

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 802**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/00** (2006.01)  
**A61K 31/7084** (2006.01)  
**A61K 31/7115** (2006.01)  
**A61K 31/712** (2006.01)  
**A61K 31/7125** (2006.01)  
**C07H 21/02** (2006.01)  
**A61P 21/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2017** **PCT/IB2017/050447**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017** **WO17130151**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2017** **E 17712541 (6)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021** **EP 3408276**

54 Título: **Análogos de extremo 5' (caperuza) de ARNm 5'-fosforotiolato, ARNm que comprende los mismos, método de obtención y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**29.01.2016 PL 41596716**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.11.2021**

73 Titular/es:

**UNIWERSYTET WARSZAWSKI (100.0%)**  
**ul. Krakowskie Przedmiescie 26/28**  
**00-927 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**JEMIELITY, JACEK;**  
**FAC-DABROWSKA, KAJA;**  
**WOJTCZAK, BLAZEJ;**  
**BARANOWSKI, MAREK;**  
**NOWICKA, ANNA;**  
**KOWALSKA, JOANNA;**  
**SIKORSKI, PAWEL y**  
**WARMINSKI, MARCIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 879 802 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

Análogos de extremo 5' (caperuza) de ARNm 5'-fosforotiolato, ARNm que comprende los mismos, método de obtención y usos de los mismos

### Campo técnico

La presente invención se refiere a análogos del extremo 5' (caperuza) de ARNm que contienen una fracción 5'-fosforotiolato y usos de los mismos.

Los análogos de caperuza 5'-fosforotiolato se usan como inhibidores de la enzima de DcpS lo que permite su aplicación como una medicina, en especial para el tratamiento de atrofia muscular espinal (AME). La presente invención también se refiere a ARNm modificado en el extremo 5' con análogos del extremo 5' (caperuza) del ARNm que contienen una fracción 5'-fosforotiolato según la invención, en donde la modificación se dirige a obtener transcritos de ARNm con una estabilidad y actividad de traducción aumentadas en condiciones celulares. Los transcritos con tales propiedades son aplicables en terapias génicas novedosas basadas en ARNm.

### Antecedentes técnicos

Los análogos del extremo 5' del ARNm químicamente derivados tienen una variedad de usos, y las modificaciones implementadas en esta estructura pueden modificar significativamente las propiedades biológicas de estos compuestos (Ziemniak, Strenkowska et al., 2013). Entre las varias aplicaciones de análogos de caperuza, las más frecuentes implican su uso como inhibidores de bajo peso molecular de procesos dependientes de la caperuza para fines terapéuticos (por ejemplo, inhibición de la enzima DcpS – terapia de atrofia muscular espinal). Por otra parte, los análogos de caperuza dinucleotídicos adecuadamente modificados se usan para modificar ARNm mensajero por cotranscripción *in vitro*, con el fin de obtener transcritos con estabilidad y actividad de traducción mejoradas en condiciones celulares. Los transcritos con tales propiedades se estudian cada vez más en el contexto de terapias génicas novedosas basadas en ARNm. En el último caso, la resistencia de las estructuras de la caperuza a otra enzima anticaperuza, Dcp2, es un asunto clave.

La enzima DcpS (secuestrante anticaperuza) es una enzima implicada en el proceso de degradación de ARNm en eucariotas. Hay dos rutas principales de degradación de ARNm en células eucariotas, la degradación 5'→3' y la degradación 3'→5' (Rydzik, Lukaszewicz et al., 2009). Ambas rutas de degradación se inician por desadenilación. La degradación en dirección 5'→3' está seguida por eliminación de la caperuza del ARNm como resultado del corte del enlace entre los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$ , y degradación por 5'-exonucleasa. La degradación 3'→5' implica degradación de ARNm por exosoma empezando desde el extremo 3'. Tal degradación produce una liberación de residuos de la caperuza dinucleotídicos u oligonucleótidos cortos de finalización de la caperuza, que después son degradados por la enzima DcpS. DcpS pertenece a las pirofosfatasa de la familia HIT e hidroliza la caperuza entre los fosfatos  $\gamma$  y  $\beta$  liberando 7-metilguanosina 5-monofosfato ( $m^7GMP$ ) y un segundo producto, que es en consecuencia un nucleósido 5'-difosfato o un oligonucleótido corto. Los ARNm terminados con caperuzas más largas no son sustratos para DcpS. Tampoco 7-metilguanosina 5'-difosfato ( $m^7GDP$ ), que es un producto de la degradación de ARNm 5'→3', es un sustrato para DcpS. Una actividad de la enzima DcpS se considera vital para la homeostasis celular, ya que residuos de la caperuza innecesarios liberados del ARNm durante la degradación 3'→5' podrían afectar adversamente otros procesos celulares dependientes de la caperuza. DcpS está localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde puede estar implicada en regulación del ajuste (Shen, Liu et al., 2008). Por tanto, se sugirió que el papel de DcpS en la célula va más allá de sus funciones bien caracterizadas en la degradación del ARNm 3'→5' (Bail y Kiledjian 2008).

Se describió en 2008 que la inhibición de DcpS puede proporcionar un efecto terapéutico en atrofia muscular espinal. La AME es una enfermedad neurodegenerativa común que se produce de media una vez cada 6000 nacimientos (Akagi y Campbell 1962). Está producida por bajos niveles de proteína SMN (supervivencia de motoneurona), que está codificada por los genes *SMN*. Dos genes *SMN*, es decir, *SMN1* y *SMN2*, están presentes en seres humanos. La principal diferencia entre ellos es un cambio de secuencia en el exón 7, que afecta el ajuste del pre-ARNm. Como resultado, una expresión del gen *SMN1* produce una proteína estable y funcional, mientras que la proteína expresada de *SMN2* está acortada. Mutaciones en ambas copias del gen *SMN1*, incluyendo delecciones, conversiones a gen de tipo *SMN2* y mutaciones puntuales, producen enfermedad AME. Las personas que tienen solo una copia de *SMN1* defectuosa son portadores de AME, pero no muestran ningún síntoma de la enfermedad.

El gen *SMN2* homólogo no puede proporcionar suficientes cantidades de proteína SMN funcional, pero se observó que mayor número de copias del gen *SMN2* está acompañado por un curso más benigno de la enfermedad. Por tanto, se cree que compuestos que aumentan la cantidad de proteína codificada por el gen *SMN2* en una célula pueden ser terapéuticos contra AME. Se encontró que algunas quinazolininas 5-sustituidas pueden aumentar la expresión del gen *SMN2* incluso dos veces (Akagi y Campbell, 1962). Intentando desentrañar el mecanismo molecular que subyace a esta activación, en otro estudio usando marcaje radioactivo, los autores identificaron DcpS como la proteína que se une a quinazolinina 5-sustituida.

Estos experimentos permitieron identificar DcpS como una diana terapéutica en el tratamiento de AME.

Estudios adicionales indicaron que varias quinazolininas C5-sustituidas son potentes inhibidores de la enzima DcpS (ya a concentraciones nanomolares), y que el potencial inhibidor está correlacionado con el nivel de activación del promotor del gen *SMN2*. El potencial terapéutico de estos compuestos se demostró después *in vivo* en un modelo de ratón (Butchbach, Singh et al., 2010). Se describió recientemente que uno de los inhibidores de DcpS, compuesto RG3039, mejora la función motora en ratones con AME (Van Meerbeke, Gibbs et al.).

A pesar de ensayos preclínicos y clínicos en marcha, todavía no hay tratamiento eficaz de AME, por tanto, hay una necesidad continua para nuevos compuestos con potencial terapéutico.

Los análogos de caperuza dinucleotídicos con modificaciones en el puente trifosfato y 7-metilguanosina ribosa se pueden usar para la síntesis de moléculas de ARN con caperuza *in vitro*. El método es útil puesto que permite obtener moléculas de ARN con propiedades biológicas mejoradas, en particular, una actividad de traducción aumentada y semivida prolongada en células (Grudzien, Kalek et al., 2006). Estas dos características producen, que se obtenga una cantidad significativamente mayor de proteína mientras que se utiliza la misma cantidad de ARNm. Esto puede encontrar una amplia gama de aplicaciones tanto en investigación, como para la producción comercial de péptidos y proteínas, incluyendo aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en inmunoterapia contra el cáncer (Sahin, Kariko et al., 2014).

El método más común usado para obtener ARNm con caperuza *in vitro*, es la síntesis de ARNm en moldes de ADN usando ARN polimerasa bacteriana o de bacteriófago en presencia de los cuatro ribonucleósidos trifosfatos y un dinucleótido de caperuza tal como (m<sup>7</sup>GpppG). La polimerasa inicia la transcripción por ataque nucleofílico de 3'-OH de la fracción Guo en m<sup>7</sup>GpppG sobre el fosfato alfa del siguiente nucleósido trifosfato transcrito, produciendo m<sup>7</sup>GpppGpN como un producto inicial (Contreras y Fiers 1981, Konarska, Padgett et al., 1984).

La cantidad de proteína producida por un ARNm sintético introducido a un cultivo de células de mamífero está limitada por la degradación del ARNm en condiciones celulares. La degradación de ARNm *in vivo* se inicia principalmente por la eliminación de caperuza del extremo 5' del ARNm por una pirofosfatasa específica Dcp1/Dcp2 que corta el enlace entre los fosfatos alfa y beta (Mildvan, Xia et al., 2005). La enzima Dcp2, que forma un complejo con una proteína reguladora Dcp1, es responsable de cortar la estructura de la caperuza de los transcritos de longitud completa o de fragmentos de al menos 20 nucleótidos de los mismos (Lykke-Andersen 2002). El complejo Dcp1/Dcp2 desempeña un papel clave en la regulación de la expresión génica. Hacer los transcritos de ARN en la caperuza resistente a esta actividad enzimática produce una expresión aumentada de la proteína codificada por tal ARNm modificado (Ziemniak, Strenkowska et al., 2013). Cuando la modificación no altera simultáneamente las interacciones con un factor de iniciación de la traducción, entonces esto produce una actividad de traducción del ARNm aumentada. Los ARNm que tienen tales propiedades son deseables para aplicaciones terapéuticas incluyendo inmunoterapia contra el cáncer (Kuhn, Diken et al., 2010), reprogramación de células madre (Warren, Manos et al., 2010) o suplementación de proteínas formadas en las células en una forma defectuosa o en cantidades insuficientes. Las modificaciones en un puente trifosfato de una estructura de caperuza se conocen en la bibliografía, aumentando la resistencia a la enzima Dcp2. Estas incluyen, entre otras, análogos donde átomos de oxígeno en la posición del puente alfa-beta se sustituyeron con un grupo metileno, análogos donde el oxígeno no en el puente en la posición beta se sustituyó por un átomo de azufre o un grupo boranofosfato. En el caso del análogo con metileno, una estabilidad aumentada del ARNm no produjo un aumento en la eficacia de síntesis de proteína en las células, que probablemente se debía a afinidad disminuida a la proteína eIF4E (Grudzien, Kalek et al., 2006). En el caso de modificaciones no en el puente en posición beta, una resistencia aumentada a Dcp2 y afinidad aumentada a eIF4E produjo una actividad de traducción aumentada de tal ARNm modificado en las células (Grudzien-Nogalska, Jemielity et al., 2007) (Kowalska, Wypijewska del Nogal et al., 2014). Una característica común de todos los análogos de caperuza que tras la incorporación a ARNm demostraron susceptibilidad reducida a degradación por Dcp2 era la localización de la modificación cerca del sitio de corte de la caperuza por la enzima, es decir, la posición alfa-beta en el puente trifosfato.

Algunos resultados de trabajos anteriores de los inventores también se han divulgado en solicitudes de patente anteriores.

El documento WO 2008/157688 divulga análogos de caperuza de ARNm. Sin embargo, los compuestos divulgados en dicho documento poseen todos átomos de oxígeno 5'.

El documento EP 2 281 579 A1 se refiere a la modificación de ARN con otros análogos de 5'-caperuza, con el fin de mejorar la estabilidad y aumentar la expresión de dicho ARN, en particular en células presentadoras de antígenos inmaduras. Sin embargo, los compuestos divulgados en dicho documento no poseen ningún átomo de azufre.

El documento WO 2009/149253 divulga análogos de caperuza dinucleotídicos, que se han modificado en diferentes posiciones de fosfato con un grupo boranofosfato o un grupo fosforoselenoato. Los análogos son útiles como reactivos en la preparación de ARNm con caperuza y tienen estabilidad aumentada tanto *in vitro* como *in vivo*. Se pueden usar como inhibidores de traducción dependiente de la caperuza.

### Divulgación de la invención

Considerando el estado de la técnica descrito, el fin de la presente invención es superar las desventajas indicadas y proporcionar una nueva clase de análogos de extremo 5' de ARNm nucleotídicos que afectan la actividad DcpS, sus usos, incluyendo en tratamiento de AME, así como métodos para su síntesis.

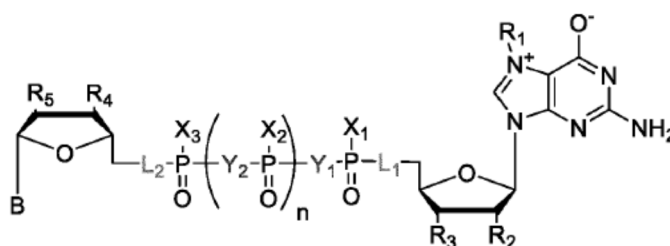
Otro fin de la invención es proporcionar ARNm modificado en el extremo 5' con análogos de extremo 5' (caperuza) de ARNm que contienen una fracción 5'-fosforotiolato, aumentando de esta manera la estabilidad del ARNm y la eficacia de biosíntesis de la proteína codificada por ese ARNm en las células. Otro fin de la invención es proporcionar ARNm modificado en el extremo 5' con análogos de extremo 5' (caperuza) de ARNm que contienen una fracción 5'-fosforotiolato, transcritos que se pretenden para uso como una medicina, incluyendo para uso en terapias génicas novedosas basadas en ARNm.

La presente invención se refiere a una clase novedosa de análogos de extremo 5' de ARNm nucleotídicos. Los nuevos análogos contienen un átomo de azufre en la posición de 5'-nucleósido, es decir, al menos uno de los átomos de oxígeno en posición 5' se sustituyó por un átomo de azufre. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que los nuevos análogos que contienen la modificación con el átomo de azufre en la posición 5' desde el lado de 7-metilguanosina son resistentes a la actividad hidrolítica de la enzima DcpS, y son inhibidores de la enzima DcpS, afectando de esta manera la expresión de proteínas SMN, que es de relevancia terapéutica en el tratamiento de AME. Tales compuestos que son estables frente a la actividad de DcpS y/o afectan la actividad de DcpS también se usarán en la regulación de la degradación de ARNm, así como modulación y regulación de ajuste. Se encontró que los siguientes análogos eran particularmente preferidos desde el punto de vista de propiedades inhibidoras: m<sup>7</sup>GSpppG (no. 24), m<sup>7</sup>GSpppSG (no. 32), m<sup>7</sup>GSppspG D1 (no. 30), m<sup>7</sup>GSppspG D2 (no. 31), m<sup>7</sup>GSppspSG D1 (no. 33), m<sup>7</sup>GSppspSG D2 (no. 34), y el más preferido era m<sup>7</sup>GSppspSG D2 (no. 34). Los análogos m<sup>7</sup>GSpp (no. 12), m<sup>7</sup>GSppG (no. 23), m<sup>7</sup>GSppCH<sub>2</sub>pG (no. 25), m<sup>7,2</sup>O<sup>18</sup>GSpppG (no. 26), m<sup>7</sup>GSppCH<sub>2</sub>ppSG (no. 37) eran igualmente beneficiosos.

La presente invención también se refiere a ARNm modificado en el extremo 5' con análogos de extremo 5' (caperuza) de ARNm que contienen fracción 5'-fosforotiolato, aumentando de esta manera la estabilidad del ARNm y la eficacia de biosíntesis de la proteína codificada por ese ARNm en las células. La presente invención también se refiere a ARNm modificado en el extremo 5' con análogos de extremo 5' (caperuza) de ARNm que contienen fracción 5'-fosforotiolato, ARNm modificados que se pretenden para uso como una medicina, incluyendo para uso en terapias génicas novedosas basadas en ARNm.

Sorprendentemente, los inventores encontraron que los nuevos análogos según la presente invención que contienen las modificaciones con átomo de azufre en posición 5' desde el lado de 7-metilguanosina después de la incorporación en ARNm por un método de transcripción *in vitro* se vuelven resistentes a la actividad hidrolítica de la enzima Dcp1/2, y por tanto afectan la estabilidad del ARNm y la eficacia de biosíntesis de la proteína codificada por este ARNm en una célula, incluyendo la línea celular HeLa. Esta es la primera vez cuando una modificación localizada lejos del sitio del corte del puente trifosfato en la caperuza por Dcp1/2 hace la estructura de la caperuza resistente al proceso de su eliminación, lo que produce una semivida aumentada del ARNm. Este inesperado hallazgo es de importancia terapéutica significativa en terapias génicas que implican una expresión de la proteína deseada en la base del ARNm sintético suministrado, como es el caso de activación específica del sistema inmunitario en inmunoterapia contra el cáncer. Por tanto, se pueden usar transcritos de ARNm modificado, por ejemplo, que codifican una proteína característica para un tipo de cáncer determinado, para activar el sistema inmunitario contra células cancerosas que contienen este antígeno específico. Se encontró que los siguientes análogos eran particularmente preferidos desde el punto de vista de las propiedades de traducción del ARNm modificado: m<sup>7</sup>GSpppG (no. 24), m<sup>7,2</sup>O<sup>18</sup>GSpppG (no. 26), m<sup>7</sup>GSpppSG (no. 32), m<sup>7</sup>GSppspG D1 (no. 30), m<sup>7</sup>GSppspG D2 (no. 31), m<sup>7</sup>GSppspSG D1 (no. 33), m<sup>7</sup>GSppspSG D2 (no. 34), y el más preferido era m<sup>7,2</sup>O<sup>18</sup>GSpppG (no. 26).

La presente invención se refiere a un análogo de caperuza 5'-fosforotiolato según la fórmula 1



Fórmula 1

en donde

L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> se seleccionan independientemente del grupo que comprende O y S, en donde al menos uno de L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> no es O;

$n = 0, 1 \text{ o } 2$ ;

$X_1, X_2, X_3$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende O, S;

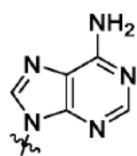
5  $R^1$  se selecciona del grupo que comprende  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , alquilo o alquilo sustituido;

$R^2$  y  $R^3$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende H, OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ , alquilo, alqueno, o alquino;

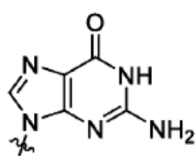
10  $R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende H, OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ , alquilo, alqueno, o alquino;

$Y_1, Y_2$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CHCl}$ ,  $\text{CCl}_2$ ,  $\text{CF}_2$ ,  $\text{CHF}$ ,  $\text{NH}$ , O;

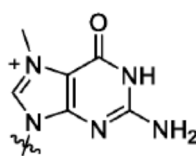
15 y B es un grupo según la fórmula 3, 4, 5, 6, o 7



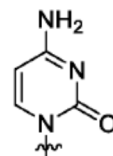
fórmula 3



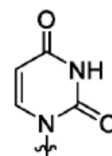
fórmula 4



fórmula 5



fórmula 6



fórmula 7

20 Se selecciona un análogo de caperuza 5'-fosforotiolato preferido del grupo que consiste en:

No	Compuesto	Formula estructural	Nombre químico
21	$m^7\text{GppSG}$		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P2-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) difosfato
22	$m^7\text{GpppSG}$		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato
23	$m^7\text{GSppG}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P2-guanosin-5'-il difosfato
24	$m^7\text{GSpppG}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato

25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2,3-metilenotrifosfato
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-metil-7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
30	$m^7GSppspG_{D1}$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il tiotrifosfato D1
31	$m^7GSppspG_{D2}$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-tiotrifosfato D2
32	$m^7GSpppSG$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato
33	$m^7GSppspSG_{D1}$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D1
34	$m^7GSppspSG_{D2}$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D2

35	$m^7GpppSG$ D1		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D1
36	$m^7GpppSG$ D2		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D2
37	$m^7GpCH_2ppSG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il) 1,2-metilenotrifosfato
38	$m^{7,2O}GpppSG$		P1-(2'-O-metil-7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato

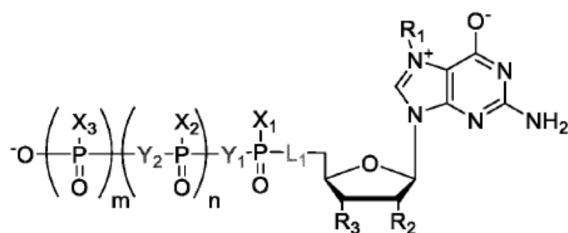
Se selecciona un análogo de caperuza 5'-fosforotiolato incluso más preferido del grupo que consiste en:

No	Compuesto	Fórmula estructural	Nombre químico
23	$m^7GSppG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P2-guanosin-5'-il difosfato
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2,3 metilenotrifosfato

26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-metil-7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
30	$m^7GSpp_pG_{D1}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-trifosfato D1
31	$m^7GSpp_pG_{D2}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-tiotrifosfato D2
32	$m^7GSpppSG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato
33	$m^7GSpp_pSG_{D1}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D1
34	$m^7GSpp_pSG_{D2}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D2
37	$m^7GpCH_2ppS_G$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 1,2-metilenotiotrifosfato

La invención también se refiere a un análogo 5'-fosforotiolato según la fórmula 2





Fórmula 2

en donde

$m = 0, 1$

$n = 0, 1, \text{ o } 2$ ;

$L^1$  es S

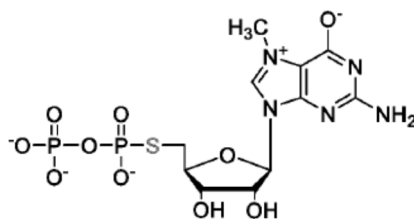
$X_1, X_2, X_3$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende O, S;

$R^1$  se selecciona del grupo que comprende  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , alquilo o alquilo sustituido;

$R^2$  y  $R^3$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende H, OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $\text{N}_3$ , alquilo, o alquilo sustituido;

$Y_1, Y_2$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CHCl}$ ,  $\text{CCl}_2$ ,  $\text{CHF}$ ,  $\text{CF}_2$ ,  $\text{NH}$  y O;

Un análogo 5'-fosforotiolato preferido es 7-metilguanosina 5'-desoxi-5'-tioguanosina 5'-difosforotiolato de la fórmula 13 a continuación



Fórmula 13.

La invención también se refiere al compuesto según la invención para uso como un medicamento.

La invención también se refiere al compuesto según la invención para uso como un medicamento para el tratamiento de atrofia muscular espinal (AME) y/o alivio de síntomas de AME.

La invención también se refiere al compuesto según la invención para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de atrofia muscular espinal (AME) y/o alivio de síntomas de AME.

La presente invención también se refiere al compuesto según la invención para uso como un regulador de la actividad DcpS, preferiblemente como un inhibidor de la actividad de la enzima DcpS, más preferiblemente hDcpS.

La invención también se refiere al compuesto según la invención para uso en la regulación de la degradación de ARNm y/o en la regulación del ajuste de ARNm.

La invención también se refiere a un ARNm que comprende en el extremo 5' el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato novedoso según la invención.

El ARNm preferido se caracteriza por el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato que se selecciona del grupo que comprende  $m^7\text{GSpppG}$  (no. 24),  $m^{7,2'}\text{GSpppG}$  (no. 26),  $m^7\text{GSpppSG}$  (no. 32),  $m^7\text{GSpppG D1}$  (no. 30),  $m^7\text{GSpppG D2}$  (no. 31),  $m^7\text{GSpppSG D1}$  (no. 33),  $m^7\text{GSpppSG D2}$  (no. 34), más preferiblemente es  $m^{7,2'}\text{GSpppG}$  (no. 26).

La presente invención también se refiere a un método de preparación de ARNm que comprende en el extremo 5' de la molécula de ARNm un análogo de caperuza 5'-fosforotiolato, caracterizado en que el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato según la invención se incorpora durante la síntesis de la molécula de ARNm.

En un método de preparación preferido de ARNm el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato se selecciona de un grupo que comprende  $m^7\text{GSpppG}$  (no. 24),  $m^{7,2'}\text{GSpppG}$  (no. 26),  $m^7\text{GSpppSG}$  (no. 32),  $m^7\text{GSpppG D1}$  (no. 30),  $m^7\text{GSpppG D2}$  (no. 31),  $m^7\text{GSpppSG D1}$  (no. 33),  $m^7\text{GSpppSG D2}$  (no. 34), más preferiblemente es  $m^{7,2'}\text{GSpppG}$  (no. 26).

En un método preferido de preparación de ARNm, la síntesis de ARNm transcurre mediante transcripción *in vitro*.

La invención también se refiere al ARNm que comprende el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato según la invención en el extremo 5' de la molécula para uso en la producción de proteínas;

5 en donde preferiblemente la producción de proteínas se lleva a cabo en un sistema celular o no celular.

La invención también se refiere al ARNm según la invención para uso como un medicamento.

10 La invención también se refiere al ARNm según la invención para uso como un medicamento para el tratamiento de atrofia muscular espinal (AME) y/o para alivio de síntomas de AME y/o para uso como un medicamento anticáncer, preferiblemente como un medicamento en inmunoterapia anticáncer.

La invención también se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el

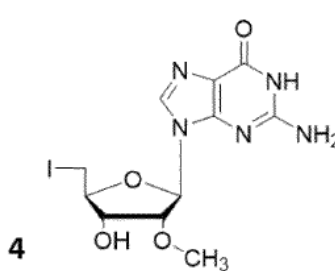
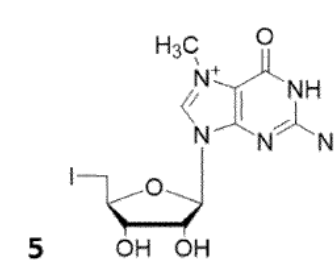
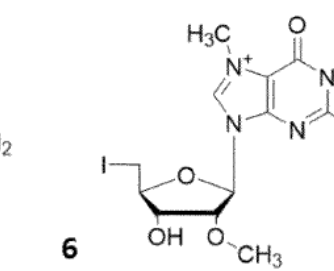
15 a) compuesto según las reivindicaciones 1-4, o  
b) ARNm según la reivindicación 9; y  
un soporte farmacéuticamente aceptable.

Se sintetizaron compuestos sin metilar (GppSG y GpppSG) como controles para estudios biológicos.

20 La tabla 1 enumera los agentes alquilantes usados para la síntesis de nucleótidos apropiadamente modificados que se obtuvieron por primera vez por los inventores. Las tablas 2 y 3 enumeran análogos de caperuza 5'-fosorotiolato obtenidos y posteriormente caracterizados por métodos biofísicos y bioquímicos.

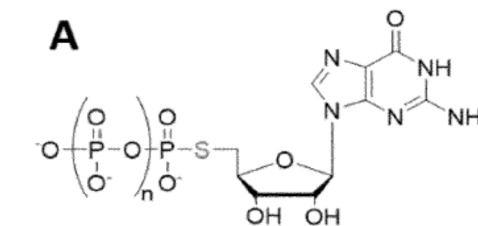
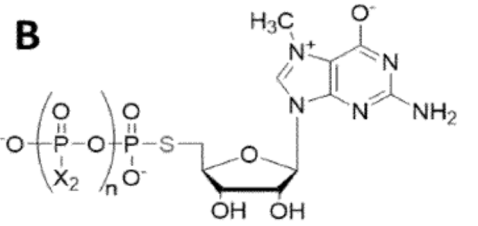
25 Entre los compuestos enumerados en la tabla 2 y la tabla 3, particularmente preferidos respecto al tratamiento de AME son los análogos 5'-fosforotiolato que comprenden azufre en la posición 5' desde el lado de 7-metilguanosina (compuestos no. 12, 23, 24, 25, 26, 30, 31, 32, 33, 34 y 37), que se caracterizan por estabilidad en presencia de enzima DcpS.

**Tabla 1.** Análogos 5'-desoxi-5'-yodo-guanosina (los números de compuesto indicados próximo a las estructuras)

 <p><b>4</b></p>	 <p><b>5</b></p>	 <p><b>6</b></p>
Fórmula 10	Fórmula 11	Fórmula 12

30

**Tabla 2.** Análogos mononucleótido 5'-tiofosfato: panel A - guanosina, panel B - 7-metilguanosina

<p><b>A</b></p>  <p><b>7:</b> n=0 <b>11:</b> n=1</p>	<p><b>B</b></p>  <p><b>8:</b> n=0      X<sub>2</sub> = O <b>12:</b> n=1      X<sub>2</sub> = O <b>13:</b> n=1      X<sub>2</sub> = S</p>
---	--

**Tabla 3.** Análogos de caperuza 5'-tiofosfato

<p>19: n=0</p> <p>20: n=1</p>								
Número de compuesto	Compuesto	n	R	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>
21	m <sup>7</sup> GppSG	0	H	O	S	O	O	O
22	m <sup>7</sup> GpppSG	1	H	O	S	O	O	O
23	m <sup>7</sup> GSppG	0	H	S	O	O	O	O
24	m <sup>7</sup> GSpppG	1	H	S	O	O	O	O
25	m <sup>7</sup> GSppCH <sub>2</sub> pG	1	H	S	O	O	CH <sub>2</sub>	O
38	m <sup>7,2'</sup> GpppSG	1	CH <sub>3</sub>	O	S	O	O	O
26	m <sup>7,2'</sup> GSpppG	1	CH <sub>3</sub>	S	O	O	O	O
32	m <sup>7</sup> GSpppSG	1	H	S	S	O	O	O
35	m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pSG D1	1	H	O	S	O	O	S
36	m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pSG D2	1	H	O	S	O	O	S
30	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pG D1	1	H	S	O	O	O	S
31	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pG D2	1	H	S	O	O	O	S
33	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pSG D1	1	H	S	S	O	O	S
34	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pSG D2	1	H	S	S	O	O	S
37	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> ppSG	1	H	O	S	CH <sub>2</sub>	O	O

Los documentos citados en la descripción y los documentos referenciados en los mismos también se incorporan al presente documento mediante referencia.

5

#### Breve descripción de los dibujos

Para un mejor entendimiento de la invención se ilustró con ejemplos y en las figuras adjuntas en donde:

10 La **figura 1** ilustra la síntesis de análogos 5'-desoxi-5'-yodo-guanosina.

La **figura 2** ilustra la síntesis de 5'-desoxi-5'-tioguanosina-5'-tiofosfatos. A – síntesis de derivados de guanosina; B – síntesis de derivados de 7-metilguanosina.

La **figura 3** ilustra la síntesis de análogos de caperuza 5'-tiofosfato a través de S-alkilación. A – tiofosfatos terminales usados en la reacción de alquilación; B – esquemas de la reacción de alquilación usando 5'-desoxi-5'-yodo-guanosina (z Fig. 1) y los tiofosfatos terminales mostrados en A.

- 5 La **figura 4** ilustra la síntesis de análogos de caperuza 5'-tiofosfato a través de imidazolidas. A – compuestos usados en el método; B – síntesis de los compuestos finales usando dos derivados activados diferentes no. 9 y 29.

La **figura 5** ilustra la hidrólisis de sustrato dinucleótido natural por DcpS y estudios de estabilidad de análogos modificados con 5'-S: panel A – estudios de estabilidad del análogo de caperuza natural m<sup>7</sup>GpppG frente a DcpS; panel B – estudios de estabilidad del análogo de caperuza no. 20 frente a la enzima DcpS (Tabla 3); panel C - estudios de estabilidad del análogo de caperuza no. 21 frente a la enzima DcpS (Tabla 3).

La **figura 7** ilustra una estructura cristalina del sitio activo de la enzima ΔN37hDcpS en complejo con m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D2.

La **figura 8** ilustra la susceptibilidad a la enzima Dcp1/2 de ARN cortos de 26 nt con caperuza con varios análogos de caperuza (los transcritos sin caperuza en sus extremos 5' tienen 25 nt de longitud) que se incuban con la enzima anticaperuza SpDcp1/2. Las reacciones se llevaron a cabo durante 0, 5, 15, 30 min, después de la terminación de las mismas la mezcla de reacción se resolvió en gel de poliácridamida al 15 % desnaturizante, después de completar la separación electroforética el gel se tiñó con SYBR-Gold (Invitrogen). En cada panel el carril más a la izquierda se refiere al control, que es ARN sin caperuza.

La **figura 9** ilustra la susceptibilidad relativa a la enzima Dcp1/2 determinada a partir de los datos en la figura 8. La susceptibilidad relativa a la actividad Dcp1/2 se calculó como la razón de la intensidad de la banda correspondiente al ARN con caperuza en el extremo 5' respecto a la suma de intensidades de las bandas correspondientes a ARN con caperuza y sin caperuza. Todos los valores se normalizaron en relación al tiempo 0 min para los ARN individuales.

La **figura 10** ilustra la eficacia de traducción relativa obtenida de medidas de eficacias de traducción de ARNm que codifica la luciferasa de *Renilla* con caperuza con varios análogos de caperuza en el extremo 5' en extracto de reticulocitos de conejo.

La **figura 11** ilustra la eficacia de traducción relativa obtenida en células HeLa determinada en base de la actividad luciferasa en puntos de tiempo seleccionados. Los resultados se presentan como una proporción de la actividad luciferasa medida para lisado de células transfectadas con ARNm con caperuza con m<sub>2</sub><sup>7,2'</sup>-<sup>0</sup>GSpppG o m<sub>2</sub><sup>7,2'</sup>-<sup>0</sup>GSpppSG en el extremo 5' respecto a la actividad luciferasa medida para lisado de células transfectadas con ARNm con caperuza con m<sup>7</sup>GpppG. Los histogramas representan el valor medio de tres repeticiones biológicas.

La síntesis química de análogos de caperuza 5'-tiofosfato es una combinación creativa de tres métodos de síntesis de nucleótidos basados en química de:

- 1) Derivados de nucleótidos de imidazolidina (véase (Abrams y Schiff 1973); (Barnes, Waldrop et al. 1983); (Kalek, Jemielity et al. 2006) y (Kalek, Jemielity et al. 2005))
- 2) S-alkilación por derivados de nucleósidos que contienen halógeno (véase (Arakawa, Shiokawa et al. 2003))
- 3) Síntesis de nucleósido terminal β-tio-di y γ-tio-trifosfatos (véase (Zuberek, Jemielity et al. 2003))

Con el fin de sintetizar análogos de caperuza que contienen azufre en la posición 5' se desarrollaron dos enfoques complementarios que en conjunto permiten la síntesis de una variedad completa de análogos 5'-fosforotioato de mono- di- y trifosfatos de nucleósidos y análogos de caperuza dinucleotídicos (Fig. 2-4). El enfoque 1 (Fig. 2 y la primera etapa en Fig. 3) implica la reacción de S-alkilación usando una reacción de sustitución nucleófila de 5'-desoxi-5'-yodonucleósidos por β- o γ-tiofosfatos. El segundo enfoque (Fig. 4) que da compuestos dinucleotídicos que tienen un átomo de azufre en la posición 5', usa una reacción de acoplamiento entre la forma antes activada de un nucleótido de imidazolidina apropiado y difosfato (en ambos casos, en una fase elegida se usó la reacción de S-alkilación) en presencia de ZnCl<sub>2</sub> como catalizador.

El primer enfoque usa los correspondientes fosforotioatos (mono-, di-, tri-) que portan en una posición terminal una fracción fosforotioato. Las condiciones óptimas para esta reacción es el uso de cantidades equimolares de fosforotioato, 5'-yodonucleósido y DBU (1,8-diazabicyclo (5.4.0) undec-7-eno) como una base. Hasta la fecha, usando este método, se obtuvieron 9 análogos de caperuza dinucleotídicos diferentes incluyendo dos unidades que contenían modificaciones de metileno en las posiciones α-β y β-γ del puente trifosfato (Figura 3).

El segundo método para el rendimiento eficaz requirió la presencia de cloruros metálicos divalentes tal como ZnCl<sub>2</sub>, que también mejora la solubilidad en un medio orgánico, protege contra la hidrólisis del derivado de imidazolidina y acelera la velocidad de reacción acercando el derivado de imidazol y el fosfato de la otra molécula. Las condiciones óptimas para esta reacción fue el uso de 1,5 equivalentes del derivado de imidazol relativo al difosfato en presencia de un exceso de 8 veces de ZnCl<sub>2</sub> en DMF. Usando el segundo método se obtuvieron nueve análogos de caperuza 5'-fosforotioato más que contienen dos azufres en la posición 5' y un azufre en la posición β no enlazadora en la

cadena trifosfato (Fig. 4). Hasta la fecha no se ha descrito el uso de análogos 5'-fosforotioato de nucleótidos en este tipo de reacción. Debido a la presencia de un centro estereogénico localizado en el átomo de fósforo, cada análogo que contiene un átomo β-S-azufre se obtuvo como una mezcla de diastereómeros (llamados D1 y D2 según el orden de su elución de la columna de RP-HPLC). Los diastereómeros individuales se separaron por RP-HPLC.

Los análogos de caperuza obtenidos se purificaron por cromatografía de intercambio iónico, DEAE Sephadex A-25, y si la pureza no era suficiente, por HPLC preparativa. Después, los compuestos purificados se ensayaron para sus propiedades bioquímicas y biológicas.

Las rutas de síntesis que producen análogos de caperuza que contienen un átomo de azufre en la posición 5' se muestran en las figuras 1-4.

Los análogos de caperuza obtenidos se ensayaron después como sustratos de la enzima DcpS humana (hDcpS). Como se determinó usando HPLC de fase inversa (RP HPLC), solo cuatro de los análogos: m<sup>7</sup>GppSG (no. 21), m<sup>7</sup>GpppSG (no. 22), m<sup>7,2'-O</sup>GpppSG (no. 38) y m<sup>7</sup>GpppSG D1/D2 (no. 35-36) fueron hidrolizados por DcpS. Los otros análogos que contienen un átomo de azufre en la posición 5' desde el lado de la guanosina 7-metilada son resistentes a la hidrólisis por hDcpS (comparación de estabilidad de dos análogos diferentes (no. 22) y (no. 24) – Fig. 5, Tabla 4). En contraste a los compuestos no. 21, 22, 38 y 35-36, el análogo 37 (m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>ppSG) se modificó adicionalmente con una fracción metilénbifosfonato, y también era resistente a la hidrólisis por la enzima hDcpS (Tabla 5). Después, se usaron el método de fluorescencia y sonda fluorogénica para determinar la capacidad de estos compuestos para inhibir la enzima hDcpS al tiempo que se determina para los compuestos que son resistentes a la actividad enzimática el parámetro CI<sub>50</sub> (véase la solicitud de patente PL406893). Después de los estudios, se descubrió que los compuestos resultantes son muy buenos inhibidores de la enzima DcpS humana.

El análogo no. 34, que muestra las mejores propiedades inhibitoras frente a la enzima hDcpS de todos los análogos de caperuza ensayados, se cocrystalizó con una versión acortada de la enzima (ΔN37hDcpS; la enzima de longitud completa no formó cristales), y la estructura a resolución de 2,05 Å del complejo se determinó por cristalografía de rayos X (Fig. 7). La conformación del análogo No. 34 observada en la estructura del complejo se diferencia significativamente de la conformación de un análogo de caperuza no modificado m<sup>7</sup>GpppG (compuesto no. 0) en complejo con un mutante catalíticamente inactivo de hDcpS H277N (Gu, Fabrega et al. 2004). Se observaron diferencias particularmente sustanciales entre esos dos ligandos en el alineamiento del puente trifosfato, que produce la exclusión del fosfato y del análogo no. 34 del centro catalítico. Además, además de las interacciones típicas del complejo caperuza/enzima DcpS con el dominio C-terminal, el análogo no. 34 interacciona a través de puentes de hidrógeno con los residuos de lisina 142 y tirosina 143. Esos aminoácidos están localizados en la denominada región bisagra, que conecta los dominios C- y N-terminales, que se mueven uno relativo al otro durante el ciclo catalítico.

La estructura y pureza de los compuestos obtenidos se confirmaron por espectrometría de masas y <sup>1</sup>H y <sup>31</sup>P RMN.

La observación de que m<sup>7</sup>GSpppG (compuesto no. 24) y sus análogos son resistentes a hDcpS es inesperada porque la hidrólisis de compuestos obtenidos transcurre a través de un ataque nucleófilo sobre el grupo fosfato adyacente a 7-metilguanósina, que es consistente con el mecanismo catalítico establecido para los sustratos naturales.

En resumen, la invención describe estructuras y métodos para la síntesis de varios análogos del extremo 5' del ARNm (caperuza) que contiene una fracción 5'-fosforotiolato. Ninguno de los análogos de caperuza descritos, sus propiedades frente a la enzima DcpS, ni sus métodos de su uso, en particular para el tratamiento de atrofia muscular espinal (AME) y/o aliviar los síntomas de AME se ha descrito previamente en la bibliografía.

Los análogos seleccionados se usaron para síntesis de ARNm usando un método de transcripción *in vitro* con ARN SP6 polimerasa (New England BioLabs). Se examinó qué porcentaje del conjunto de transcritos con una longitud de 35 nucleótidos tenía una estructura caperuza, y después se examinó la susceptibilidad de estos transcritos a degradación por una enzima recombinante Dcp1/2 de *Schizosaccharomyces pombe* (ejemplo 2, ensayo 4, Fig. 8, Fig. 9, Tab. 6). Los transcritos de longitud completa que codifican luciferasa (como un gen indicador) se sometieron a traducción en lisado de reticulocitos de conejo (Fig. 10, ejemplo 2, ensayo 5) y en células HeLa transfectadas con ARNm modificado (Fig. 11, ejemplo 2, ensayo 6). En ambos casos, se determinó la eficacia de la traducción del ARNm en ambos sistemas de traducción examinando la actividad de la proteína sintetizada (luciferasa) (Tab. 6).

Los términos usados en la descripción tienen los siguientes significados. Los términos no definidos en el presente documento tienen el significado que se presenta y entiende un experto en la materia a la luz de esta divulgación y el contexto de la descripción de la solicitud de patente. Las siguientes convenciones, a menos que se indique de otra manera, se usaron en la presente descripción, los términos que tienen los significados indicados como en las definiciones a continuación.

El término "alquilo" se refiere a un sustituyente hidrocarbonilo saturado, lineal o ramificado que tiene el número indicado de átomos de carbono. Los ejemplos de un sustituyente alquilo son -metilo, -etilo, -*n*-propilo, -*n*-butilo, -*n*-pentilo, -*n*-hexilo, -*n*-heptilo, -*n*-octilo, -*n*-nonilo y -*n*-decilo. Los alquilos de -(C1-C10) ramificados representativos incluyen -isopropilo, -*sec*-butilo, -isobutilo, -*tert*-butilo, -isopentilo, -neopentilo, -1- -metilbutilo, -2-metilbutilo, -3-metilbutilo, -1,1-

dimetilpropilo, -1,2-dimetilpropilo, -1-metilpentilo, -2-metilpentilo, -3-metilpentilo, -4-metilpentilo, -1-etilbutilo, -2-etilbutilo, -3-etilbutilo, -1,1-dimetilbutilo, -1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, -2,2-dimetilbutilo, -2,3-dimetilbutilo, -3,3-dimetilbutilo, -1-metilhexilo, 2-metilhexilo, -3-metilhexilo, -4-metilhexilo, -5-metilhexilo, -1,2-dimetilpentilo, -1,3-dimetilpentilo, -1,2-dimetilhexilo, -1,3-dimetilhexilo, -3,3-dimetilhexilo, 1,2-di-metilheptilo, -1,3-dimetilheptilo y -3,3-dimetilheptilo y otros.

El término “*alquenilo*” se refiere a un sustituyente hidrocarbilo acíclico saturado, lineal o ramificado que tiene el número indicado de átomos de carbono y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de un sustituyente alquenilo son -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, -1-hexenilo, -2-hexenilo, -3-hexenilo, -1-heptenilo, -2-heptenilo, -3-heptenilo, -1-octenilo, -2-octenilo, -3-octenilo, -1-nonenilo, -2-nonenilo, -3-nonenilo, -1-decenilo, -2-decenilo, -3-decenilo y otros.

El término “*alquinilo*” se refiere a un sustituyente hidrocarbilo acíclico saturado, lineal o ramificado que tiene el número indicado de átomos de carbono y que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de un sustituyente alquinilo son acetilenilo, propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, 1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo, -4-pentinilo, -1-hexinilo, -2-hexinilo, -5-hexinilo y otros.

El término “*heteroátomo*” se refiere a un átomo seleccionado del grupo de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo y otros.

El término “*HPLC*” se refiere a cromatografía líquida de alta resolución, y los solventes designados como solventes para “*HPLC*” significan solventes de pureza adecuada para el análisis por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

El término “*RMN*” significa resonancia magnética nuclear.

El término “*sistema celular*” se refiere a células capaces de llevar a cabo un proceso de biosíntesis de proteínas en un molde de ARN.

El término “*sistema no celular*” significa una mezcla biológica que contiene todos los ingredientes necesarios para la biosíntesis de proteínas en base de un molde de ARN, habitualmente un lisado de células animales o vegetales.

### Modos para llevar a cabo la invención

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente para ilustrar la invención y para explicar sus varios aspectos, y no para su limitación, y no se debe igualar con todo su ámbito, que se define en las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos, a menos que se indique de otra manera, implicaron el uso de materiales estándar y métodos usados en el campo o los procedimientos recomendados por el fabricante para los materiales y métodos particulares.

### Ejemplos

Información general relacionada con la síntesis, aislamiento y caracterización de nuevos análogos de caperuza

Los nucleótidos que eran intermediarios se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex A-25 (forma  $\text{HCO}_3^-$ ) usando un gradiente lineal de bicarbonato de trietilamonio (TEAB) en agua desionizada. Después de la evaporación a presión reducida, durante la que se añadió etanol al 96 % varias veces para descomponer el tampón TEAB, los intermedios se aislaron como sales de trietilamonio. Los productos finales (análogos de caperuza) se purificaron de la misma manera y después se purificaron por HPLC semipreparativa, y se sometieron a liofilización varias veces y se aislaron como sales de amonio. Se realizó HPLC de fase inversa (RP HPLC) analítica en un aparato Agilent Technologies Series 1200, con columna Supelcosil LC-18 RP-T (4,6 x 250 mm, flujo 1,3 ml/min) con un gradiente lineal de metanol del 0 %-25 % (programa A) en acetato de amonio 0,05 M (pH 5,9) o metanol del 0 %-50 % (programa B) en acetato de amonio 0,05 M (pH 5,9). Los compuestos eluidos se detectaron usando detector de UV-VIS (a 260 nm) y detector de fluorescencia (excitación 260 nm, emisión 370 nm). Se llevó a cabo RP HPLC preparativa en el mismo aparato usando una columna Discovery RP Amida C16 (21,2 x 250 mm, flujo 5,0 ml/min) usando un gradiente lineal de acetonitrilo en acetato de amonio 0,05 M (pH 5,9) como la fase móvil. Se registraron los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{31}\text{P}$  RMN a 25 °C en un Varian UNITY-plus a una frecuencia de 399,94 MHz y 161,90 MHz respectivamente. Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  RMN se describieron respecto a TSP (propionato de 3-trimetilsilil [2,2,3,3-D<sub>4</sub>] sodio) en D<sub>2</sub>O (estándar interno). Los desplazamientos químicos de  $^{31}\text{P}$  RMN se describieron respecto a ácido fosfórico al 20 % en D<sub>2</sub>O (estándar externo). Los espectros de masa de alta resolución en modo de ion negativo [MS ESI (-)] o positivo [MS ESI (+)] se registraron en un Micromass QToF 1 MS. Leer el lector de placas de fluorescencia se realizó en un Tecan Infini200® PRO con excitación a 480 nm y emisión a 535 nm. Las muestras se colocaron en una placa de 96 pocillos negra (Greiner). Las cristalizaciones se realizaron en placas de 96 pocillos con pocillos de 3 lentes (Swissci), utilizando un robot de pipetear Mosquito Crystal (TTP Labtech). Los solventes y otros reactivos se compraron de Sigma-Aldrich y se usaron sin purificación adicional, a menos que se indique de otra manera posteriormente. Las sales de sodio de GMP y GDP comercialmente disponibles se convirtieron a sales de trietilamonio usando cromatografía de intercambio iónico en Dowex 50 WX8. Las sales de trietilamonio y sales sódicas

de m<sup>7</sup>GMP y m<sup>7</sup>GDP, m<sup>7</sup>GMP-Im y m<sup>7</sup>GDP-Im se obtuvieron como se describe en la bibliografía (Kalek, Jemielity et al. 2005), (Jemielity, Fowler et al. 2003). Se obtuvieron 5'-desoxi-5'-yodo-guanosina, 5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-monotiofosfato y fosforotioato de trietilamina como se describe en la bibliografía ((Arakawa, Shiokawa et al. 2003), (Zuberek, Jemielity et al. 2003)). Se preparó la sal de trietilamonio de m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>p como se describe en la bibliografía (Kalek, Jemielity et al. 2006). Se preparó GpCH<sub>2</sub>ppS como se describe (Kowalska, Ziemniak et al. 2008)

En los ejemplos a continuación, en los paréntesis para compuestos específicos se da la referencia a la figura y el número que indica los sustituyentes especificados, que corresponde a un número particular para el análogo de caperuza particular.

## Ejemplo 1. Síntesis y aislamiento de nuevos análogos de caperuza

### Método general de síntesis de derivados 5'-yodo nucleósidos (Fig. 1, no. 3, 4)

Se añadió yodo (3 mmol, M = 253,81 g/mol durante 5 min a una suspensión magnéticamente agitada del correspondiente nucleósido (1 mmol), trifetilfosfina (3 mmol, M = 262,29 g/mol) e imidazol (6 mmol, M = 68,08 g/mol) en N-metil-2-pirrolidiona (a una concentración de nucleósido 0,25 mol/l) a temperatura ambiente. La reacción se realizó durante 3 h, y el progreso de la reacción se siguió usando RP HPLC. Después, la mezcla de reacción se echó en una solución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (3:1, v/v), diluyendo la mezcla de reacción 12 veces. Se formó un precipitado cristalino blanco durante 24 h a 4 °C, en la interfase de las dos capas. El precipitado se filtró a presión reducida, se lavó con cloruro de metileno y se secó al vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

### 5'-desoxi-5'-yodo-guanosina (Fig. 1, no. 3)

Se obtuvo 5'-desoxi-5'-yodo-guanosina (Fig. 1, no. 3), (10,4 g, 26,5 mmol, 75 %) empezando de guanosina (Fig.1, no. 1), (10 g, 35,3 mmol) según el procedimiento general t<sub>R</sub> (B) = 12,36 min.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 10,65 (s, 1H, H-1), 7,89 (s, 1H, H-8), 6,47 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,68 (d, 1H, J = 6,26 Hz, H-1'), 5,51 (d, 1H, J = 6,26 Hz, 2'-OH), 5,35 (d, 1H, J = 4,70 Hz, 3'-OH), 4,59 (q, 1H, J = 5,48 Hz, H-2'), 4,03 (q, 1H, J = 5,09, 3,13 Hz, H-3'), 3,90 (dt, 1H, J = 6,26, 3,13 Hz, H-4'), 3,53 (dd, 1H, J = 6,26, 5,87 Hz, H-5'), 3,39 (dd, 1H, J = 10,17, 6,65 Hz, H-5'); HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup> (M-H)<sup>-</sup>: 391,9861, determinada 391,98610.

### 5'-desoxi-5'-yodo-2'-O-metil-guanosina (Fig. 1, no. 4)

Se obtuvo 2'-O-metil-5'-desoxi-5'-yodo-guanosina (Fig. 1, no. 4), (328,8 mg, 0,81 mmol, 80 %) empezando de 2'-O-metilguanosina (Fig. 1, no. 2) (300 mg), 1,0 mmol) según el procedimiento general. t<sub>R</sub> (B) = 14,44 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 7,95 (s, 1H, H-8), 6,50 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,81 (d, 1H, J = 6,41 Hz, H-1'), 5,50 (d, 1H, J = 5,34 Hz, 3'-OH), 4,41, 4,40 (2d, 1H, J = 6,26, 6,41 Hz, H-2'), 4,28-4,25 (m, 1H, H-3'), 3,97, 3,96 (2t, 1H, J = 6,56, 3,05 Hz, H-4'), 3,56 (dd, 1H, J = 6,41, 10,38 Hz, H-5'), 3,43 (dd, 1H, J = 10,53, 6,87, 6,71 Hz, H-5'), 3,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 406,0090, determinada 406,0021.

### 5'-desoxi-5'-yodo-7-metilguanosina (Fig. 1, no. 5)

Se disolvió 5'-desoxi-5'-yodo-guanosina (Fig. 1, no. 3) (2 g, 5,09 mmol) en DMF anhidro (20 ml) y se añadió MeI (2,5 ml, 40,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó en un agitador magnético a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por RP HPLC. Cuando no se observó material de partida, la reacción se paró añadiendo agua (10 ml), y el exceso de yoduro de metilo se evaporó al vacío y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Después, al producto crudo restante se le añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) y se formó un precipitado amarillo. El precipitado se filtró, a presión reducida, se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 ml) y se secó durante 24 h al vacío sobre P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. Rendimiento 1,6 g (77,0 %). t<sub>R</sub> (B) = 11,94 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 5,98 (d, 1H, J = 3,91 Hz, H-1'), 4,81 (dd, 1H, J = 4,70 Hz, H-2'), 4,31 (t, 1H, J = 5,09, H-3'), 4,15 (q, 1H, J = 5,48, H-4'), 4,07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,50-3,62 (m, 2H, J = 4,70, 5,87 Hz, H-5');

HRMS ESI (+) m/z calculada para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>: 408,01687, determinada 408,01163.

### 5'-desoxi-5'-yodo-2'-O-metil-7-metilguanosina (Fig. 1, no. 6)

Se disolvió 5'-desoxi-5'-yodo-2'-O-metil-guanosina (Fig. 1, no. 4) (200,8 mg, 0,49 mmol) en DMSO anhidro (3,3 ml) y se añadió MeI (0,25 ml, 3,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó en un agitador magnético a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por RP HPLC. Cuando no se observó material de partida, la reacción se extinguió con agua (10 ml) y el pH se ajustó a neutro usando NaHCO<sub>3</sub>, el exceso de yoduro de metilo se extrajo con éter dietílico y las fases acuosas se juntaron, seguido por concentrar la mezcla y purificación por HPLC preparativa obteniendo 45,8 mg el compuesto (77 %). t<sub>R</sub> (B) = 11,94 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 9,03 (s, 1H, H-8), 6,39 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,95 (d, 1H, J = 4,27 Hz, H-1'), 4,40 (t, 1H, J = 4,58 Hz, H-2'), 4,24 (t, 1H, J = 4,88 Hz, H-3'), 4,08-4,06 (m, 1H, H-4'), 4,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,59 (dd, 1H, J = 5,19, 4,88, 10,68 Hz, H-5'), 3,50 (dd, 1H, J = 7,93, 7,63, 10,68 Hz, H-5'), 3,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 420,01741, determinada: 420,01758.

#### guanosina 5'-desoxi-5'-tioguanosina-5'-monofosforotiolato (Fig. 2, no. 7)

A una suspensión de 5'-desoxi-5'-yodoguanosina (Fig. 2, nr 3) (2 g, 5,1 mmol) en 100 ml de mezcla DMF:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) se añadió tiofosfato trisódico (4,6 g, 25,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El precipitado se eliminó por filtración, el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en 50 ml de agua y el exceso de tiofosfato trisódico se precipitó por adición de 100 ml de metanol. Después de la separación, el producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico en Sephadex. El producto se liofilizó. Rendimiento 1,9 g (64 %). t<sub>R</sub> (B) = 4,24 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 8,05 (s, 1H, H-8), 5,89 (d, 1H, J = 5,73 Hz, H-1'), 4,85 (dd, 1H, J = 5,48 Hz, H-2'), 4,51 (2d, 1H, J = 4,98, 4,23 Hz, H-3'), 4,33-4,39 (m, 1H, H-4'), 3,16-3,08 (m, 2H, H-5'), <sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 15,42 (s, 1P);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>PS<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 378,02788, determinada: 378,02828.

#### guanosina 5'-desoxi-5'-tio-7-metilguanosina-5'-monofosforotiolato (Fig. 2, no. 8)

A una suspensión de 5'-desoxi-5'-yodo-7-metilguanosina (Fig. 2, no. 6) (2,0 g, 4,92 mmol) en 100 ml de DMF se añadió tiofosfato trisódico (4,43 g, 24,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 48 h a temperatura ambiente. El precipitado se eliminó y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en 50 ml de agua y el exceso de tiofosfato trisódico se precipitó por adición de metanol (100 ml). Después de la separación, el producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico en Sephadex. El producto se liofilizó. Rendimiento 1,55 g (53 %). t<sub>R</sub> (B) = 4,64 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 7,85 (s, 1H, H-8), 5,89 (d, 1H, J = 3,74 Hz, H-1'), 4,78-4,75 (m, 1H, H-2'), 4,43-4,39 (m, 2H, H-3', H-4'), 4,09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,08-2,94 (m, 2H, H-5'), <sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 14,45 (s, 1P);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>PS<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 392,04353, determinada: 392,04378.

#### Procedimiento general de síntesis de guanosina 5'-desoxi-5'-tioguanosina-5'-monofosforotiolato imidazolidas (Fig. 2, no. 9, 10)

Un compuesto de partida apropiado (sal TEA de nucleótido) (1 mmol) se mezcló con imidazol (10 mmol) y 2,2'-ditiopiridina (3 mmol) en DMF (a la concentración de nucleótido de 0,15 M). A continuación, se añadieron trietilamina (3 mmol) y trifenilfosfina (3 mmol), y la mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La adición de una solución anhidra de NaClO<sub>4</sub> (4 mmol por cada fracción fosfato) en acetona anhidra (volumen 10 x mayor que el DMF añadido) produjo precipitación del producto de la mezcla de reacción. Después de enfriar a 4 °C el precipitado se filtró, se lavó con acetona fría anhidra y se secó al vacío sobre P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.

#### guanosina 5'-desoxi-5'-tioguanosina-5'-monofosforotiolato imidazolidina (Fig. 2, no. 9)

Se obtuvo guanosina 5'-desoxi-5'-tioguanosina-5'-monofosforotioato imidazolidina (Fig. 2, no. 9) (352 mg, 0,75 mmol, 89 %) empezando de 5'-desoxi-5'-tioguanosina-5'-monofosforotioato (Fig. 2, No. 7) (500 mg, 0,86 mmol) según el procedimiento general. t<sub>R</sub> (B) = 8,27 min;

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 11,69 (s, 1P);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>PS<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 428,05476, determinada: 428,05452.

#### 5'-desoxi-5'-tioguanosina-7-metilguanosina-5'-monofosforotiolato imidazolidina (Fig. 2, no. 10)

Se obtuvo 5'-desoxi-5'-tioguanosina-7-metilguanosina-5'-monofosforotioato imidazolidina (Fig. 2, no. 10) (321 mg, 0,69 mmol, 82 %) empezando de 5'-desoxi-5'-tio-7-metilguanosina-5'-monofosforotioato (Fig. 2, No. 8) (500 mg, 0,84 mmol) según el procedimiento general. t<sub>R</sub> (B) = 8,39 min;

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>PS<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 442,07041, determinada: 442,07070.

#### Guanosina 5'-desoxi-5'-tioguanosina-5'-difosforotiolato (Fig. 2, no. 11)

Se disolvió guanosina 5'-desoxi-5'-tioguanosina-5'-monofosforotioato imidazolidina (Fig. 2, no. 9) (100 mg, 0,22 mmol) en DMF anhidro (2 ml), y se añadió fosfato de tris(trietilamonio) (100 mg, 0,26 mmol), seguido por la adición de ZnCl<sub>2</sub> (235,84 mg, 1,76 mmol). El progreso de la reacción se controló con RP-HPLC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida. Después, la reacción se paró por la adición de



una solución acuosa de EDTA (513,92 mg, 1,76 mmol, 50 ml) y se neutralizó con  $\text{NaHCO}_3$  1 M. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex y se aisló como sales de TEA. Rendimiento: 108,5 mg (0,14 mmol, 65 %);

HRMS ESI (-) m/z calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2\text{S}^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 457,99421, determinada: 457,99481.

#### 5' -desoxi-5' -tioguanosina-7-metilguanosina-difosfato (Fig. 2, no. 12)

Se disolvió 5' -desoxi-5' -tioguanosina-7-metilguanosina-5' monofosforotioato imidazolida (Fig. 2, no. 10) (100 mg, 0,21 mmol) en DMF anhidro (2 ml), y se añadió fosfato de tris(trietilamonio) (100 mg, 0,26 mmol), seguido por la adición de  $\text{ZnCl}_2$  (224,54 mg, 1,68 mmol). El progreso de la reacción se controló con RP-HPLC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida. Después, la reacción se paró por la adición de una solución acuosa de EDTA (490,56 mg, 1,68 mmol, 50 ml) y se neutralizó con  $\text{NaHCO}_3$  1 M. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex y se aisló como sales de TEA. Rendimiento: 91 mg (0,12 mmol, 54 %);  $t_R$  (B) = 5,07 min;

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8,11 (s, 1H, H-8 lentamente intercambiable), 5,97 (d, 1H,  $J$  = 3,91 Hz, H-1'), 4,50, 4,49 (2d, 1H,  $J$  = 5,09 Hz, H-2'), 4,41 (q, 1H,  $J$  = 5,48, 5,09 Hz, H-3'), 4,07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,34-3,13 (m, 3H, H-4', H-5');  $^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 6,71 (d, 1P,  $J$  = 30,81 Hz), 8,21 (d, 1P,  $J$  = 30,81 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2\text{S}^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 472,00986, determinada: 472,00967.

#### guanosina 5' -desoxi-5' -tio-7-metilguanosina-2' -difosforotiolato (Fig. 2, no. 13)

Se disolvió 5' -desoxi-5' -tioguanosina-7-metilguanosina-5' monofosforotioato imidazolida (Fig. 2, no. 10) (100 mg, 0,21 mmol) en DMF anhidro (2 ml), y se añadió tiosulfato de sodio (47 mg, 0,26 mmol), seguido por la adición de  $\text{ZnCl}_2$  (224,54 mg, 1,68 mmol). El progreso de la reacción se controló con RP-HPLC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida. Después, la reacción se paró por la adición de una solución acuosa de EDTA (490,56 mg, 1,68 mmol, 50 ml) y se neutralizó con  $\text{NaHCO}_3$  1 M. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex y la sal de TEA aislada se usó en la reacción de acoplamiento. Rendimiento: 110 mg (0,13 mmol, 64 %);

HRMS ESI (-) m/z calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}_2^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 487,98702, determinada: 487,98724.

#### Síntesis de análogos de 5'-S-caperuza a través de S-alquilación

##### Procedimiento general

Se suspendió sal TEA de nucleósido terminal tiosulfato (1 equiv.) en DMSO (a concentración aprox. 0,1-0,2 M). Después se añadieron DBU (1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-eno) (1 equiv.) y un derivado de 5'-yodoguanosina (1 equiv.). El progreso de la reacción se siguió por RP-HPLC. La reacción se paró después de que no hubiera señal del tiosulfato terminal por adición de ácido acético al 1 % a pH = 7, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se lavó con acetato de etilo. El producto se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex y se aisló como sal de trietilamonio. El producto se purificó por RP-HPLC semipreparativa.

#### P1-(guanosin-5'-il)-P2-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) difosfato – GppSG (Fig. 3, no. 19)

Se obtuvo GppSG (207 mOD, 0,009 mmol, 24 %) empezando de  $\text{GDP}\beta\text{S}$  (Fig. 3, nr 14) (506 mOD, 0,042 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC:  $t_R$  (A) = 6,9 min;

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 7,96 (s, 1 H), 7,81 (s, 1 H), 5,77 (d, 1 H,  $J$  = 5,48 Hz), 5,70 (d, 1 H,  $J$  = 5,87 Hz), 4,80-4,70 (m, 2H, solapada con la señal de agua), 4,64 (t, 1 H,  $J$  = 5,48 Hz), 4,43 (t, 1 H,  $J$  = 3,91 Hz), 4,37 (t, 1 H,  $J$  = 3,91 Hz), 4,30-4,15 (m, 4H), 3,30-3,13 (m, 2 H);

$^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 7,63 (d, 1P,  $J$  = 32,28, 12,5 Hz), -12,02 (d, 1P,  $J$  = 30,81 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 723,07531, determinada: 723,07546.

#### P1-(7-metilguanosin-5'-il)-P2-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) difosfato – $\text{m}^7\text{GppSG}$ (Fig. 3, no. 21)

Se obtuvo  $\text{m}^7\text{GppSG}$  (1028 mOD, 0,045 mmol, 9 %) empezando de  $\text{m}^7\text{GDP}\beta\text{S}$  (Fig. 3, no. 17, 5830 mOD, 0,51 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC:  $t_R$  (A) = 5,9 min;

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8,98 (s, 1 H, H-8  $\text{m}^7\text{G}$ ), 7,87 (s, 1 H, H-8 G), 5,88 (d, 1 H,  $J$  = 2,0 Hz, H-1'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 5,73 (d, 1 H,  $J$  = 5,7 Hz, H-1' G), 4,69 (t, 1 H,  $J$  = 5,5 Hz, H-2' G), 4,51 (bs, 1 H, H-2'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 4,32-4,44 (m, 5 H, H-3' G, H-3'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-4' G, H-4'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-5'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 4,24 (dd, 1 H,  $J$  = 11,3, 5,4 Hz, H5"  $\text{m}^7\text{G}$ ), 4,04 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3,24-3,41 (m, 2 H, H5', 5" G);

$^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 7,38 (dt, 1P,  $J$  = 29,0, 11,5 Hz), -12,00 (d, 1P,  $J$  = 32,23 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 737,09096, determinada: 737,09052.

#### P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P2-guanosin-5'-il difosfato – $\text{m}^7\text{GSppG}$ (Fig. 3, no. 23)

Se obtuvo  $\text{m}^7\text{GSppG}$  (1660 mOD, 0,073 mmol, 35 %) empezando de  $\text{GDP}\beta\text{S}$  (Fig. 3, no. 14) (2532 mOD, 0,21 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC:  $t_R$  (A) = 7,75 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 7,99 (s, 1 H, H-8 G), 5,83 (d, 1 H, J = 4,2 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,80 (d, 1 H, J = 6,0 Hz, H-1' G), 4,65-4,70 (2 H, m, H-2' G, H-2' m<sup>7</sup>G), 4,45 (t, 1 H, J = 4,1 Hz, H-3' G), 4,19-4,41 (5 H, m, H-3' m<sup>7</sup>G, H-4' G, H-4' m<sup>7</sup>G, H5', 5" G), 4,05 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3,35-3,43 (m, 2 H, H5', 5" m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 7,32 (dt, 1P, J = 29,0, 11,0 Hz), -11,84 (d, 1P, J = 29,00 Hz);

5 HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>S<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 737,09096, determinada: 737,09146.

**P1-(guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato – GpppSG (Fig. 3, no. 20)**

Se obtuvo GpppSG (1149 mOD, 0,051 mmol, 51 %) empezando de GTPyS (Fig. 3, no. 15; 1233 mOD, 0,10 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 5,50 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 8,02 (s, 1 H, H-8 G), 7,90 (s, 1 H, H-8 G), 5,82 (d, 1 H, J = 6,0 Hz, H-1' G), 5,78 (d, 1 H, J = 6,2 Hz, H-1' G), 4,84 (t, 1 H, J = 5,7 Hz, H-2' G), 4,74 (t, 1 H, J = 5,7 Hz, H-2' G), 4,52 (t, 1 H, J = 4,2 Hz, H-3' G), 4,47 (t, 1 H, J = 4,3 Hz, H-3' G), 4,30-4,38 (m, 2 H, H-4' G, H-4' m<sup>7</sup>G), 4,27 (m, 2 H, H-4' G, H-4' m<sup>7</sup>G), 3,25-3,35 (m, 2 H, H5', 5" G);

15 <sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 8,21 (dt, 1P, J = 27,00, 13,3 Hz), -11,34 (d, 1P, J = 19,30 Hz), -23,78 (dd, 1P, J = 27,00, 19,30 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 803,04164, determinada: 803,04135.

**P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato – m<sup>7</sup>GSpppG (Fig. 3, no. 24)**

Se obtuvo m<sup>7</sup>GSpppG (729 mOD, 0,032 mmol, 13 %) empezando de GTPyS (Fig. 3, no. 15; 3000 mOD, 0,25 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 5,36 min;

25 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 8,92 (s, 1 H, H-8 m<sup>7</sup>G), 7,96 (s, 1 H, H-8 G), 5,78 (d, 1 H, J = 4,30 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,74 (d, 1 H, J = 5,87 Hz, H-1' G), 4,63 (m, 2 H, H-2' G, H-2' m<sup>7</sup>G), 4,48 (dd, 1 H, J = 4,43, 3,52 Hz, H-3' m<sup>7</sup>G), 4,36-4,26 (m, 4 H, H-3' G, H-4' G, H-4' m<sup>7</sup>G, H-5' G), 4,24-4,19 (m, 1H, H-5" G), 4,00 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3,33-3,24 (2 H, m, H-5', 5" m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 7,57 (d, 1P, J = 27,88 Hz), -11,68 (d, 1P, J = 20,54 Hz), -24,00 (dd, 1P, J = 29,35, 22,01 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 817,05729, determinada: 817,05494.

**P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato – m<sup>7</sup>GpppSG (Fig. 3, no. 22)**

Se obtuvo m<sup>7</sup>GpppSG (1582 mOD, 0,07 mmol, 32 %) empezando de m<sup>7</sup>GTPyS (Fig. 3, no. 18; 2616 mOD, 0,23 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 6,06 min;

35 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 9,02 (s, 1 H, H-8 m<sup>7</sup>G), 7,87 (s, 1 H, H-8 G), 5,84 (d, 1 H, J = 3,52 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,70 (d, 1 H, J = 6,65 Hz, H-1' G), 4,80-4,67 (m, 1 H, H-2' G), 4,52 (t, 1 H, J = 4,30 Hz, H-2' m<sup>7</sup>G), 4,41 (dd, 2 H, J = 4,70, 4,30 Hz, H-3' G, H-3' m<sup>7</sup>G), 4,38-4,30 (m, 2 H, H-4' G, H-4' m<sup>7</sup>G), 4,36-4,31 (m, 2H, H-5' m<sup>7</sup>G), 4,02 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3,30-3,20 (m, 2 H, J = 12,6, 6,3 Hz, H5', 5" G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 7,66 (d, 1P, J = 29,35 Hz), -11,73 (d, 1P, J = 22,01 Hz), -23,95 (dd, 1P, J = 22,01, 27,88 Hz);

40 HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 817,05729, determinada: 817,05748.

**P1-(2'-O-metil-7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato – m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GSpppG (Fig. 3, no. 26)**

Se obtuvo m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GSpppG (140 mOD, 0,006 mmol, 5 %) empezando de GTPyS (Fig. 3, no. 15; 1500 mOD, 0,12 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 7,89 min;

45 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 7,93 (s, 1H, G), 5,81 (d, 1H, J = 3,91 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,72 (d, 1H, J = 6,26 Hz, H-1' G), 4,65 (t, 1H, J = 5,48 Hz, H-2' m<sup>7</sup>G), 4,43-4,40 (m, 1H, H-2' G, H-3' m<sup>7</sup>G), 4,32-4,18 (m, 6H, H-3' G, H-4' G, H-5' G, m<sup>7</sup>G), 4,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,52 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>);

50 <sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 7,35 (d, 1P, J = 26,41 Hz), -11,68 (d, 1P, J = 19,07 Hz), -24,02, -24,18 (2d, 1P, J = 26,41, 19,07 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 831,07294, determinada: 831,07477.

**P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il-2,3-metilenotrifosfato – m<sup>7</sup>GSppCH<sub>2</sub>pG (Fig. 3, no. 25)**

Se obtuvo m<sup>7</sup>GSppCH<sub>2</sub>pG (353 mOD, 0,016 mmol, 27 %) empezando de m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>ppyS (Fig. 3, no. 16; 717 mOD, 0,06 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 6,36 min;

60 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 9,03 (s, 1H, H-8, m<sup>7</sup>G), 8,17 (s, 1H, G), 5,83 (d, 1H, J = 4,30 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,78 (d, 1H, J = 4,48 Hz, H-1' G), 4,70-4,66 (m, 2H, H-2' m<sup>7</sup>G, H-2' G), 4,46 (d, 1H, J = 3,91, 5,09 Hz, H-3' G), 4,38-4,33 (m, 2H, H-3' m<sup>7</sup>G, H-4' G), 4,32-4,28 (m, 1H, H-4' m<sup>7</sup>G), 4,26-4,20 (m, 1H, H-5' G), 4,19-4,13 (m, 1H, H-5" G), 4,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,34-3,22 (m, 4H, H-5' G, m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 17,03 (d, 1P, J = 10,27 Hz), 7,47-6,97 (m, 2P);

65 HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 815,07803, determinada: 815,07923.

**Síntesis de análogos de 5'-S-caperuza a través de imidazolidas**

*Procedimiento general*

Se suspendieron 5'-S-GMP-Im (Fig. 2, no. 9) (sal de Na, 50 mg, 0,11 mmol) y un difosfato apropiado (1 mmol):  $m_2^{7,2'-O}$ -GDP (Fig. 4, no. 28),  $m^7$ GpCH<sub>2</sub>p (Fig. 4, no. 27),  $m^7$ -5'-S GDP (Fig. 2, no. 12),  $m^7$ GSpp $\beta$ S (Fig. 2, no. 13) o  $m^7$ GDP $\beta$ S (Fig. 3, no. 17) en DMF anhidro (1,0 ml) seguido por adición de ZnCl<sub>2</sub> anhidro (95 mg, 10 eq, 0,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente hasta que los reactivos se disolvieron. El progreso de la reacción se siguió por RP-HPLC. Después de la terminación (24 h), se añadió una cantidad apropiada de solución de EDTA (Na<sub>2</sub>EDTA, 237 mg, 0,7 mmol), se ajustó el pH a 6 con NaHCO<sub>3</sub> sólido, seguido por purificación del producto crudo por cromatografía de intercambio iónico por DEAE-Sephadex y se aisló como sales de TEA (o se purificó directamente por HPLC preparativa). Los productos se purificaron adicionalmente por RP-HPLC.

**P1-(2'-O-metil-7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato –  $m_2^{7,2'-O}$ GpppSG (Fig. 4, no. 38)**

Se obtuvo  $m_2^{7,2'-O}$ GpppSG (122 mOD, 0,005 mmol, 6 %) empezando de  $m_2^{7,2'-O}$ GDP (Fig. 4, no. 28; 912 mOD, 0,08 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC:  $t_R$  (A) = 6,29 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 9,00 (s, 1H, H-8 m<sup>7</sup>G), 7,88 (s, 1H, G), 5,87 (d, 1H, J = 2,74 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,69 (d, 1H, J = 6,65 Hz, H-1' G), 4,64 (t, 1H, J = 5,48 Hz, H-2' m<sup>7</sup>G), 4,48 (dd, 1H, J = 4,48 Hz, H-2' G), 4,43-4,38 (m, 2H, H-3' G, H-3' m<sup>7</sup>G), 4,36-4,32 (m, 1 H, H-4' G), 4,30-4,26 (m, 1H, H-4' m<sup>7</sup>G), 4,25-4,16 (m, 2H, H-5' G), 4,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,53 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,30-3,22 (m, 2H, H-5' m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 7,68 (d, 1P, J = 27,88 Hz), -11,68 (d, 1P, J = 20,54 Hz), -23,78, -23,94 (2d, 1P, J = 27,88, 19,07 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 831,07294, determinada: 831,07350.

**P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 1,2-metilenotrifosfato –  $m^7$ GpCH<sub>2</sub>ppSG (Fig. 4, no. 37)**

Se obtuvo  $m^7$ GpCH<sub>2</sub>ppSG (1002 mOD, 0,044 mmol, 25 %) empezando de  $m^7$ GpCH<sub>2</sub>p (Fig. 4, no. 27; 2052 mOD, 0,18 mmol) y 5'-S-GMP-Im (122 mg, 0,27 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC:  $t_R$  (A) = 6,26 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 9,31 (s, 1H, H-8 m<sup>7</sup>G), 8,02 (s, 1H, G), 5,90 (d, 1H, J = 3,13 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,75 (d, 1H, J = 5,87 Hz, H-1' G), 4,80-4,70 (m, 2H, solapada con la señal del solvente, H2' m<sup>7</sup>G, H-2' G), 4,58 (dd, 1H, J = 3,91, 3,48 Hz, H-3' G), 4,48 (t, 1H, H-3' m<sup>7</sup>G), 4,40 (dd, 1H, J = 3,91, 4,06, H-4' G), 4,37-4,29 (m, 3H, H-4' m<sup>7</sup>G, H-5' G), 4,19-4,13 (m, 2H, H-5' G), 4,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,30-3,19 (m, 2H, H-5' G, m<sup>7</sup>G), 2,40 (t, 2H, J = 20,35 Hz, CH<sub>2</sub>);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 17,11 (d, 1P, J = 8,80 Hz), 7,64-6,76 (m, 2P);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 815,07803, determinada: 815,07906.

**P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato –  $m^7$ GSpppSG (Fig. 4, no. 32)**

Se obtuvo  $m^7$ GSpppSG (768 mOD, 32 mg, 0,028 mmol, 40 %) empezando de  $m^7$ -5'-S GDP (57 mg, 0,07 mmol) y 5'-S-GMP-Im (50 mg, 0,11 mmol) según el procedimiento general. RP-HPLC:  $t_R$  (A) = 6,80 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 8,38 (s, 1 H, H-8 m<sup>7</sup>G lentamente intercambiable), 7,84 (s, 1H, G), 5,78 (d, 1H, J = 4,70 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,69 (d, 1H, J = 6,65 Hz, H-1' G), 4,64 (t, 1H, J = 4,70 Hz, H-2' m<sup>7</sup>G), 4,40, 4,39 (2d, 1H, J = 2,74, 3,52, 4,40 Hz, H-3' G), 4,36-4,29 (m, 3H, H-4' G, H-5' G), 3,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,37-4,28 (m, 3H, H-4' H-5' m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 7,74 (t, 2P, J = 27,88), -24,61 (t, 1P, J = 29,35 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 833,03445, determinada: 833,03550.

**P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-tiotrifosfato –  $m^7$ GSpp<sub>s</sub>pG D1/D2 (Fig. 4, no. 30, 31, respectivamente)**

Se obtuvo  $m^7$ GSpp<sub>s</sub>pG (1080 mOD, 45 mg, 0,039 mmol, 56 %) como una mezcla de diastereoisómeros D1/D2 empezando de  $m^7$ GSpp $\beta$ S (56 mg, 0,07 mmol) y 5'-S-GMP-Im (50 mg, 0,11 mmol) según el procedimiento general. Los diastereoisómeros se separaron usando RP-HPLC y se aislaron como sales de amonio. D1 (Fig. 4, no. 30): (438 mOD, 18 mg, 0,016 mmol, 23 %) RP-HPLC:  $t_R$  (A) = 6,56 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 8,98 (s, 1H, H-8 m<sup>7</sup>G), 8,08 (s, 1H, G), 5,82 (d, 1H, J = 4,27 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,77 (d, 1H, J = 5,80 Hz, H-1' G), 4,67-4,65 (m, 2H, H-2' m<sup>7</sup>G, H-2' G), 4,49-4,47 (m, 1H, H-3' G), 4,39-4,35 (m, 1H, H-3' m<sup>7</sup>G, H-4' G), 4,33-4,23 (m, 3H, H-4' m<sup>7</sup>G, H-5' G), 4,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,38-3,25 (m, 2H, H-5' m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 29,18 (dd, 1P, J = 34,83, 27,37 Hz), 6,96 (dt, 1P, J = 34,83, 12,44 Hz), -12,37 (d, 1P, J = 27,37 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 833,03445, determinada: 833,03549;

D2 (Fig. 4, no. 31):  $m^7$ GSpp<sub>s</sub>pG D2 (380 mOD, 16 mg, 0,014 mmol, 20 %) RP-HPLC:  $t_R$  (A) = 6,71 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 8,98 (s, 1H, H-8 m<sup>7</sup>G), 8,14 (s, 1H, G), 5,82 (d, 1H, J = 4,27 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,77 (d, 1H, J = 5,49 Hz, H-1' G), 4,69-4,65 (m, 2H, H-2' m<sup>7</sup>G, H-2' G), 4,49-4,45 (m, 1H, H-3' G), 4,40-4,35 (m, 1H, H-3' m<sup>7</sup>G, H-4' G), 4,34-4,21 (m, 3H, H-4' m<sup>7</sup>G, H-5' G), 4,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,39-3,24 (m, 2H, H-5' m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 29,44-28,67 (m, 1P), 7,17-6,54 (m, 1P), -12,09-(-12,72) (m, 1P);  
 HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 833,03445, determinada: 833,03606.

**P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato – m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D1/D2 (Fig. 4, no. 33, 34, respectivamente)**

Se obtuvo m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG (942 mOD, 39 mg, 0,003 mmol, 48 %) como una mezcla de diastereoisómeros D1/D2 empezando de m<sup>7</sup>GSppβS (56 mg, 0,07 mmol) y 5'S-GMP-lm (50 mg, 0,11 mmol) según el procedimiento general. Los diastereoisómeros se separaron usando RP-HPLC y se aislaron como sales de amonio. D1 (Fig. 4, no. 33): (510 mOD, 21 mg, 0,018 mmol, 26 %) RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 7,53 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 9,00 (s, 1H, H-8, m<sup>7</sup>G), 7,99 (s, 1H, G), 5,83 (d, 1H, J = 4,27 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,75 (d, 1H, J = 6,10 Hz, H-1' G), 4,79-4,68 (m, 2H, solapada con la señal del solvente, H-2' m<sup>7</sup>G, H-2' G), 4,44 (dd, 1H, J = 4,58 Hz, H-3' G), 4,41-4,33 (m, 3H, H-3', m<sup>7</sup>G, H-4' G, m<sup>7</sup>G), 4,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,39-3,26 (m, 4H, H-5' G, m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 28,25 (t, 1P, J = 34,83 Hz), 7,31-6,74 (m, 2P);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 849,01161, determinada: 849,01213;

D2 (Fig. 4, no. 34): (274 mOD, 11 mg, 0,0098 mmol, 14 %) RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 7,62 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 8,99 (s, 1H, H-8, m<sup>7</sup>G), 8,04 (s, 1H, G), 5,83 (d, 1H, J = 4,58 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,75 (d, 1H, J = 6,10 Hz, H-1' G), 4,78-4,66 (m, 2H, solapada con la señal del solvente, H-2' m<sup>7</sup>G, H-2' G), 4,46-4,42 (m, 1H, H-3' G), 4,41-4,34 (m, 3H, H-3', m<sup>7</sup>G, H-4' G, m<sup>7</sup>G), 4,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,39-3,24 (m, 4H, H-5' G, m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 28,29 (t, 1P, J = 34,83 Hz), 7,32-6,68 (m, 2P);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 849,01161, determinada: 849,01217.

**P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato – m<sup>7</sup>Gpp<sub>s</sub>pSG D1/D2 (Fig. 4, no. 35, 36, respectivamente)**

Se obtuvo m<sup>7</sup>Gpp<sub>s</sub>pSG (1941 mOD, 0,086 mmol, 28 %) como una mezcla de diastereoisómeros D1/D2 empezando de m<sup>7</sup>GDPβS (3492 mOD, 0,31 mmol) y 5'S-GMP-lm (5550 mOD, 0,46 mmol) según el procedimiento general. Los diastereoisómeros se separaron usando RP-HPLC y se aislaron como sales de amonio. D1 (Fig. 4, no. 35): (888 mOD, 0,039 mmol, 13 %) RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 7,12 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 9,07 (s, 1H, H-8, m<sup>7</sup>G), 7,95 (s, 1H, G), 5,88 (d, 1H, J = 3,52 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,74 (d, 1H, J = 6,26 Hz, H-1' G), 4,80-4,70 (m, 2H, H-2' m<sup>7</sup>G, H-2' G solapada con la señal de D<sub>2</sub>O), 4,56 (dd, 1H, J = 4,70, 3,52 Hz, H-3' G), 4,47-4,40 (m, 2H, H-3', m<sup>7</sup>G, H-4' G), 4,39-4,33 (m, 3H, H-4', m<sup>7</sup>G, H-5' G), 4,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,35-3,20 (m, 2H, H-5', m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 29,00 (dd, 1P, J = 33,75, 26,41Hz), 6,98 (d, 1P, J = 33,75, Hz), -12,56 (d, 1P, J = 24,94 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 833,03445, determinada: 833,03514;

D2 (Fig. 4, no. 36): m<sup>7</sup>Gpp<sub>s</sub>pSG D2 (1053 mOD, 0,046 mmol, 15 %) RP-HPLC: t<sub>R</sub> (A) = 7,42 min;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 9,04 (s, 1H, H-8, m<sup>7</sup>G), 7,95 (s, 1H, G), 5,85 (d, 1H, J = 3,52 Hz, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,73 (d, 1H, J = 6,26 Hz, H-1' G), 4,80-4,70 (m, 2H, H-2' m<sup>7</sup>G, H-2' G solapada con la señal de D<sub>2</sub>O), 4,54 (dd, 1H, J = 4,30, 3,91 Hz, H-3' G), 4,45 (t, 1H, J = 5,09 Hz, H-3', m<sup>7</sup>G), 4,43-4,40 (m, 1H, H-4' G), 4,39-4,32 (m, 3H, H-4', m<sup>7</sup>G, H-5' G), 4,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,37-3,21 (m, 2H, H-5', m<sup>7</sup>G);

<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 28,99 (dd, 1P, J = 33,75, 26, 41, 24,94Hz), 6,94 (d, 1P, J = 35,21, Hz), -12,48 (d, 1P, J = 24,94 Hz);

HRMS ESI (-) m/z calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 833,03445, determinada: 833,03494.

**Tabla 4.** Se presentan nuevos análogos de caperuza sintetizados y estudiados.

Número	Compuesto	Fórmula estructural	Nombre químico
12	m <sup>7</sup> GSpp		5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-7-metilguanósina difosfato
21	m <sup>7</sup> GppSG		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P2-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) difosfato
22	m <sup>7</sup> GpppSG		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato
23	m <sup>7</sup> GSppG		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P2-guanosin-5'-il difosfato

24	$m^7GSpppG$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2,3 metilenotrifosfato
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-metil-7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
30	$m^7GSppspG \text{ D1}$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-trifosfato D1
31	$m^7GSppspG \text{ D2}$		P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-trifosfato D2

32	$m^7GpppSG$		<b>P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato</b>
33	$m^7GpppSG \text{ D1}$		<b>P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-trifosfato D1</b>
34	$m^7GSpSpSG \text{ D2}$		<b>P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-trifosfato D2</b>
35	$m^7GppSpSG \text{ D1}$		<b>P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-trifosfato D1</b>

36	$m^7GpppSG$ D2		<p><b>P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-trifosfato D2</b></p>
37	$m^7GpCH_2ppSG$		<p><b>P1-(7-metil-5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 1,2-metilenotrifosfato</b></p>
38	$m^{7,20}GpppSG$		<p><b>P1-(2'-O-metil-7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desossi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato</b></p>



**Ejemplo 2. Características de los nuevos análogos de caperuza****Ensayo 1. El estudio de susceptibilidad de los análogos a degradación por la enzima DcpS.**

El fin del ensayo era comprobar si los nuevos análogos de caperuza 5'-tiofosfato son hidrolizados por la enzima DcpS humana (hDcpS). Se expresó proteína humana recombinante que codifica la enzima DcpS como se ha descrito previamente (Kowalska, Lewdorowicz et al. 2008). La susceptibilidad de los nuevos análogos a hidrólisis con hDcpS se ensaya en tampón Tris-HCl 50 mM que contiene KCl 200 mM y EDTA 0,5 mM. La mezcla de reacción incluye el análogo de caperuza ensayado (20  $\mu$ M) y enzima DcpS (100 nM) en 400  $\mu$ l de tampón. En los intervalos apropiados se recoge una muestra de 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción. La muestra se incubaba a 98 °C durante 2,5 min, y después se enfrió a 0 °C y se analizó en RP-HPLC en las condiciones descritas en informaciones generales. En los ensayos también se ensayó inhibidor de DcpS, comercialmente disponible el compuesto RG3039 (no. 000) (<https://www.mda.org/quest/fda-approves-phase-1-clinical-trial-rg3039-sma>), GppSG (no. 19), GpppSG (no. 20), así como m<sup>7</sup>GpppG (no. 0) y m<sup>7</sup>Gpp (no. 00) como controles. Los resultados ejemplares obtenidos se muestran en la figura 5 y la tabla 5.

**Ensayo 2. Determinación de la  $CI_{50}$  para inhibidores seleccionados**

El fin del ensayo era determinar la concentración en donde el inhibidor determinado inhibe la actividad DcpS al 50 % del valor máximo en las condiciones particulares. El tampón en este ensayo y en el ensayo 1 es el mismo. Se prepararon diez mezclas de reacción al mismo tiempo y cada una de ellas contenía un m<sup>7</sup>GMPF (60  $\mu$ M), enzima hDcpS (50 nM) y el compuesto ensayado en un intervalo de concentración entre 0-50  $\mu$ M en 200  $\mu$ l de tampón. Después del tiempo apropiado, cuando el 30 % del sustrato se convirtió en producto sin inhibidor, la reacción se paró mezclando con 100  $\mu$ l de ACN. Se tomaron muestras de 25  $\mu$ l para análisis, seguido por mezclar con 90  $\mu$ l de solución TBDS-fluoresceína de concentración 2,5  $\mu$ M en DMSO e incubar durante 60 min. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de tampón HEPES 200 mM pH = 7,0 a las muestras y se midió la fluorescencia como se describe en la información general. Basado en los resultados, se representó la dependencia de la concentración de inhibidor frente a la fluorescencia y se determinaron los valores  $CI_{50}$  ajustando una curva teórica a los datos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5 y la tabla 5.

**Tabla 5.** Valores  $CI_{50}$  y susceptibilidad para la degradación por enzima DcpS para compuestos seleccionados.

No.	Compuesto	Susceptibilidad a DcpS	$CI_{50}$ [ $\mu$ M]
0	m <sup>7</sup> GpppG	hidrolizable	nd
00	m <sup>7</sup> Gpp	<b>resistente/inhibidor</b>	4.30 $\pm$ 0.78
000	RG3039	<b>resistente/inhibidor</b>	0.041 $\pm$ 0.012
12	m <sup>7</sup> GSpp	<b>resistente/inhibidor</b>	1.93 $\pm$ 0.38
19	GppSG	hidrolizable	más de 100
20	GpppSG	hidrolizable	más de 100
21	m <sup>7</sup> GppSG	hidrolizable	nd
22	m <sup>7</sup> GpppSG	hidrolizable	nd
23	m <sup>7</sup> GSppG	<b>resistente/inhibidor</b>	2.81 $\pm$ 0.51
24	m <sup>7</sup> GSpppG	<b>resistente/inhibidor</b>	0.84 $\pm$ 0.07
25	m <sup>7</sup> GSppCH <sub>2</sub> pG	<b>resistente/inhibidor</b>	6.25 $\pm$ 1.22
26	m <sup>7,20</sup> GSpppG	<b>resistente/inhibidor</b>	12.57 $\pm$ 5.22
30	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pG D1	<b>resistente/inhibidor</b>	0.23 $\pm$ 0.04
31	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pG D2	<b>resistente/inhibidor</b>	0.17 $\pm$ 0.02
32	m <sup>7</sup> GSpppSG	<b>resistente/inhibidor</b>	0.33 $\pm$ 0.09
33	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pSG D1	<b>resistente/inhibidor</b>	0.26 $\pm$ 0.04
34	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pSG D2	<b>resistente/inhibidor</b>	<b>0.051 <math>\pm</math> 0.008</b>
35	m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pSG D1	hidrolizable	nd
36	m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pSG D2	hidrolizable	nd
37	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> ppSG	<b>resistente/inhibidor</b>	5.67 $\pm$ 1.01
38	m <sup>7,20</sup> GpppSG	hidrolizable	72 $\pm$ 17

**Ensayo 3. Determinación de la estructura de la enzima DcpS humana ( $\Delta$ N37hDcpS) en complejo con el análogo no. 34 (m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D2)**

El fin de este ensayo era estudiar el mecanismo de interacciones del análogo no. 34 con la enzima DcpS humana. Se obtuvo enzima DcpS humana recombinante truncada en el extremo N ( $\Delta$ N37 – residuos Ala38 a Ser337) como se ha descrito anteriormente (Singh et al. 2008). Se realizó cristalización por difusión de vapor por gota sedente usando 0,2  $\mu$ l de muestra que contenía análogo 34 0,1 M y enzima DcpS 7,3 mg/ml (incubada en hielo durante 15 min antes del

montaje de la cristalización) y 0,2  $\mu$ l de solución de depósito. Aparecieron cristales del complejo en una mezcla que contenía PEG 4000 al 29 % y Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 después de aproximadamente una semana. A la gota que contenía el cristal se añadió una mezcla de solución de depósito y glicerol (1:1, v/v) y después los cristales se recogieron y congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Los datos de difracción se recogieron a 100K en la fuente del sincrotrón (Beamline 14.1, Bessy II; Helmholtz-Zentrum, Berlín, Alemania) usando un detector Dectris PILATUS 6M y después los datos se procesaron usando software XDS (Kabsch 2010). La estructura se resolvió por reemplazo molecular usando software Phaser (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) con una estructura de DcpS unida al inhibidor DG157493 (pdb: 3BL9) (Singh, Salcius et al. 2008) como un modelo de búsqueda. Se generaron el modelo de ligando y diccionario usando ProDRG (Schuttelkopf y van Aalten 2004). La construcción del modelo y el ajuste del ligando se realizó en software Coot (Emsley & Cowtan 2004). La estructura se refinó usando phenix.refine (Adams, Afonine et al. 2010).

#### Ensayo 4. Estudio de la susceptibilidad de moléculas cortas de ARN que comprenden análogos de caperuza en el extremo 5' a degradación con la enzima Dcp1/2.

El fin de este estudio era comprobar si la incorporación de análogos de caperuza 5'-fosfotioato seleccionados al extremo 5' de ARN podría influir la susceptibilidad de los transcritos así preparados hacia la actividad de la enzima anticaperuza Dcp1/2. Se obtuvo proteína recombinante de *Schizosaccharomyces pombe* en forma de un heterodímero Dcp1/2 como se ha descrito previamente (Floor, Jones et al. 2010). Los transcritos utilizados en este ensayo se obtuvieron por transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa SP6 (New England BioLabs). Los oligonucleótidos hibridados: ATACGATTTAGGTGACACTATAGAAGAAGCGGGCATGCGGCCAGCCATAGCCGATCA (SEQ ID NO.: 1), y TGATCGGCTAGGCTGGCCGCATGCCGCTTCTTCTATAGTGTACCTAAATCGTAT (SEQ ID NO: 2) se usaron como molde en la transcripción *in vitro*, los oligonucleótidos que comprenden la secuencia promotora para la polimerasa SP6 (ATTTAGGTGACACTATAGA (SEQ ID NO: 3)) permitieron obtener ARN de 35 nt de longitud que tienen una secuencia de GAAGAAGCGGGCAUGCGGCCAGCCAUAGCCGAUCA (SEQ ID NO: 4), sin embargo, los ARN con caperuza en el extremo 5' tienen 36 nt de longitud. La reacción de transcripción *in vitro* típica se realizó en un volumen de 20  $\mu$ l y se incubó a 40 °C durante 2 horas y contenía lo siguiente: polimerasa SP6 1 U, inhibidor de RNasa RiboLock (ThermoFisher Scientific) 1 U, ATP/CTP/UTP 0,5 mM, GTP 0,125 mM, análogo de caperuza dinucleotídico 1,25 mM y molde 0,1  $\mu$ M. Después de 2 horas de incubación, se añadió DNasa I (Ambion) 1 U a la mezcla de reacción y se siguió la incubación durante 30 min a 37 °C, después de lo cual se añadió EDTA a una concentración final de 25 mM. Los ARN obtenidos se purificaron usando RNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research). Después se determinó la calidad del ARN sintetizado en un gel de poliácridamida al 15 % desnaturante. La concentración del ARN se evaluó a su vez espectrofotométricamente. El ARN así obtenido se caracteriza por heterogeneidad sustancial del extremo 3', de ahí que para eliminar el problema, los ARN obtenidos se incubaron con DNazima 10-23 (TGATCGGCTAGGCTAGCTACAACGAGGCTGGCCGC (SEQ ID NO: 5)) que llevó a obtener ARN de 25 nt de longitud. El ARN que tiene una caperuza en el extremo 5' tenía 26 nt de longitud. La reacción de cortar los extremos 3' fue como sigue: se incubó 1  $\mu$ M de ARN con 1  $\mu$ M de DNazima 10-23 en una mezcla que contenía MgCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8,0 durante 1 hora a 37 °C (Coleman et al., 2004).

Para los ensayos enzimáticos se usaron 20 ng de cada ARN, que se incubaron con enzimas Dcp1/2 3,5 nM en tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0 NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, NP-40 al 0,01 %, DTT 1 mM, y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Las reacciones se realizaron a 37 °C en el volumen final de 25  $\mu$ l. La reacción se paró después de 0, 5, 15 y 30 min añadiendo una cantidad igual de una mezcla de urea 5 M, formamida al 44 %, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0,03 %, xileno cianol al 0,03 %. Los productos de reacción se resolvieron en geles de poliácridamida al 15 % desnaturantes, después de completar la separación electroforética, el gel se tiñó con SYBR Gold (Invitrogen) y se visualizó usando un Storm 860 PhosphorImager (GE Healthcare). La cuantificación de los resultados obtenidos se realizó con software ImageQuant (Molecular Dynamics). Se presentaron resultados representativos de este ensayo en la figura 8, figura 9 y también en la tabla 6.

**Tabla 6.** Propiedades biológicas de los ARNm que comprenden análogos de caperuza seleccionados en el extremo 5'

	eficacia de caperuza <sup>a</sup>	susceptibilidad a Dcp1/2 <sup>b</sup>	eficacia de traducción relativa <sup>c</sup>
GpppG	0.91	0	0.05 $\pm$ 0.01
m <sup>7</sup> GpppG	0.93	0.69	1.00
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GpppG	0.84	0.52	1.56 $\pm$ 0.14
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GpppG D2	0.82	0.43	3.45 $\pm$ 0.42
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GSpppG	0.70	0.07	1.73 $\pm$ 0.24
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GpppSG	0.76	0.52	2.23 $\pm$ 0.31

<sup>a</sup> Los datos de la figura 8 (punto de tiempo 0') se usaron para calcular la eficacia de añadir caperuza

<sup>b</sup> Los datos de la figura 8 se usaron para calcular la susceptibilidad a la actividad Dcp1/2, dada como la razón de los ARN con caperuza respecto a una suma de ARN sin caperuza y con caperuza en un punto de tiempo 15 min y después de normalización respecto al tiempo 0' para los ARN individuales.

<sup>c</sup> La eficacia de traducción relativa muestra la eficacia de traducción media de los ARNm de luciferasa de *Renilla* en triplicados biológicos después de la normalización respecto a los valores obtenidos para ARNm con caperuza con m<sup>7</sup>GpppG en el extremo 5'.

#### **Ensayo 5. Estudio sobre el efecto de la presencia de los análogos de caperuza novedosos sobre la eficacia de traducción de los ARNm en lisado de reticulocitos de conejo.**

El fin de este estudio era comprobar el efecto de introducir análogos de caperuza novedosos en el extremo 5' de los ARNm sobre la eficacia de la traducción. Para este fin se prepararon series de ARNm que codifican la luciferasa de *Renilla* y que se diferencian en la estructura de la caperuza en el extremo 5'. Los transcritos usados para este ensayo se obtuvieron por reacción de transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa SP6. Como molde para la transcripción *in vitro* se usó un producto de PCR, preparado usando los cebadores ATTTAGGTGACACTATAGAACAGATCTCGAGCTCAAGCTT (SEQ ID NO: 6) y GTTTAAACATTTAAATGCAATGA (SEQ ID NO: 7) y el plásmido hRLuc-pRNA2(A)128 (Williams et al. 2010). La reacción de PCR así realizada permitió introducir la secuencia promotora para la polimerasa SP6 antes de la secuencia que codifica la luciferasa de *Renilla*. La reacción de transcripción misma era similar a la síntesis de ARN corto descrita anteriormente (Ensayo 4). La reacción se realizó durante 2 horas en 20 µl a 40 °C y contenía lo siguiente: polimerasa SP6 1 U, inhibidor de RNasa RiboLock (ThermoFisher Scientific) 1 U, ATP/CTP/UTP 0,5 mM, GTP 0,125 mM, análogo de caperuza dinucleotídico 1,25 mM y 100 µg de un molde. Después de 2 horas de incubación, se añadió DNasa I (Ambion) 1 U y la incubación se siguió durante 30 min a 37 °C, después de lo cual se añadió EDTA a una concentración final de 25 mM. Los ARNm obtenidos se purificaron usando NucleoSpin RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel). La calidad del ARN sintetizado se comprobó en un gel de poliacrilamida al 15 % desnaturalizante. Las concentraciones de ARN se determinaron espectrofotométricamente.

Se realizó una reacción de traducción *in vitro* en lisado de reticulocitos de conejo (RRL; Promega) en condiciones determinadas para la traducción dependiente de caperuza (Rydzik et al., 2009). Una mezcla de reacción típica (10 µl) contenía: lisado RRL al 40 %, mezcla de aminoácidos (Promega) 0,01 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, acetato de potasio 170 mM y un ARNm que codifica luciferasa de *Renilla* con un análogo de caperuza apropiado en el extremo 5', la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se usaron cuatro concentraciones diferentes de los ARNm: 0,1 ng/µl, 0,25 ng/µl, 0,5 ng/µl, 0,75 ng/µl en el experimento. La actividad de la luciferasa sintetizada se midió usando el sistema ensayo de indicador de luciferasa dual (Promega) en un lector de microplacas Synergy H1 (BioTek). Los resultados obtenidos se analizaron en el software Origin (Gambit), y la curva teórica se ajustó a los datos experimentales, en donde la pendiente de la curva obtenida representa la eficacia de traducción. Se presentaron datos representativos en la figura 10, mientras que la eficacia de traducción media obtenida para triplicados biológicos se presenta en la tabla 6.

#### **Ensayo 6. Estudio sobre el efecto de la presencia de los análogos de caperuza novedosos sobre la eficacia de traducción de los ARNm en células HeLa.**

Se hicieron crecer células de carcinoma cervical humano HeLa en DMEM (Gibco) suplementado con SBF (Sigma-Aldrich) al 10 %, penicilina/estreptomicina (Gibco) al 1 % y L-glutamina con una concentración final de 2 mM en CO<sub>2</sub> al 5 % y 37 °C. Un día antes del experimento planeado, 10<sup>4</sup> células suspendidas en 100 µl de medio sin antibióticos se sembraron por cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La transfección de células fue como sigue: se añadieron a cada pocillo 0,3 µl de reactivo de transfección Lipofectamine MessengerMAX (Invitrogen), 0,1 µg de ARNm y 10 µl de Opti-MEM (Gibco). Las transfecciones se realizaron durante 1 hora en un incubador. Después de la transfección, las células se lavaron tres veces con PBS y se suplementaron con medio fresco sin antibióticos. Después de 2, 3, 4,5, 6,5, 10,5 y 24 horas desde el inicio de la transfección, las células se lavaron tres veces con PBS, se lisaron y se midió la actividad luciferasa usando el sistema ensayo de indicador de luciferasa dual (Promega) empleando un lector de microplacas Synergy H1. (Los datos ejemplares se muestran en la figura 11).

Se usó ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga y que tiene dos repeticiones de la 3'UTR de β-globina y cola de poli(A) de 128 adeninas en el extremo 3' para transfección. Este ARNm, que comprende diferentes análogos de caperuza en el extremo 5' se obtuvo por transcripción *in vitro*. Se usó el plásmido pJET\_luc\_128A digerido con AarI (ThermoFisher Scientific) como un molde para la síntesis. La reacción de transcripción *in vitro* típica se realizó durante 2 horas en un volumen de 20 µl a 40 °C y contenía lo siguiente: polimerasa SP6 1 U, inhibidor de RNasa RiboLock (ThermoFisher Scientific) 1 U, ATP/CTP/UTP 0,5 mM, GTP 0,125 mM, análogo de caperuza dinucleotídico 1,25 mM y 0,1 µg del molde. Las siguientes etapas de preparación del ARNm como se describen anteriormente en el caso de ARNm que codifica la luciferasa de *Renilla* (Ensayo 5). Además, después de la purificación del ARNm usando columna de NucleoSpin RNA Clean-up XS los transcritos se precipitaron en etanol en presencia de 2 µg de glucógeno y acetato de sodio, después se disolvieron en agua desionizada.

**Bibliografía**

- Abrams, W. R. y J. A. Schiff (1973). "Studies of sulfate utilization by algae. II. An enzyme-bound intermediate in the reduction of adenosine-5'-phosphosulfate (APS) by cell-free extracts of wild-type *Chlorella* and mutants blocked for sulfate reduction." Arch Mikrobiol **94**(1): 1-10.
- 5 Adams, P., P. Afonine, G. Bunkoczi, V. Chen, I. Davis, N. Echols, J. Headd, L. Hung, G. Kapral, R. Grosse-Kunstleve, A. McCoy, N. Moriarty, R. Oeffner, R. Read, D. Richardson, J. Richardson, T. Terwilliger y P. Zwart (2010). "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **66**: 213-221.
- 10 Akagi, J. M. y L. L. Campbell (1962). "STUDIES ON THERMOPHILIC SULFATE-REDUCING BACTERIA III.: Adenosine Triphosphate-sulfurylase of *Clostridium nigrificans* and *Desulfovibrio desulfuricans*." J Bacteriol **84**(6): 1194-1201.
- 15 Arakawa, H., M. Shiokawa, O. Imamura y M. Maeda (2003). "Novel bioluminescent assay of alkaline phosphatase using adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate as substrate and the luciferin-luciferase reaction and its application." Anal Biochem **314**(2): 206-211.
- 20 Bail, S. y M. Kiledjian (2008). "DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes?" Rna Biology **5**(4): 216-219.
- Barnes, S., R. Waldrop y A. S. Neighbors (1983). "Alkaline butanol extraction of bile salt and steroid sulfate esters: application to the assay of sulfotransferases." Anal Biochem **133**(2): 470-475.
- 25 Butchbach, M. E. R., J. Singh, M. Porsteinsdóttir, L. Saieva, E. Slominski, J. Thurmond, T. Andrésson, J. Zhang, J. D. Edwards, L. R. Simard, L. Pellizzoni, J. Jarecki, A. H. M. Burghes y M. E. Gurney (2010). "Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy." Human Molecular Genetics **19**(3): 454-467.
- 30 Contreras, R. y W. Fiers (1981). "Initiation of transcription by rna polymerase-II in permeable, SV40-infected or noninfected, CV1 cells - evidence for multiple promoters of SV40 late transcription." Nucleic Acids Research **9**(2): 215-236.
- 35 Emsley, P. y K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **60**: 2126-2132.
- Floor, S., B. Jones, G. Hernandez y J. Gross (2010). "A split active site couples cap recognition by Dcp2 to activation." Nature Structural & Molecular Biology **17**(9): 1096-U1099.
- 40 Grudzien, E., M. Kalek, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz y R. E. Rhoads (2006). "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs." Journal of Biological Chemistry **281**(4): 1857-1867.
- 45 Grudzien-Nogalska, E., J. Jemielity, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz y R. E. Rhoads (2007). "Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells." Rna-a Publication of the Rna Society **13**(10): 1745-1755.
- Gu, M. G., C. Fabrega, S. W. Liu, H. D. Liu, M. Kiledjian y C. D. Lima (2004). "Insights into the structure, mechanism, and regulation of scavenger mRNA decapping activity." Molecular Cell **14**(1): 67-80.
- 50 Jemielity, J., T. Fowler, J. Zuberek, J. Stepinski, M. Lewdorowicz, A. Niedzwiecka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz y R. E. Rhoads (2003). "Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties." Rna-a Publication of the Rna Society **9**(9): 1108-1122.
- Kabsch, W. (2010). "XDS." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **66**: 125-132.
- 55 Kalek, M., J. Jemielity, Z. M. Darzynkiewicz, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis y E. Darzynkiewicz (2006). "Enzymatically stable 5' mRNA cap analogs: Synthesis and binding studies with human DcpS decapping enzyme." Bioorganic & Medicinal Chemistry **14**(9): 3223-3230.
- 60 Kalek, M., J. Jemielity, E. Grudzien, J. Zuberek, E. Bojarska, L. S. Cohen, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis, R. E. Rhoads y E. Darzynkiewicz (2005). "Synthesis and biochemical properties of novel mRNA 5' cap analogs resistant to enzymatic hydrolysis." Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids **24**(5-7): 615-621.
- Konarska, M. M., R. A. Padgett y P. A. Sharp (1984). "Recognition of Cap Structure in Splicing Invitro of Messenger-Rna Precursors." Cell **38**(3): 731-736.

Kowalska, J., M. Lewdorowicz, J. Zuberek, E. Grudzien-Nogalska, E. Bojarska, J. Stepinski, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, R. E. Davis y J. Jemielity (2008). "Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS." *RNA-a Publication of the RNA Society* **14**(6): 1119-1131.

Kowalska, J., A. Wypijewska del Nogal, Z. M. Darzynkiewicz, J. Buck, C. Nicola, A. N. Kuhn, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, M. Strenkowska, M. Ziemniak, M. Maciejczyk, E. Bojarska, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, U. Sahin y J. Jemielity (2014). "Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes." *Nucleic Acids Research* **42**(16): 10245-10264.

Kowalska, J., M. Ziemniak, M. Lukaszewicz, J. Zuber, M. Strenkowska, E. Darzynkiewicz y J. Jemielity (2008). "Phosphorothioate analogs of m7GTP: Strong inhibitors of translation with increased resistance towards enzymatic degradation." *Chemistry of Nucleic Acid Components* **10**: 487-490.

Kuhn, A. N., M. Diken, S. Kreiter, A. Selmi, J. Kowalska, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, C. Huber, O. Tureci y U. Sahin (2010). "Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo." *Gene Therapy* **17**(8): 961-971.

Lykke-Andersen, J. (2002). "Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay." *Molecular and Cellular Biology* **22**(23): 8114-8121.

Mccoy, A., R. Grosse-Kunstleve, P. Adams, M. Winn, L. Storoni y R. Read (2007). "Phaser crystallographic software." *Journal of Applied Crystallography* **40**: 658-674.

Mildvan, A., Z. Xia, H. Azurmendi, V. Saraswat, P. Legler, M. Massiah, S. Gabelli, M. Bianchet, L. Kang y L. Amzel (2005). "Structures and mechanisms of Nudix hydrolases." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **433**(1): 129-143.

Rydzik, A. M., M. Lukaszewicz, J. Zuberek, J. Kowalska, Z. M. Darzynkiewicz, E. Darzynkiewicz y J. Jemielity (2009). "Synthetic dinucleotide mRNA cap analogs with tetraphosphate 5' '5' bridge containing methylenebis(phosphonate) modification." *Organic & Biomolecular Chemistry* **7**(22): 4763-4776.

Sahin, U., K. Kariko y O. Tureci (2014). "mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs." *Nature Reviews Drug Discovery* **13**(10): 759-780.

Schuttelkopf, A. y D. van Aalten (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**: 1355-1363.

Shen, V., H. D. Liu, S. W. Liu, X. F. Jiao y M. Kiledjian (2008). "DcpS scavenger decapping enzyme can modulate pre-mRNA splicing." *RNA-a Publication of the RNA Society* **14**(6): 1132-1142.

Singh, J., M. Salcius, S. W. Liu, B. L. Staker, R. Mishra, J. Thurmond, G. Michaud, D. R. Mattoon, J. Printen, J. Christensen, J. M. Bjornsson, B. A. Pollok, M. Kiledjian, L. Stewart, J. Jarecki y M. E. Gurney (2008). "DcpS as a Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy." *Acs Chemical Biology* **3**(11): 711-722.

Van Meerbeke, J. P., R. M. Gibbs, H. L. Plasterer, W. Miao, Z. Feng, M.-Y. Lin, A. A. Rucki, C. D. Wee, B. Xia, S. Sharma, V. Jacques, D. K. Li, L. Pellizzoni, J. R. Rusche, C.-P. Ko y C. J. Sumner (2013). "The DcpS inhibitor RG3039 improves motor function in SMA mice." *Human Molecular Genetics* **22**(20): 4074-4083.

Warren, L., P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger y D. J. Rossi (2010). "Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA." *Cell Stem Cell* **7**(5): 618-630.

Ziemniak, M., M. Strenkowska, J. Kowalska y J. Jemielity (2013). "Potential therapeutic applications of RNA cap analogs." *Future medicinal chemistry* **5**(10): 1141-1172.

Zuberek, J., J. Jemielity, A. Niedzwiecka, J. Stepinski, A. Wyslouch-Cieszyńska, R. Stolarski y E. Darzynkiewicz (2003). "Influence of the length of the phosphate chain in mRNA 5' cap analogs on their interaction with eukaryotic initiation factor 4E." *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **22**(5-8): 1707-1710.

## Lista de secuencias

<110> Uniwersytet Warszawski

<120> 5'-tiofosfotanolowe analogi końca 5' mRNA (kapu), mRNA je zawieraj<sup>1</sup>ce, sposób ich otrzymywania i ich zastosowania

<130> PZ/3566/AGR/PCT

<160> 7

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 57

10 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido 1

15 <400> 1

**atagcattta ggtgacacta tagaagaagc gggcatgcgg ccagccatag ccgatca** 57

<210> 2

<211> 57

<212> ADN

<213> artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido 2

<400> 2

**tgatcggcta tggctggccg catgcccgct tcttctatag tgtcacctaa atcgat** 57

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> artificial

30 <220>

<223> Seq promotora de la polimerasa SP6

<400> 3

**atttaggtga cactataga** 19

40 <210> 4

<211> 35

<212> ARN

<213> artificial

45 <220>

<223> Transcrito de ARN corto

<400> 4

**gaagaagcgg gcaugcggcc agccauagcc gauca** 35

50 <210> 5

<211> 35

<212> ADN

<213> artificial

55 <220>

<223> DNazima 10-23

60 <400> 5

**tgatcggcta ggctagctac aacgaggctg gccgc** 35

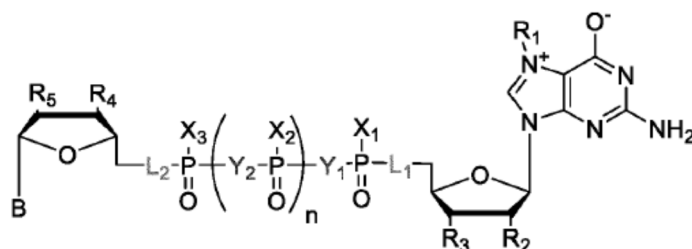
<210> 6

<211> 40

<212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido 3  
  
 <400> 6  
 atttaggtga cactatagaa cagatctcga gctcaagctt 40  
  
 10 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido 4  
  
 <400> 7  
 gtttaaacad tttaatgcaa tga 23  
 20

# REIVINDICACIONES

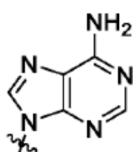
1. Un análogo de caperuza 5'fosforotiolato según la fórmula 1



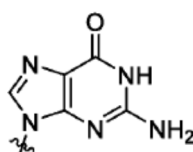
Fórmula 1

en donde

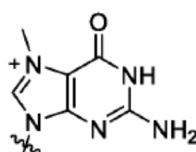
- L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> se seleccionan independientemente del grupo que comprende O y S, en donde al menos uno de L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> no es O;  
n = 0, 1 o 2;  
X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> se seleccionan independientemente del grupo que comprende O, S;  
R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que comprende CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>Ph, alquilo o alquilo sustituido;  
R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente del grupo que comprende H, OH, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -COOH, N<sub>3</sub>, alquilo, alquenilo, o alquinilo;  
R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente del grupo que comprende H, OH, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -COOH, CH<sub>2</sub>COOH, N<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, alquilo, alquenilo, o alquinilo;  
Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> se seleccionan independientemente del grupo que comprende CH<sub>2</sub>, CHCl, CCl<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>, CHF, NH, O;  
y B es un grupo según la fórmula 3, 4, 5, 6, o 7



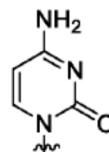
fórmula 3



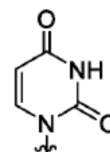
fórmula 4



fórmula 5



fórmula 6



fórmula 7.

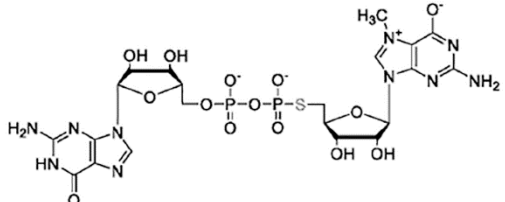
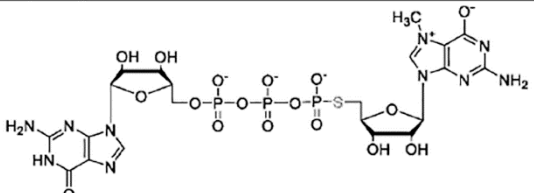
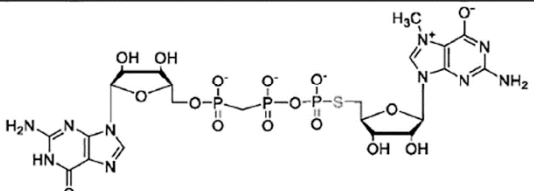
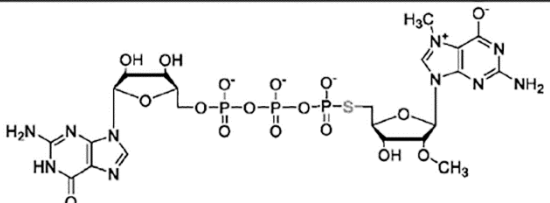
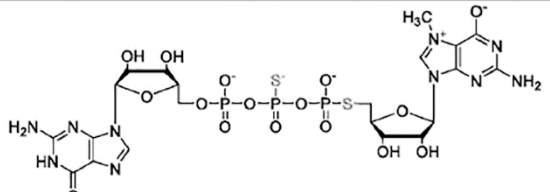
2. El compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:



No.	Compuesto	Fórmula estructural	Nombre químico
21	$m^7GppSG$		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P2-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) difosfato
22	$m^7GpppSG$		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato
23	$m^7GSppG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P2-guanosin-5'-il difosfato
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2,3-metilenotrifosfato
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-metil-7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
30	$m^7GSppspGD1$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il tiotrifosfato D1

31	$m^7GSp_{pp}pG_{D2}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-tiotrifosfato D2
32	$m^7GSp_{pp}pSG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato
33	$m^7GSp_{pp}pSG_{D1}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D1
34	$m^7GSp_{pp}pSG_{D2}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D2
35	$m^7Gp_{pp}pSG_{D1}$		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D1
36	$m^7Gp_{pp}pSG_{D2}$		P1-(7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D2
37	$m^7GpCH_2ppSG_G$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 1,2-metilenotrifosfato
38	$m^{7,2'O}Gp_{pp}pSG$		P1-(2'-O-metil-7-metil-guanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato

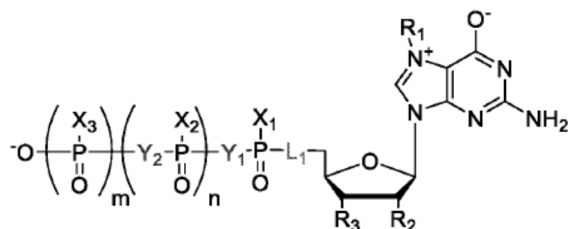
3. El compuesto según las reivindicaciones 1-2, seleccionado de un grupo que consiste en:

No.	Compuesto	Fórmula estructural	Nombre químico
23	$m^7GSppG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P2-guanosin-5'-il difosfato
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
25	$m^7GSppCH_{2pG}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2,3-metilenotrifosfato
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-metil-7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il trifosfato
30	$m^7GSpppG_{D1}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-trifosfato D1

31	$m^7GSp_{pp_s}pG_{D2}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 2-tiotrifosfato D2
32	$m^7GSp_{ppp}S_G$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) trifosfato
33	$m^7GSp_{pp_s}pS_{G D1}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D1
34	$m^7GSp_{pp_s}pS_{G D2}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-(5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il) 2-tiotrifosfato D2
37	$m^7GpCH_2pp_{SG}$		P1-(7-metil-5'-desoxi-5'-tioguanosin-5'-il)-P3-guanosin-5'-il 1,2-metilenotiotrifosfato

## 4. Análogo 5'-fosforotiolato según la fórmula 2

5

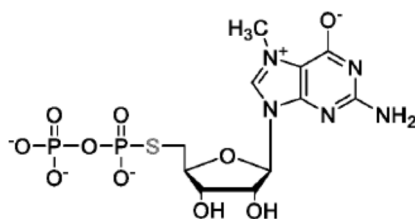


Fórmula 2

en donde

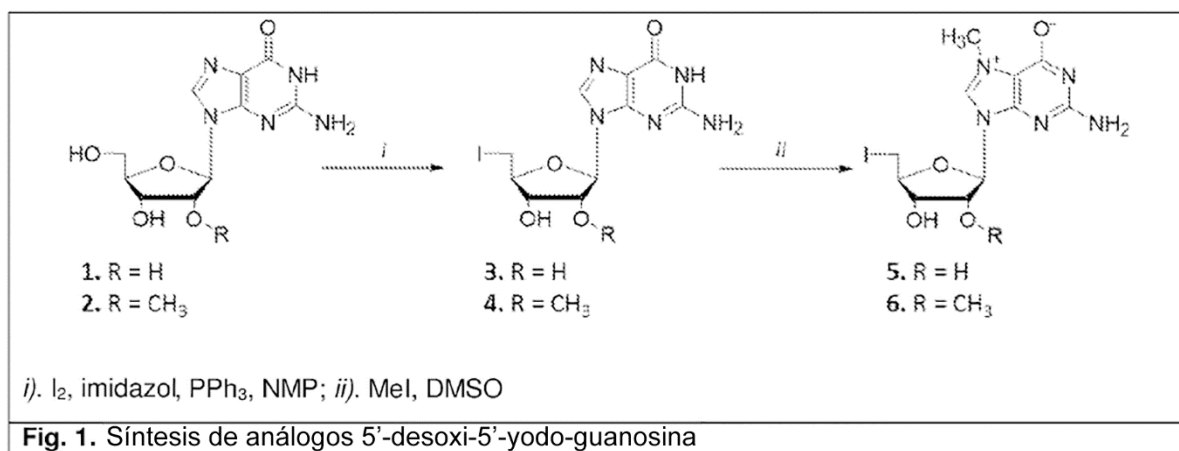
 $m = 0, 1$  $n = 0, 1, \text{ o } 2;$  $L^1$  es S $X_1, X_2, X_3$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende O, S; $R^1$  se selecciona del grupo que comprende  $CH_3, C_2H_5, CH_2Ph$ , alquilo o alquilo sustituido; $R^2$  y  $R^3$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende H, OH,  $OCH_3, OC_2H_5, -COOH, N_3$ , alquilo, o alquilo sustituido; $Y_1, Y_2$  se seleccionan independientemente del grupo que comprende  $CH_2, CHCl, CCl_2, CHF, CF_2, NH$  y O;

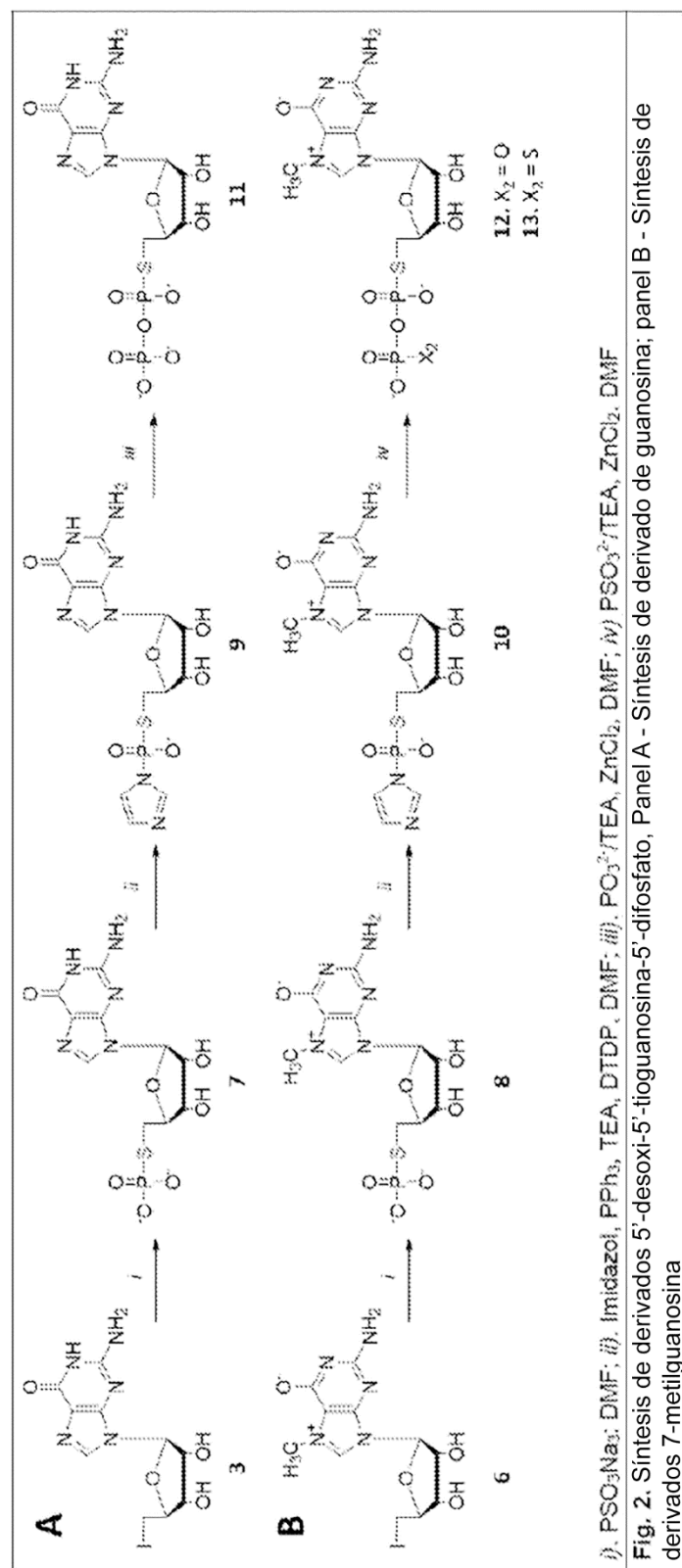
en donde preferiblemente el análogo 5'-fosforotiolato según la fórmula 2 es 5'-desoxi-5'-tioguanosina-7-metilguanosina 5'-difosforotiolato según la fórmula 13

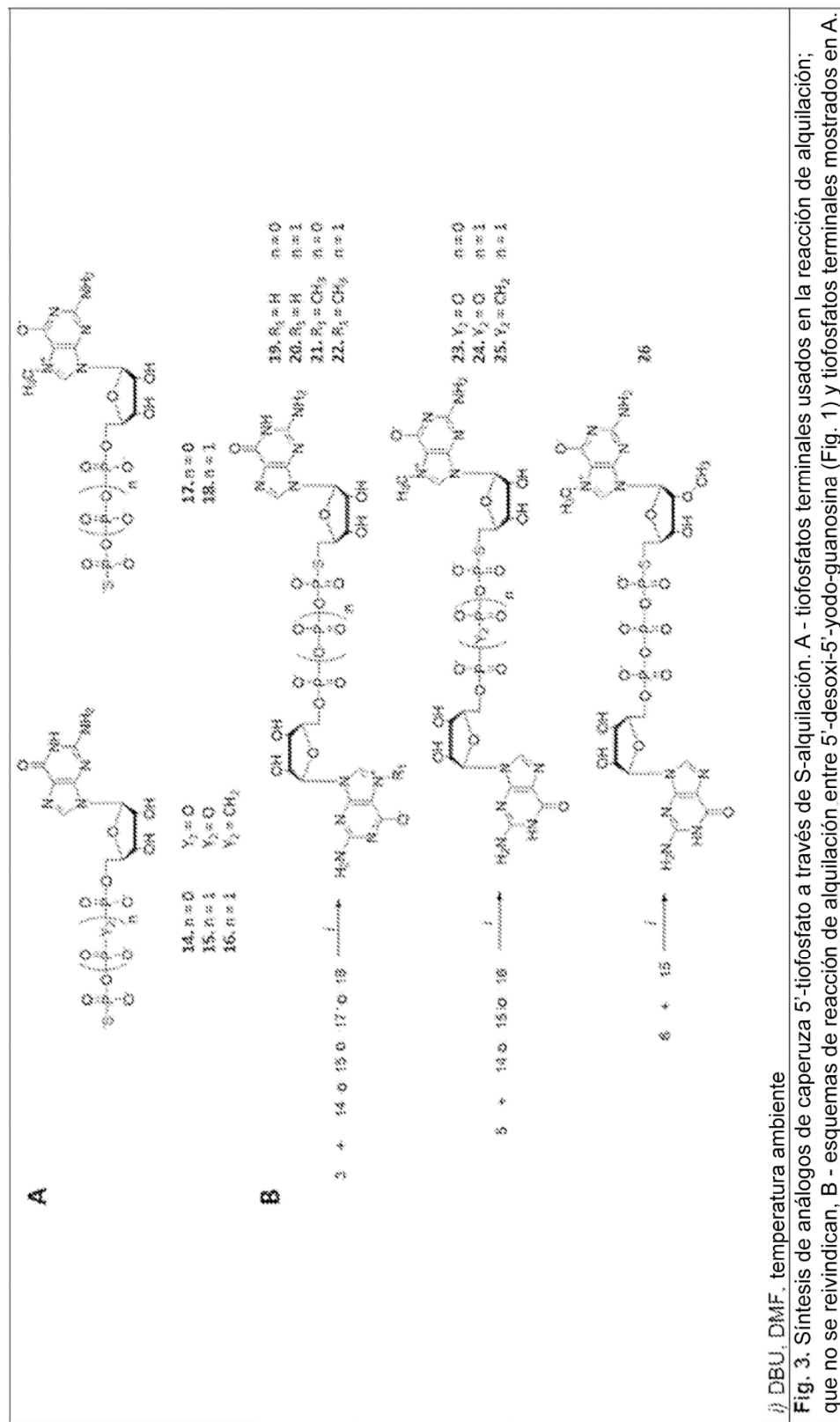


Fórmula 13.

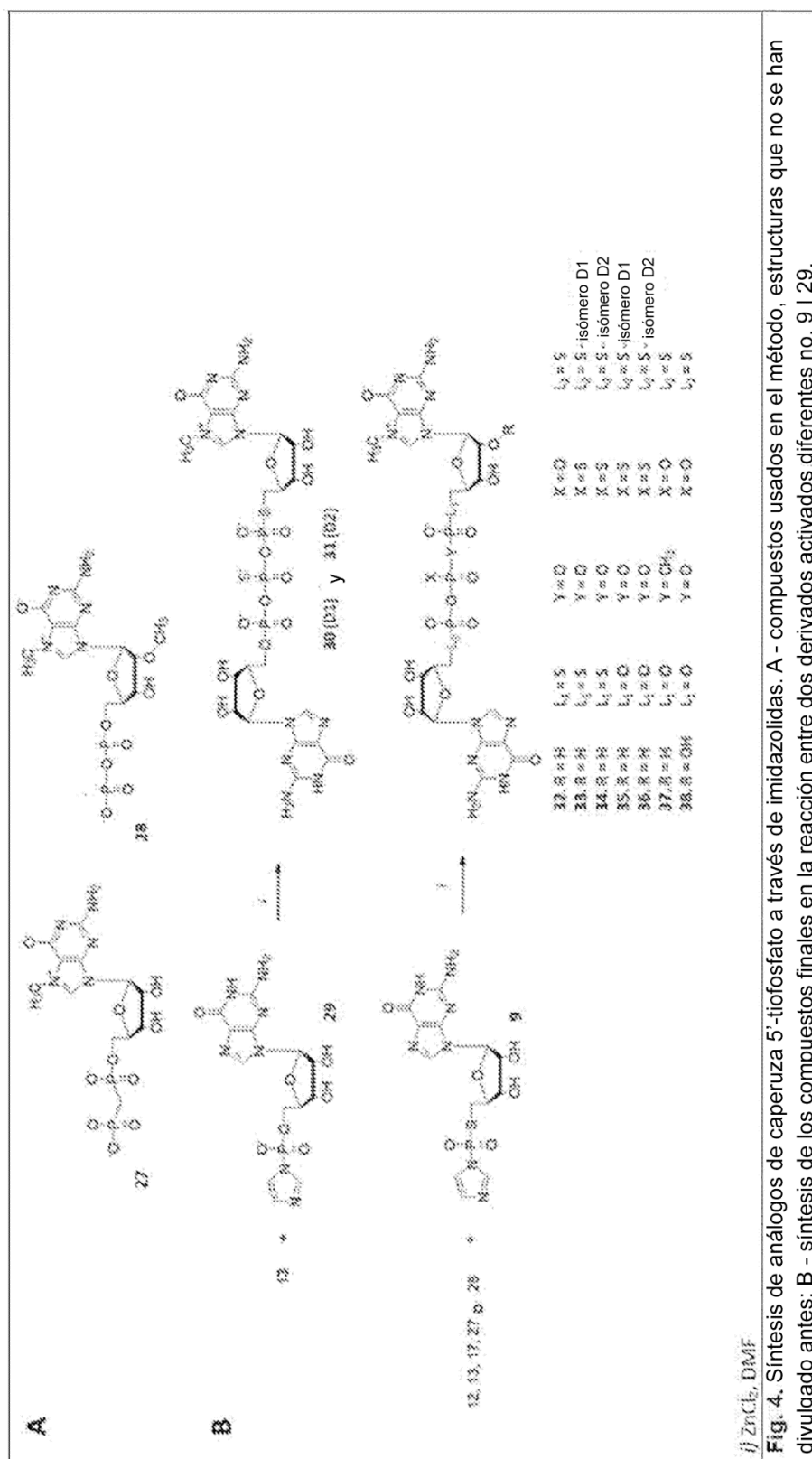
5. El compuesto según las reivindicaciones 1-4 para uso como un medicamento.
6. El compuesto según las reivindicaciones 1-4 para uso como un medicamento en el tratamiento de atrofia muscular espinal (AME) y/o en aliviar síntomas de AME.
7. El compuesto según las reivindicaciones 1-4 para uso como un regulador de la actividad DcpS, preferiblemente como un inhibidor de la actividad de la enzima DcpS, más preferiblemente hDcpS.
8. El compuesto según las reivindicaciones 1-4 para uso en la regulación de la degradación de ARNm y/o en la regulación del ajuste de ARNm.
9. Un ARNm que comprende en el extremo 5' el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato según la reivindicación 1-3;  
 en donde preferiblemente el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato se selecciona de un grupo que comprende m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>ppG (no. 24), m<sup>7,2'</sup>O<sup>-</sup>GSp<sub>3</sub>ppG (no. 26), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>ppSG (no. 32), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>pG D1 (no. 30), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>pG D2 (no. 31), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>pSG D1 (no. 33), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>pSG D2 (no. 34), más preferiblemente es m<sup>7,2'</sup>O<sup>-</sup>GSp<sub>3</sub>ppG (no. 26).
10. Un método de preparación de ARNm que comprende en el extremo 5' de la molécula de ARNm un análogo de caperuza 5'-fosforotiolato, **caracterizado en que** el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato según la reivindicación 1-3 se incorpora durante la síntesis de la molécula de ARNm;  
 en donde preferiblemente el análogo de caperuza 5'-fosforotiolato se selecciona de un grupo que comprende m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>ppG (no. 24), m<sup>7,2'</sup>O<sup>-</sup>GSp<sub>3</sub>ppG (no. 26), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>ppSG (no. 32), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>pG D1 (no. 30), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>pG D2 (no. 31), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>pSG D1 (no. 33), m<sup>7</sup>GSp<sub>3</sub>pSG D2 (no. 34), más preferiblemente es m<sup>7,2'</sup>O<sup>-</sup>GSp<sub>3</sub>ppG (no. 26);  
 en donde preferiblemente la síntesis de ARNm transcurre mediante de transcripción *in vitro*.
11. El ARNm según la reivindicación 9 para uso en la producción de proteínas;  
 en donde preferiblemente la producción de proteínas se lleva a cabo en un sistema celular o no celular.
12. ARNm según la reivindicación 9 para uso como un medicamento.
13. ARNm según la reivindicación 9 para uso como un medicamento para el tratamiento de atrofia muscular espinal (AME) y/o para el alivio de síntomas de AME y/o para uso como un medicamento anticáncer, preferiblemente como un medicamento en inmunoterapia anticáncer.
14. Una formulación farmacéutica que comprende el
  - a) compuesto según las reivindicaciones 1-4, o
  - b) ARNm según la reivindicación 9; y
 un soporte farmacéuticamente aceptable

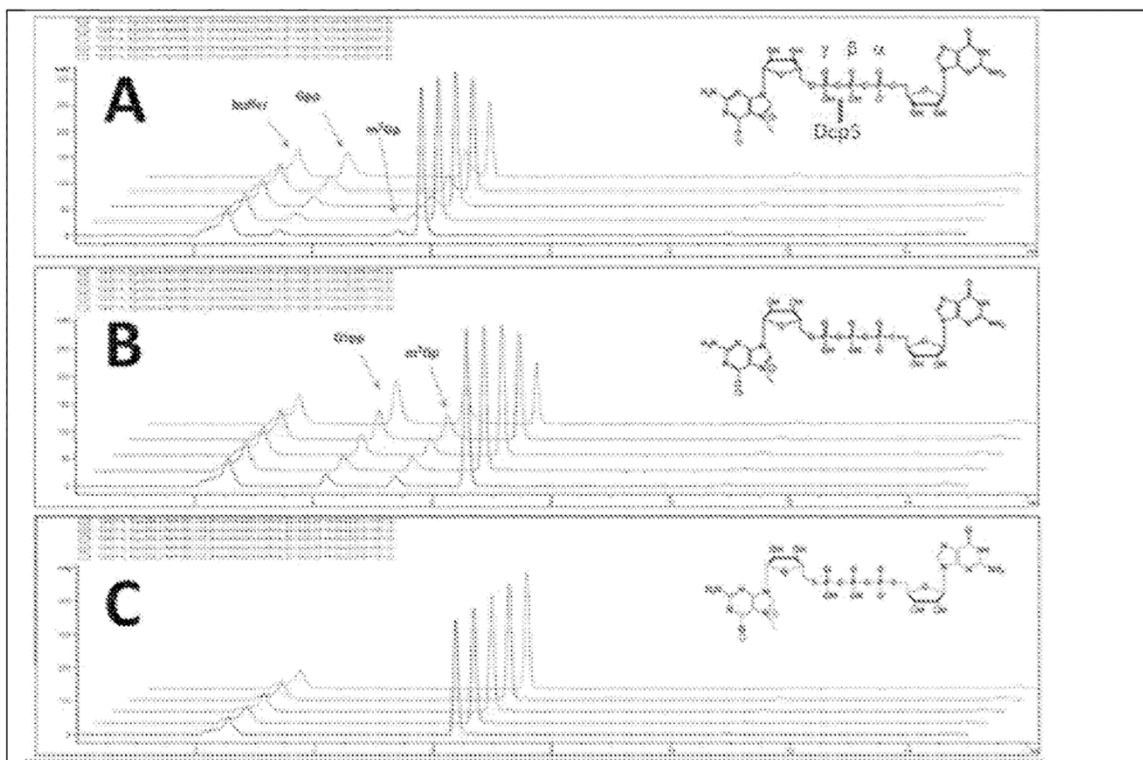




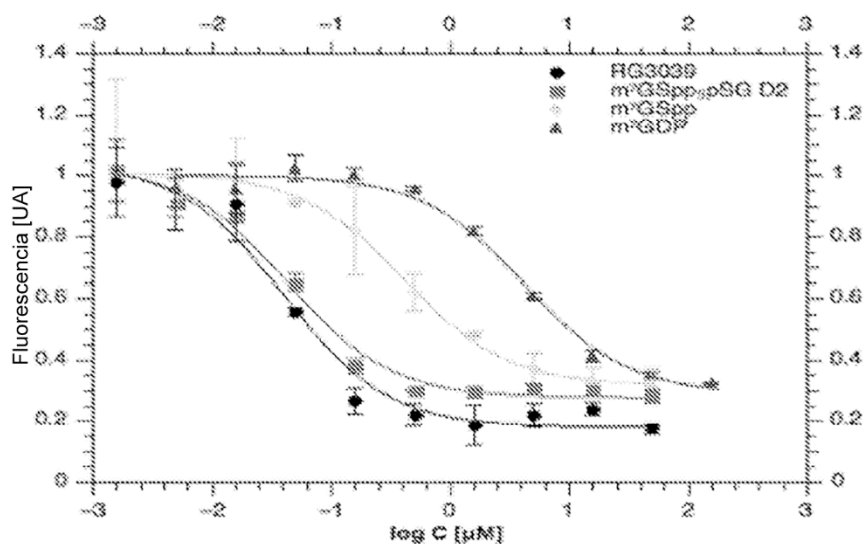








**Fig. 5.** Estudios de susceptibilidad de un sustrato dinucleotídico (m7GppG) y análogos de caperuza 5'-S modificados a hidrólisis mediada por la enzima DcpS. Se indica la terminología fosfato en la estructura del sustrato de la enzima DcpS natural.



**Fig. 6.** El resultado de la determinación de  $IC_{50}$  para compuestos: m7GSpppSG D2, m7GSpp, m7GDP y RG3039.

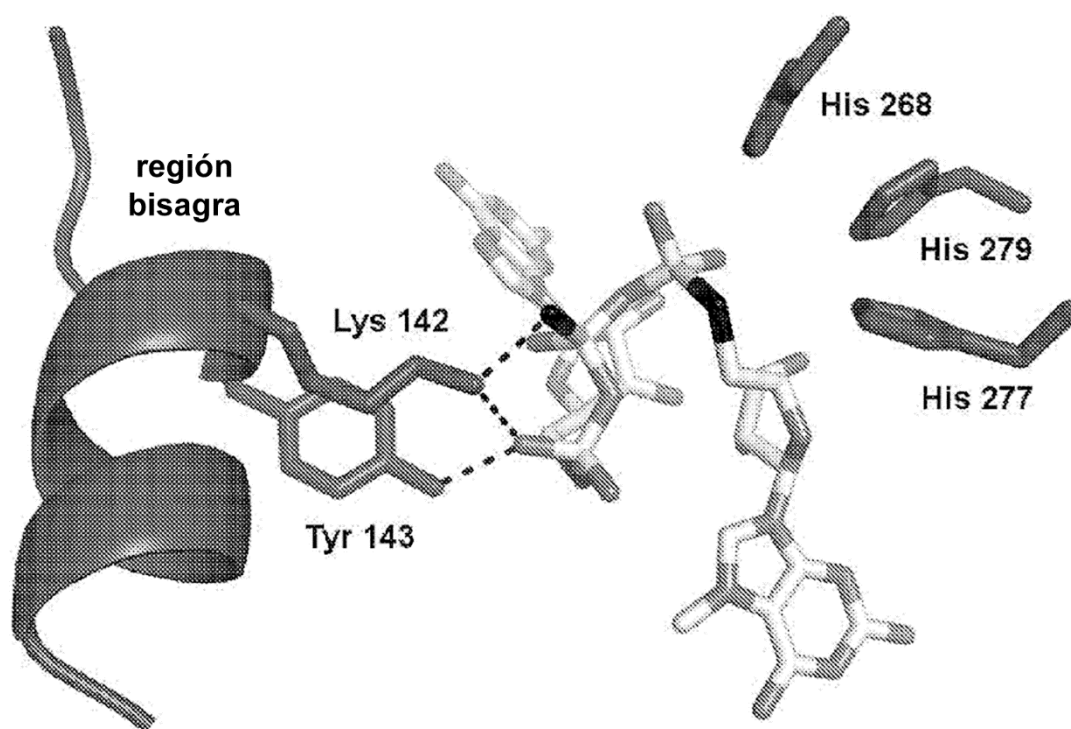


Fig.7.

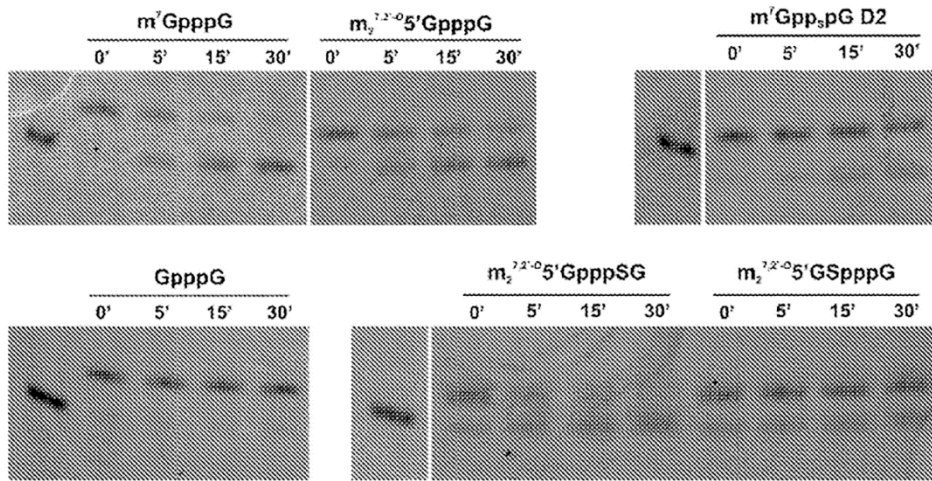


Fig. 8. Susceptibilidad a la actividad enzimática Dcp1/2.

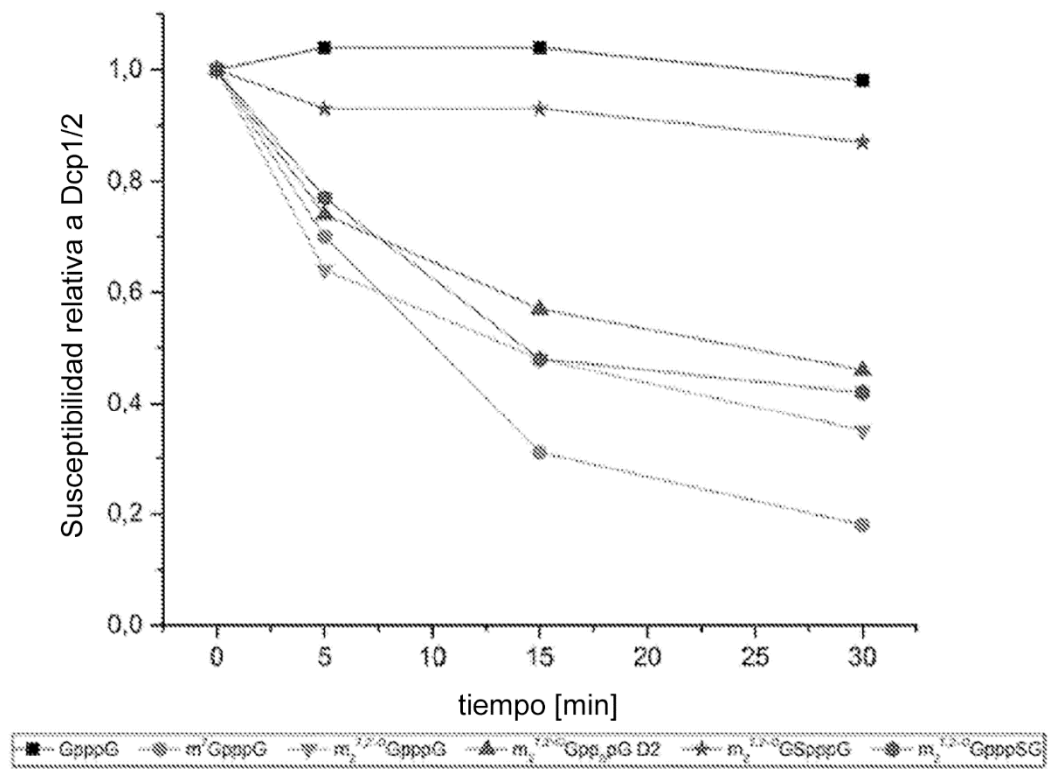


Fig. 9. Susceptibilidad relativa a la actividad enzimática Dcp1/2.

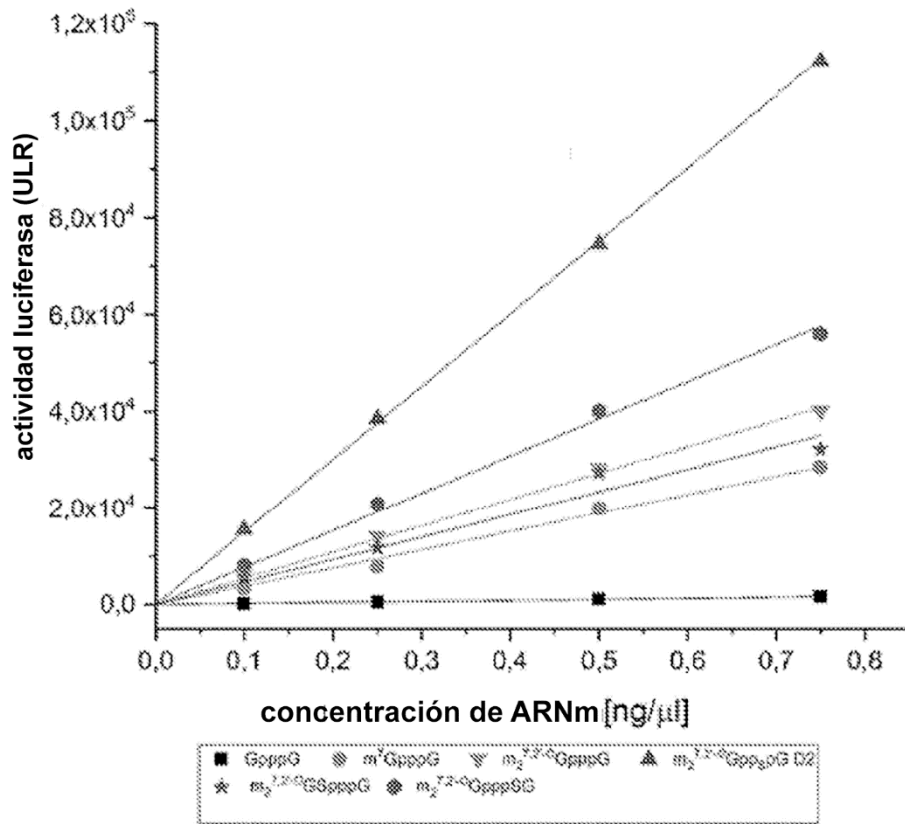


Fig. 10. Eficacia de traducción relativa.

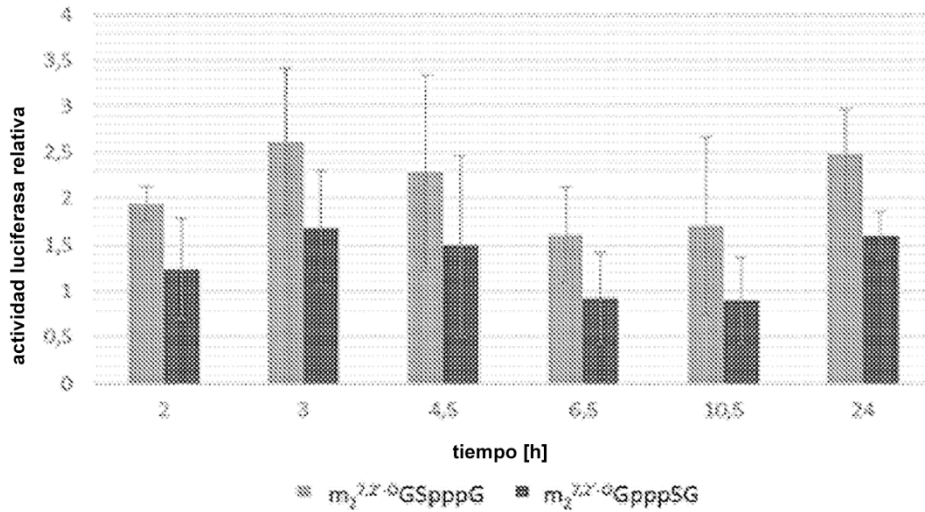


Fig. 11. Eficacia de traducción relativa en células HeLa.