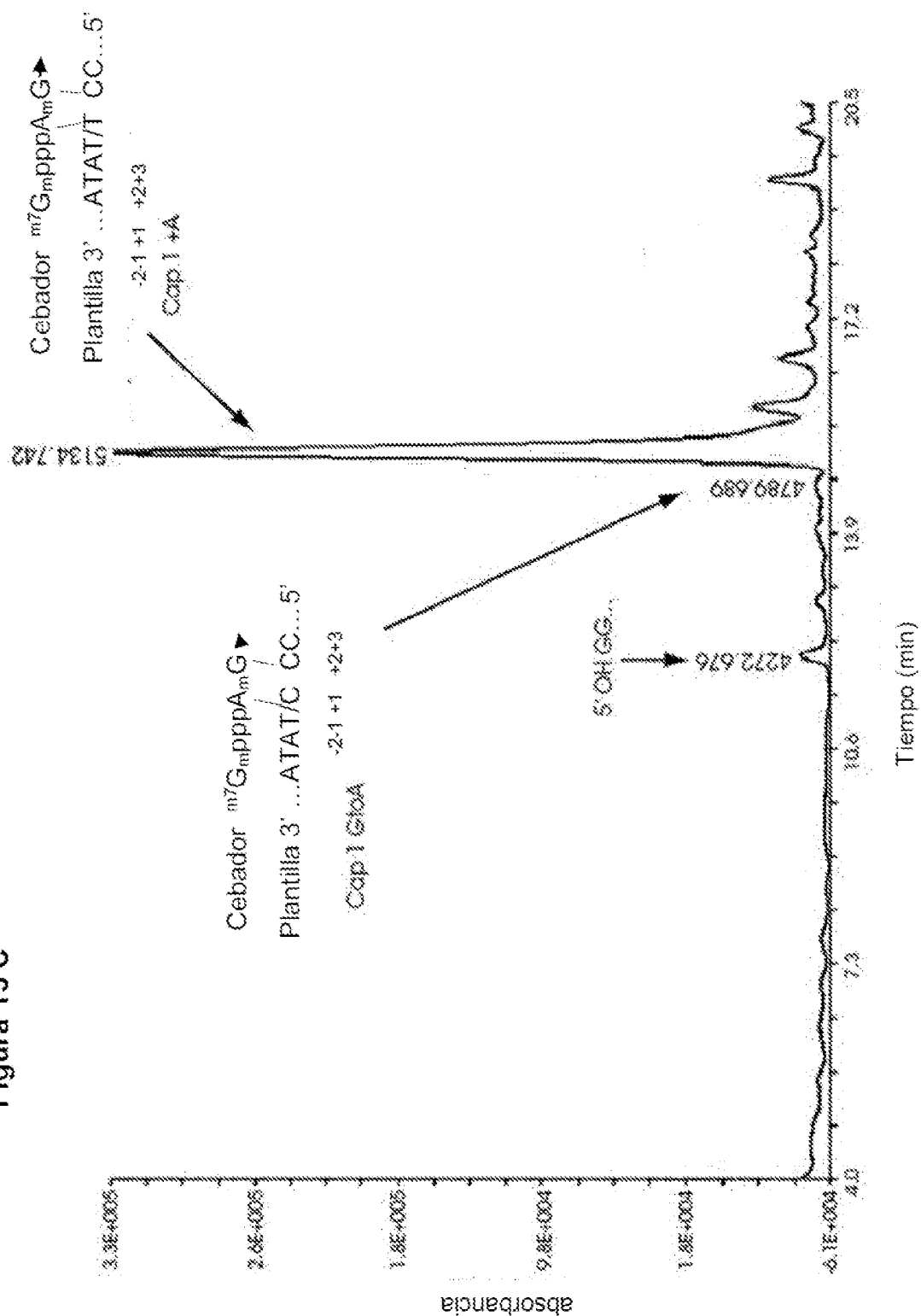


Figura 13 D

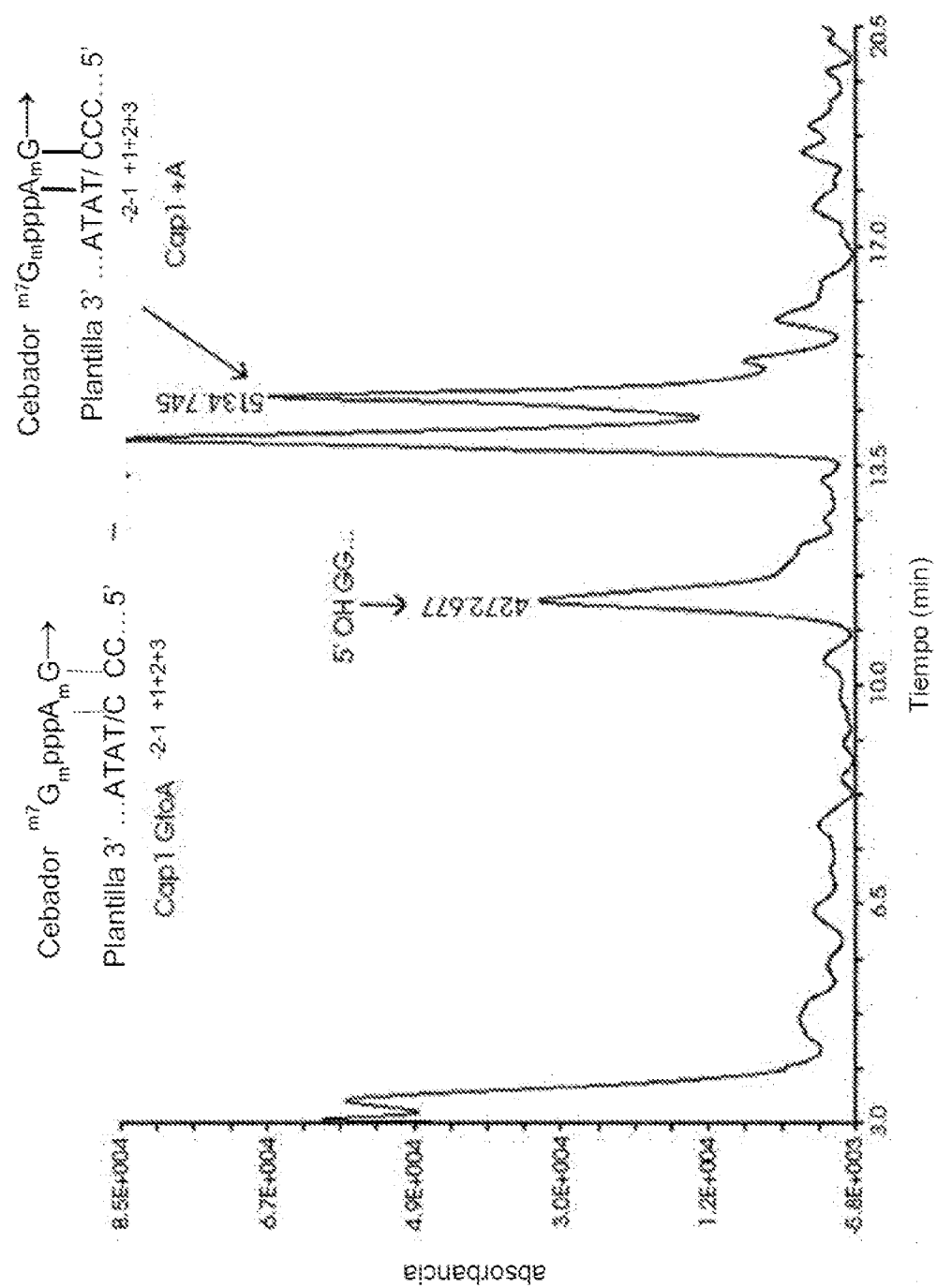


Figura 14 A

**Transfección de Células THP-1
(100 ng ARNm de Fluc)**

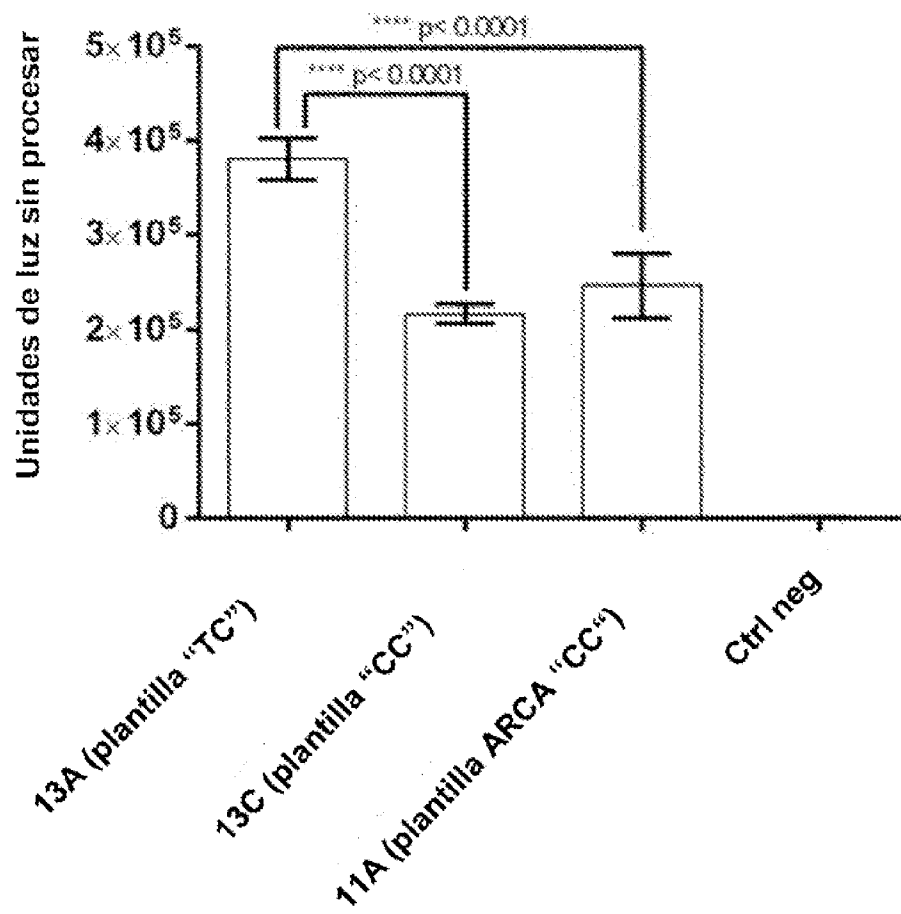


Figura 14 B

**Transfección de Células THP-1
(100 ng ARNm de Fluc)**

