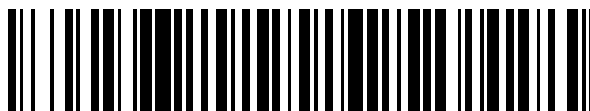


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 244**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2010 E 10716268 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2393504**

54 Título: **Composición farmacéutica con contenido en una L-ribozima para el tratamiento de efectos secundarios mediante la administración de espiegelmeros**

30 Prioridad:

**06.02.2009 DE 102009007929**  
**12.08.2009 DE 102009036965**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.10.2013**

73 Titular/es:

**FREIE UNIVERSITÄT BERLIN (100.0%)**  
**Thielallee 63**  
**14195 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**ERDMANN, VOLKER y**  
**WYSZKO, ELIZA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 427 244 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

Composición farmacéutica con contenido en una L-ribozima para el tratamiento de efectos secundarios mediante la administración de espejelmeros

5 Campo técnico de la invención

La invención se refiere al uso de una L-ribozima para la preparación de una composición farmacéutica, una composición farmacéutica que contiene una L-ribozima de este tipo, así como a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica de este tipo.

Antecedentes de la invención y estado conocido de la técnica

15 Los aptámeros son, la mayoría de las veces, ácidos D-nucleicos de doble cadena que se unen específicamente a una molécula diana arbitraria, análogamente a una reacción anticuerpo/antígeno (Ellington, A.D. et al., Nature 346: 818-822 (1990)). Para una molécula diana predeterminada, aptámeros específicos son aislados, por ejemplo, mediante el método SELEX a partir de genotecas de ácidos nucleicos (Tuerk, C. et al., Science 249: 505-510 (1990)).

20 Los aptámeros tienen en el sector terapéutico la finalidad, entre otras, de ligar productos del metabolismo indeseados y, con ello, inhibirlos. Únicamente a modo de ejemplo se pueden mencionar para ello productos génicos oncogénicos. En la aplicación terapéutica de aptámeros es desventajoso que éstos presentan una farmacocinética desventajosa, es decir, son degradados muy rápidamente, por ejemplo por parte de nucleasas endógenas. Independientemente de ello, los aptámeros son, así y todo, moléculas relativamente pequeñas, las cuales, por lo tanto, son secretadas a través de los riñones de una forma relativamente rápida.

30 Los espejelmeros son en el fondo aptámeros, pero se diferencian de ellos debido a que están formados a base de L-nucleótidos. Los espejelmeros pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. Mediante el empleo de los L-nucleótidos se impide una degradación por parte de nucleasas endógenas y, así, se mejora considerablemente la farmacocinética, es decir, se prolonga el tiempo de permanencia en el suero. Así en la referencia bibliográfica Boisgard, R et al., Eur Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 32: 470-477 (2005) se describe que espejelmeros no funcionales son totalmente estables metabólicamente, también a lo largo de un espacio de tiempo de 2 horas. En esta referencia bibliográfica se describe también el empleo diagnóstico de espejelmeros, estando acoplado el espejelmero con una sustancia informadora por ejemplo radiactiva.

35 La identificación de espejelmeros específicos para una molécula diana predeterminada puede tener lugar, por ejemplo, tal como se describe en la referencia bibliográfica Klussmann, S. et al., Nat Biotechnol 14:1112-1115 (1996). A los espejelmeros y a sus posibilidades de aplicación terapéuticas se remite también la referencia bibliográfica Vater, A. et al., Curr Opin Drug Discov Devel 6: 253-261 (2003).

40 En la aplicación terapéutica de espejelmeros se ha partido hasta ahora del hecho de que los espejelmeros no son inmunógenos (Wlotzka et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 8898-8902 (2002)). No obstante, investigaciones que son presentadas en la presente descripción demuestran que los ácidos L-nucleicos no están necesariamente exentos del todo de efectos secundarios en un organismo. De aquí se deduce que en el caso del empleo de espejelmeros existe un riesgo en absoluto nada despreciable de una reacción secundaria fisiológica indeseada, por ejemplo de una reacción inmune y/o de una reacción enzimática indeseada con ARN endógeno (incluido un ARN regulador) en el caso de la administración a un paciente. En particular, a la vista de las experiencias negativas experimentadas en la fase clínica 1 con el anticuerpo monoclonal TGN1412, y ante los antecedentes de que el tiempo de permanencia de espejelmeros, en virtud de las consideraciones precedentemente mencionadas, es relativamente muy elevado, sería deseable mantener disponible un antídoto para un espejelmero a emplear en el caso de la administración del espejelmero, con el fin de que en el caso de una reacción secundaria fisiológica indeseada pueda administrarse inmediatamente el antídoto y reducirse así a corto plazo el nivel de espejelmeros en el suero.

55 A partir de otros contextos, a saber la reacción de Diels-Alder estereoselectiva, catalizada por ribozimas, son conocidas L-ribozimas para lo cual se remite a las referencia bibliográficas Seeling, B. et al., Angew. Chem. Int., 39: 4576-4579 (2000) y Seelig, B. et al., Angew. Chem. 112: 4764-4768 (2000).

## Problema técnico de la invención

La invención se basa, por lo tanto, en el problema técnico de indicar un antídoto para espejelmeros empleados terapéuticamente.

5

## Rasgos fundamentales de la invención

Para la solución de este problema técnico, la invención enseña el uso de una L-ribozima para la preparación de una composición farmacéutica, estando capacitada la L-ribozima para la disociación de un L-ARN en la zona de una secuencia diana del L-ARN, a saber, en particular, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de reacciones secundarias fisiológicas indeseadas, en particular reacciones inmunes y/o reacciones enzimáticas indeseadas del L-ARN con ARN endógeno (incluido un ARN regulador) en virtud de la administración de una molécula terapéutica que contiene el L-ARN.

10

La invención se basa, primeramente en el reconocimiento sorprendente de que los espejelmeros, en contra de las sospechas actuales, no están necesariamente exentos de reacciones secundarias, sino que más bien pueden estar en condiciones de cortar ácidos nucleicos que se presentan de forma natural en un organismo y, de esta forma, crear efectos secundarios imprevisibles. La invención se basa en este reconocimiento basado en la enseñanza técnica de habilitar L-ribozimas que cortan específicamente un espejelmero administrado y, de esta forma, destruyen su actividad fisiológica, en particular en relación con reacciones secundarias indeseadas. Ejemplos de espejelmeros son: espejelmero, NOXC89, NOXA42, NOXA50, NOXB11, NOXA12, NOXE36, NOXF37 (todos de NOXXON AG), espejelmeros de la razón social Eli Lilly & Co., NU172 de la razón social ARCA biopharma Inc., ARCHEMIX, ARC1905, ARC1779, ARC183, ARC184, E10030, NU172, REG2, REG1 (todos de Archemix Corp.), AS1411, AS1405 (ambos de Antisoma Research Ltd.), ARNdsi (ARN interferente de doble cadena – siglas en alemán) de Dicerna Pharmaceuticals Inc., aptámero de ARN BEXCORE de BexCore Inc., ELAN de la razón social Elan Corp Plc., o Macugen. Mediante la administración de una ribozima de este tipo en persecución de la observación de una reacción secundaria indeseada en el caso de la administración de un espejelmero puede eliminarse por lo tanto de forma rápida, eficaz y altamente selectiva del metabolismo la causa de la reacción secundaria indeseada, a saber, de nuevo con un riesgo extremadamente bajo de efectos secundarios de la administración de la L-ribozima. Esto último no sólo se basa en la estructura de la L-ribozima a base de L-nucleótidos, sino adicionalmente en la elevada selectividad de la L-ribozima, a saber, dirigida a la secuencia diana del espejelmero. Como resultado, se obtiene un antídoto altamente eficaz y altamente selectivo contra un espejelmero empleado terapéuticamente y se pueden contrarrestar de manera eficaz, rápida y exenta de efectos secundarios reacciones secundarias indeseadas del espejelmero.

20

25

30

35

Básicamente, se puede construir una ribozima específica contra cualquier molécula de ARN, ya esté constituida por D- o L-nucleótidos, la cual corte una secuencia diana de la molécula de ARN y disocie así a ésta. Una propiedad esencial de una ribozima es, por lo tanto, la unión específica para la secuencia de la ribozima a la secuencia diana. Sin embargo, esto significa también que para cualquier secuencia diana arbitraria se puede crear una secuencia parcial de una ribozima, debido a que la secuencia parcial de la ribozima, que contiene el lugar de disociación, se hibrida con la secuencia diana. Por lo tanto, en el marco de la invención no es conveniente indicar estructuralmente sólo determinadas secuencias parciales de la ribozima en relación con determinadas secuencias diana. Las secuencias diana indicadas en los Ejemplos y las secuencias parciales de la ribozima son, por lo tanto, únicamente a modo de ejemplo, y el experto en la materia puede determinar, sin más, para cualquier secuencia diana predeterminada de un espejelmero la secuencia parcial de ribozima adecuada, a saber hibridante, y sintetizar la ribozima con medios usuales en la técnica a base de las informaciones con respecto a la secuencia parcial de la ribozima.

40

45

Básicamente, la molécula terapéutica puede ser un espejelmero, o el L-ARN puede estar unido covalentemente con un aptámero. Este último caso puede presentarse, por ejemplo, en el caso de un aptámero estabilizado frente a nucleasas. Entonces, la utilidad terapéutica de la invención estriba en que mediante el corte del L-ARN se vuelve accesible el aptámero para nucleasas, con lo que entonces, en última instancia, se puede eliminar del suero, en un plazo relativamente corto, también un aptámero que provoca eventuales efectos secundarios.

50

Sin embargo, también es posible que la L-ribozima esté unida covalentemente con un aptámero o un anticuerpo. En este caso, el aptámero o el anticuerpo puede elegirse, por ejemplo, de modo que en virtud de las interacciones del aptámero o bien del anticuerpo con las superficies de las células se introduzca en la célula la construcción completa a base de L-ribozima y aptámero o bien anticuerpo.

55

Preferiblemente, la L-ribozima es una ribozima cabeza de martillo. Ribozimas cabeza de martillo presentan una región conservada, entre otros con un triplete GUH (H no es guanina, preferiblemente C) o un duplete UH (H como antes). Con respecto a la primera, se remite a la Figura 1. Con respecto a la última se remite a la referencia bibliográfica Usman, N, et al., The Journal of Clinical Investigation, 106(10): 1197-1201 (2000). En este caso los nucleótidos N' y N son bases arbitrarias que se eligen en el intervalo de los Tallos I y III conforme a la secuencia diana. En el fondo, en la construcción de una L-ribozima contra una secuencia diana se procede de manera que primeramente se predetermina una secuencia diana, por ejemplo de un espiegelmero, debiendo contener esta secuencia diana el triplete GUH o el duplete UH. Después, en los dos extremos de un triplete GUH o bien del duplete UH se agregan típicamente en cada caso 4-10 ó 4-11, en particular 6-8 ó 6-9 nucleótidos, cuyas secuencias corresponden a las secuencias de la secuencia diana. Se obtiene, por lo tanto, una copia de la secuencia diana que contiene 11 a 23 nucleótidos que contiene el triplete GUH o bien el duplete UH. Entre los dos extremos de la copia se introduce luego la secuencia cabeza de martillo catalítica tal como se puede observar en la Figura 1. Un ejemplo de una secuencia cabeza de martillo catalítica adecuada es la siguiente:

5' -CUGANGAGN' CN' NNNNGNCGAAAC-3' o

5' -CUGANGAGN' CN' NNNNGNCGAAAN-3'

(N = bases arbitrarias, formando en la Figura 1 N y N' enfrentadas entre sí obligatoriamente pares de bases iguales o diferentes)

A ello se añaden en el extremo 3' nucleótidos en la secuencia complementaria a la secuencia diana en el lado 5' del triplete GUH o bien del duplete UH y en el extremo 5' se unen nucleótidos en la secuencia correspondiente a la secuencia diana del lado 3' del triplete GUH o bien del duplete UH.

En una forma de realización preferida, la secuencia cabeza de martillo catalítica es

5' -CUGANGAGNUCGGAAACGACGAAAC-3' o

5' -CUGANGAGNUCGGAAACGACGAAAN-3'

(N = bases arbitrarias, formando en la Figura 1 N y N' enfrentadas entre sí obligatoriamente pares de bases iguales o diferentes)

Adicionalmente, en el extremo 5' de la secuencia cabeza de martillo catalítica puede estar dispuesta la secuencia

3' - (N)<sub>4-6</sub>GGUAUAGAGUGCUGAAUCC-5'

con lo cual se obtiene una ribozima cabeza de martillo que requiere de una concentración de iones Mg relativamente baja.

La composición farmacéutica contiene la L-ribozima en al menos la dosis que corresponde a la dosis de la administración del L-ARN, preferiblemente la contiene en una dosis que corresponde a 2 hasta 10 veces, referida al número de moléculas o bien de moles, de la dosis de la administración del L-ARN. Se aconsejará una sobredosificación, en comparación con la dosis del L-ARN, con el fin de asegurarse de que sea descargado todo el L-ARN a eliminar. Las dosis absolutas previstas de acuerdo con la invención se orientarán en este caso estrictamente, en las relaciones cuantitativas relativas indicadas, a las dosis predeterminadas del L-ARN y, por lo tanto, pueden fácilmente determinarse y crearse por el experto en la materia conociendo las dosis predeterminadas para el L-ARN.

En una forma de realización preferida de la invención, la composición farmacéutica contiene, adicionalmente, un ácido nucleico, en particular un 5 a 20-mero, el cual está capacitado para la fusión de un L-ARN de doble cadena en la zona de su secuencia diana. En este caso, se trata de secuencias que se hibridan con secuencias parciales que son vecinas a la secuencia diana. Con ello, se consigue que se hagan accesibles para la L-ribozima regiones GUC del L-ARN, las cuales normalmente no son accesibles por motivos estéricos en virtud de la estructura terciaria del L-ARN.

Además de ello, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una L-ribozima para el tratamiento de reacciones secundarias fisiológicas indeseadas, en particular reacciones inmunológicas, en virtud de la administración de una molécula terapéutica que contiene el L-ARN.

5 En relación con la composición farmacéutica son válidas todas las explicaciones que anteceden y que figuran más adelante.

Finalmente, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica de este tipo, en el que se crea y sintetiza una secuencia a partir de L-nucleótidos que está capacitada para la disociación de una secuencia predeterminada a base de L-ribonucleótidos, en particular que contiene el triplete GUC con secuencias, por lo demás arbitrarias, añadidas en los lados 5' y 3' del triplete, y en el que la L-ribozima se constituye en una dosis farmacológicamente eficaz para la administración. En este caso, la L-ribozima se mezcla típicamente con coadyuvantes y/o sustancias de soporte galénicos.

15 Básicamente, uno o varios coadyuvantes y/o sustancias de soporte fisiológicamente compatibles pueden mezclarse con la L-ribozima, y la mezcla está adaptada galénicamente para la administración local o sistémica, en particular oral, parenteral, para infusión o bien para infundir en un órgano diana, para la inyección (p. ej., i.v., i.m., intracapsular o intralumbar), para la aplicación en bolsas periodontales (espacio entre la raíz del diente y la encía) y/o para la inhalación. La elección de los aditivos y/o coadyuvantes dependerá de la forma de administración elegida. La adaptación galénica de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede tener lugar en este caso de manera práctica habitual. En calidad de iones antagonistas para compuestos iónicos entran en consideración, por ejemplo,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $CaCl^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$  o ciclohexilamonio, o bien  $Cl^-$ ,  $Br^-$ , acetato, trifluoroacetato, propionato, lactato, oxalato, malonato, maleinato, citrato, benzoato, salicilato, putrecina, cadaverina, espermidina, espermina, etc. Formas de preparados galénicas sólidas o líquidas adecuadas son, por ejemplo, granulados, polvos, grageas, comprimidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, zumos, suspensiones, emulsiones, gotas o disoluciones para inyección (i.v., i.p., i.m., s.c.) o para la nebulización (aerosoles), formas de preparados para la inhalación de polvos secos, sistemas transdermales así como preparados con una liberación retardada del principio activo, en cuya preparación encuentran aplicación coadyuvantes habituales tales como sustancias de soporte, agentes disgregantes, aglutinantes, de revestimiento, de expansión, deslizantes o lubricantes, sustancias saboreantes, edulcorantes y solubilizantes. También es posible encapsular el principio activo en nanocápsulas, de preferencia biológicamente degradables, por ejemplo para la producción de un preparado para inhalación. Como coadyuvantes se pueden mencionar, por ejemplo, carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manita y otros azúcares, talco, lactosa, gelatina, almidón, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales tales como aceite de hígado de bacalao, aceite de girasol, de cacahuete, o sésamo, polietilenglicoles y disolventes tales como, por ejemplo, agua estéril y alcoholes monovalentes o polivalentes, por ejemplo glicerol. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede preparar, debido a que se mezcla al menos una combinación de sustancias, utilizada de acuerdo con la invención en una dosis definida, con un soporte farmacéuticamente adecuado y fisiológicamente compatible y, eventualmente, otros principios activos, aditivos o coadyuvantes con una dosis definida y se adapta para la forma de administración deseada. En calidad de diluyentes entran en consideración poliglicoles, agua y disoluciones tampón. Sustancias tampón adecuadas son, por ejemplo, N,N'-dibenciletildiamina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina, N-bencilfenetilamina, dietilamina, fosfato, bicarbonato de sodio o carbonato de sodio. Sin embargo, también se puede trabajar sin diluyentes. Sales fisiológicamente compatibles son sales con ácidos inorgánicos u orgánicos tales como, p. ej., ácido láctico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido p-toluenosulfónico, o con bases inorgánicas u orgánicas tales como, p. ej., NaOH, KOH,  $Mg(OH)_2$ , dietanolamina, etilendiamina, o con aminoácidos tales como arginina, lisina, ácido glutámico, etc., o con sales inorgánicas tales como  $CaCl_2$ , NaCl o sus iones libres tales como  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ , o bien correspondientes sales e iones libres del  $Mg^{++}$  o  $Mn^{++}$ , o combinaciones de los mismos. Se preparan según métodos convencionales. Preferiblemente, se ajusta un valor del pH en el intervalo entre 5 y 9, en particular entre 6 y 8.

De importancia por sí sola es una variante de la invención que comprende el uso de una L-ribozima para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que van acompañadas de una sobre-expresión de al menos un gen endógeno, estando la L-ribozima capacitada para la escisión de una secuencia diana de un D-ARN diana endógeno que codifica el gen. Por lo demás, son válidas análogamente las explicaciones precedentes. A este respecto, es importante otra variante del aspecto precedente de la invención con el uso de una L-ribozima para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que van acompañadas de una infección de un mamífero con un

microorganismo, estando la L-ribozima capacitada para la escisión de una secuencia diana de un D-ARN diana que codifica un gen del microorganismo. Como microorganismos que entran en consideración se deben mencionar, entre otros, virus, bacterias y hongos. Básicamente, la ribozima puede emplearse para la disociación de un microorganismo arbitrario con secuencias génicas conocidas, al menos en parte, eligiéndose tramos de las secuencias génicas debido a la escisión que atenúan o inhiben, por ejemplo, la actividad del microorganismo y/o su capacidad de replicación, y/o atenúan o inhiben la unión a superficies de las células.

En esta variante se aprovecha el hecho de que las L-ribozimas también pueden emplearse para la disociación de D-ARN, en particular ARNm o ARN regulador, por ejemplo, pero no de forma excluyente, ARNsi, ARNmicro, ARNsh, ARNnc, ARNt, ARNr, etc. Con ello, pueden inhibirse genes o proteínas codificadas por ellos. Esto es de utilidad terapéutica para todas las enfermedades que van acompañadas de la sobre-expresión de determinados genes, en comparación con la expresión del organismo no enfermo.

Por una parte, esta variante tiene la ventaja de que la escisión de la secuencia diana tiene lugar con una especificidad muy elevada y, por consiguiente, tampoco tiene lugar ninguna otra interferencia con el sistema regulador. Además de ello, se evitan con seguridad efectos secundarios tales como los que van acompañados, por ejemplo, del empleo de ácidos D-nucleicos inhibidores tales como ARNsi.

En lo que sigue se explica con mayor detalle la invención con ayuda de figuras y Ejemplos.

Muestran:

Figura 1: una ribozima cabeza de martillo mínima, antes (a) y después de la unión a una secuencia diana (b),

Figura 2: un análisis comparativo de la dependencia de la concentración de  $MgCl_2$  de la reacción de la L-diana con D-ribozima, por una parte, y de la D-diana con L-ribozima por otra,

Figura 3: un análisis comparativo de la dependencia en el tiempo de la reacción de L-diana con D-ribozima, por una parte, y de D-diana con L-ribozima por otra parte a  $MgCl_2$  10 mM,

Figura 4: un análisis comparativo de la dependencia de la concentración de  $MgCl_2$  (1-25 mM) de la reacción de L-diana con L-ribozima, por una parte, y de D-diana con D-ribozima por otra parte, con un exceso de 10 veces de L-ribozima,

Figura 5: un análisis comparativo de la dependencia de la concentración de  $MgCl_2$  (0,1-1 mM) de la reacción de L-diana con L-ribozima, por una parte, y de D-diana con D-ribozima por otra parte, con un exceso de 10 veces de L-ribozima,

Figura 6: un análisis comparativo de la dependencia en el tiempo de la reacción de L-diana con L-ribozima, por una parte, y de D-diana con D-ribozima por otra parte, a  $MgCl_2$  10 mM y con un exceso de 10 veces de L-ribozima,

Figura 7: un análisis comparativo de la dependencia en el tiempo de la reacción de L-diana con L-ribozima, por una parte, y de D-diana con D-ribozima por otra parte, a  $MgCl_2$  0,1 mM y con un exceso de 10 veces de L-ribozima,

Figura 8: un análisis comparativo de la dependencia en el tiempo de la reacción de L-diana con L-ribozima, por una parte, y de D-diana con D-ribozima por otra parte, a  $MgCl_2$  1 mM y con un exceso de 1 vez de L-ribozima,

Figura 9: un análisis comparativo de la dependencia en el tiempo de la reacción de L-diana con L-ribozima, por una parte, y de D-diana con D-ribozima por otra parte, a  $MgCl_2$  0,1 mM y con un defecto de 10 veces de L-ribozima,

Figura 10: un análisis comparativo de la dependencia en el tiempo de la reacción de L-diana con L-ribozima, por una parte, y de D-diana con D-ribozima por otra parte, a  $MgCl_2$  1 mM y con un defecto de 10 veces de L-ribozima,

Figura 11: un análisis comparativo de la dependencia en el tiempo de la reacción de L-diana con L-ribozima, por una parte, y de D-diana con D-ribozima por otra parte, a  $MgCl_2$  5 mM y con un defecto de 10 veces de L-ribozima,  
y

Figura 12: ensayos para la escisión de L-diana por parte de L-ribozima en suero humano.

Ejemplo 1: Ensayo de escisión

Las actividades de L-ribozimas y D-ribozimas se midieron bajo distintas condiciones. Las condiciones base eran como sigue. 0,02  $\mu M$  de ARN diana se incubaron durante 2 horas a 20°C con 10  $\mu l$  de mezcla de reacción en presencia de 0,002  $\mu M$ , 0,02  $\mu M$  y 2  $\mu M$  de ribozima en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (relación ribozimas/diana, por consiguiente, 10:1, 1:1 y 1:10). Antes de la reacción, ARN diana y ribozima se desnaturalizaron y se enfriaron hasta 25°C lentamente (1°C/min) en el bloque calefactor. Se examinó la influencia de los iones  $Mg^{2+}$  en la concentración de 0,1 a 25 mM. Productos de escisión se separaron en electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% en presencia de urea 8 M en tampón Tris-borato 0,09 M, pH 8,3. El análisis de la fluorescencia tuvo lugar en el aparato Phosphoimager Fuji Film FLA 5100. Los datos se obtuvieron con el programa Fuji Analysis Program. Los diagramas se crearon con Excel.

Ejemplo 2: Preparación de las secuencias diana y de las ribozimas

Como secuencias diana se prepararon en el transcurso de la síntesis de aplicación por parte de la razón social ChemGenes Corporation, Wilmington, EE.UU:

Seq.-ID 1: 5'-FAM-ACAGUCGGUCGCC-3'  
(ARN, tanto con D-nucleótidos como también con L-nucleótidos) y

Seq.-ID 2: 5'-FAM-ACAGTCGGTCGCC-3'  
(ADN, tanto con D-nucleótidos como también con L-nucleótidos).

Los productos de la síntesis tenían una pureza mayor que 90%.

Como secuencias de ribozimas se eligieron, conforme las secuencias diana, las regiones variables de una ribozima cabeza de martillo y el triplete GUC y se prepararon las siguientes secuencias de ribozima por la razón social ChemGenes Corporation, Wilmington, EE.UU:

Seq.-ID 3: 5'-FAM-GGCGACCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACUGU-3'  
(ARN, tanto con D-nucleótidos como también con L-nucleótidos)

Los productos de la síntesis tenían una pureza superior al 85%.

Todos los productos de la síntesis estaban marcados en el extremo 5' con fluoresceína.

Ejemplo 3: Interacciones de ácidos L-nucleicos con ácidos D-nucleicos

En la Figura 2 se representa la dependencia de la concentración en función de la escisión de una D-diana por parte de una L-ribozima, así como a la inversa. C es el testigo (L-diana + L-ribozima), las pistas 1 a 5 son las distintas concentraciones de  $MgCl_2$  indicadas en el diagrama (0-25 mM) para la diana sin ribozima y las pistas 6 a 9 son para 0,2  $\mu M$  de diana con 2  $\mu M$  de ribozima.

Se reconoce que la D-ribozima no corta ciertamente la L-diana, pero a la inversa tiene lugar absolutamente una conversión considerable. Esto significa que, por ejemplo, espejelmeros consistentes en L-nucleótidos, junto a su efecto como aptámero específico para una determinada estructura 3-D, podrían estar absolutamente en condiciones, en contra de la opinión actual, de ejercer otras interacciones fisiológicas, por ejemplo como ribozima.

De ello se deduce que espejelmeros presentan el riesgo de un efecto secundario indeseado en el caso de la administración a un organismo.

De ello, se deduce, sin embargo también, que L-ribozimas pueden emplearse para la escisión de D-ARN endógeno, con lo que entonces tiene lugar una inhibición terapéuticamente pretendida del gen o bien de la proteína codificado por el D-ARN, por ejemplo ARNm.

5 La Figura 3 muestra que la porción de productos de disociación de la D-diana aumenta con el tiempo mediante una L-ribozima y discurre siempre de manera significativa por encima de la proporción de productos de escisión de la L-diana (pista C: testigo, como precedentemente, pistas 1 a 10, tiempos 0 a 256 min del diagrama).

10 Ejemplo 4: Disociación de una L-diana por L-ribozimas

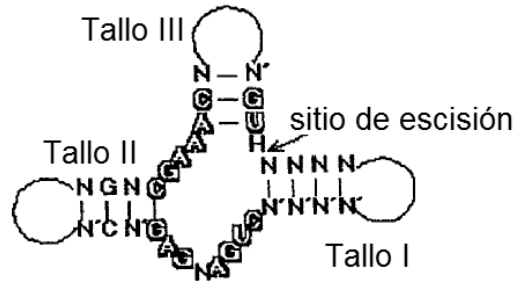
De las representaciones de las Figuras 4 a 11 se puede deducir que una L-ribozima corta de manera eficaz a una L-diana con una correspondiente secuencia diana bajo todas las condiciones habituales, a saber con tasas de conversión que corresponden al menos a las de una D-ribozima con una D-diana.

15 La Figura 12 confirma que la escisión de una L-diana por parte de una L-ribozima también funciona eficazmente bajo las condiciones del suero humano.

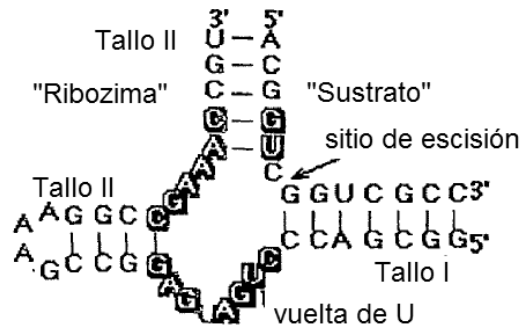


**REIVINDICACIONES**

- 1.- Uso de una L-ribozima para la preparación de una composición farmacéutica.
- 5 2.- Uso según la reivindicación 1, en donde la L-ribozima está capacitada para la escisión de un L-ARN en la región de una secuencia diana del L-ARN.
- 3.- Uso de una L-ribozima que está capacitada para la escisión de un L-ARN en la región de una secuencia diana del L-ARN, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de reacciones secundarias fisiológicas indeseadas, en virtud de la administración de una molécula terapéutica que contiene el L-ARN.
- 10 4.- Uso de una L-ribozima para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que van acompañadas de una sobre-expresión de al menos un gen endógeno, estando capacitada la L-ribozima para la escisión de una secuencia diana de un D-ARN diana endógeno que codifica el gen.
- 15 5.- Uso según la reivindicación 3, en donde la molécula terapéutica se compone del L-ARN, en particular es un L-ARN de doble cadena, por ejemplo un espejuelero.
- 6.- Uso según la reivindicación 3, en donde la molécula terapéutica contiene un aptámero unido covalentemente con el L-ARN o un anticuerpo unido covalentemente con el mismo.
- 20 7.- Uso según una de las reivindicaciones 3 y 5 a 6, en donde la composición farmacéutica contiene la L-ribozima en al menos la dosis que corresponde a la dosis de la administración del L-ARN, preferiblemente la contiene en una dosis que corresponde a 2 a 100 veces, preferiblemente a 2 a 20 veces la dosis de la administración del L-ARN.
- 25 8.- Uso según una de las reivindicaciones 3 a 7, en donde la L-ribozima es una ribozima cabeza de martillo.
- 9.- Uso según una de las reivindicaciones 3 a 8, en donde la composición farmacéutica contiene adicionalmente un ácido nucleico, en particular un 5 a 20-mero, que está capacitado para la fusión de un D-ARN o L-ARN de doble cadena en la región de la secuencia diana.
- 30 10.- Composición farmacéutica que contiene una L-ribozima para el tratamiento de reacciones secundarias fisiológicas indeseadas en virtud de la administración de una molécula terapéutica que contiene el L-ARN.
- 35 11.- Composición farmacéutica que contiene una L-ribozima para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que van acompañadas de una sobre-expresión de al menos un gen endógeno, en donde la L-ribozima está capacitada para la escisión de una secuencia diana de un D-ARN diana endógeno que codifica el gen.
- 40 12.- Procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica según la reivindicación 10 u 11, en el que se crea y sintetiza una secuencia a partir de L-nucleótidos, la cual está capacitada para la escisión de una secuencia predeterminada a base de L-ribonucleótidos, o de una secuencia predeterminada a base de L-ribonucleótidos, y en donde la L-ribozima se adapta en una dosis farmacológicamente eficaz para la administración.
- 45 13.- Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la L-ribozima se mezcla con coadyuvantes y/o sustancias de soporte galénicos.



**FIG. 1a**



**FIG. 1b**

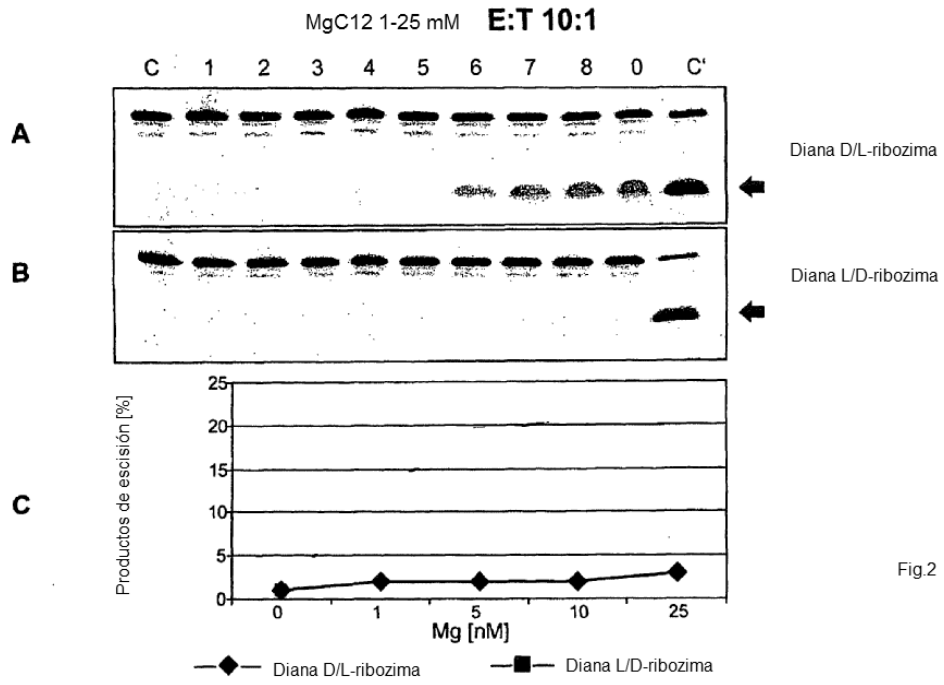


Fig.2

MgCl<sub>2</sub> 10 mM E:T 10:1

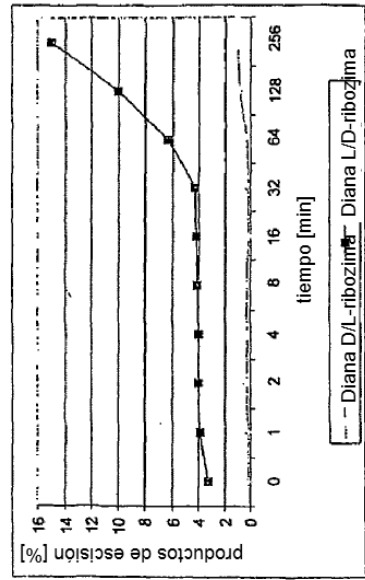
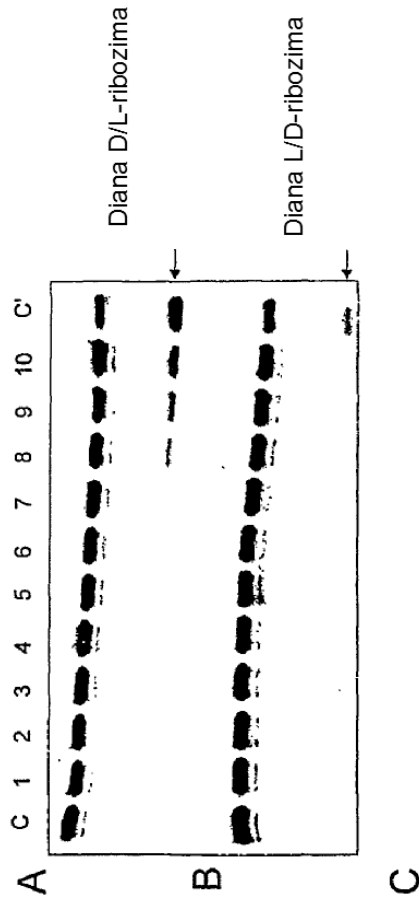
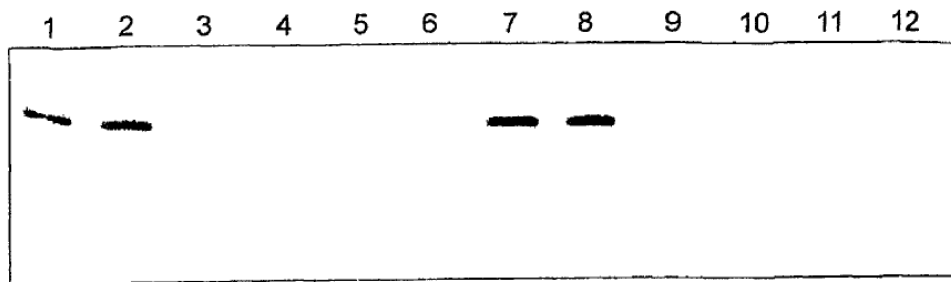


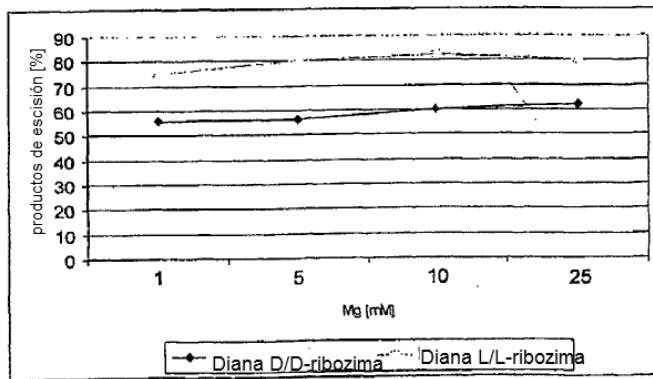
FIG. 3

MgCl<sub>2</sub> 1-25 mM E:T 10:1

A



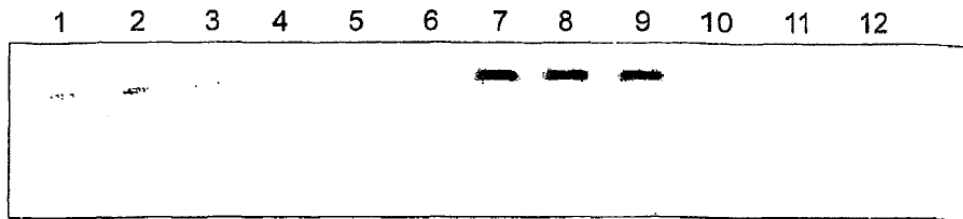
B



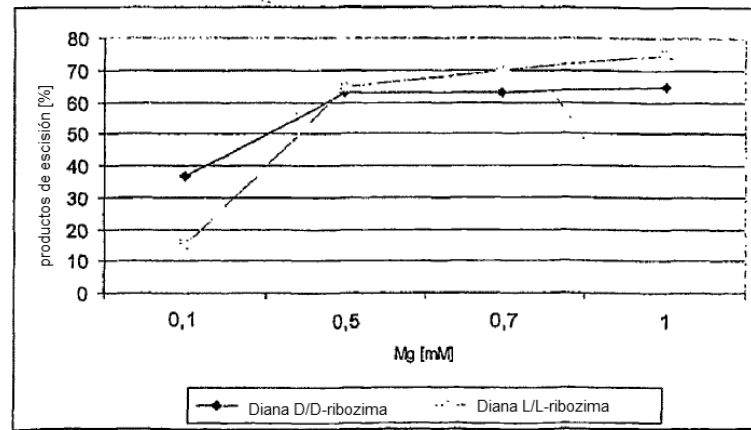
**FIG. 4**

MgCl<sub>2</sub> 0,1-1 mM E:T 10:1

A

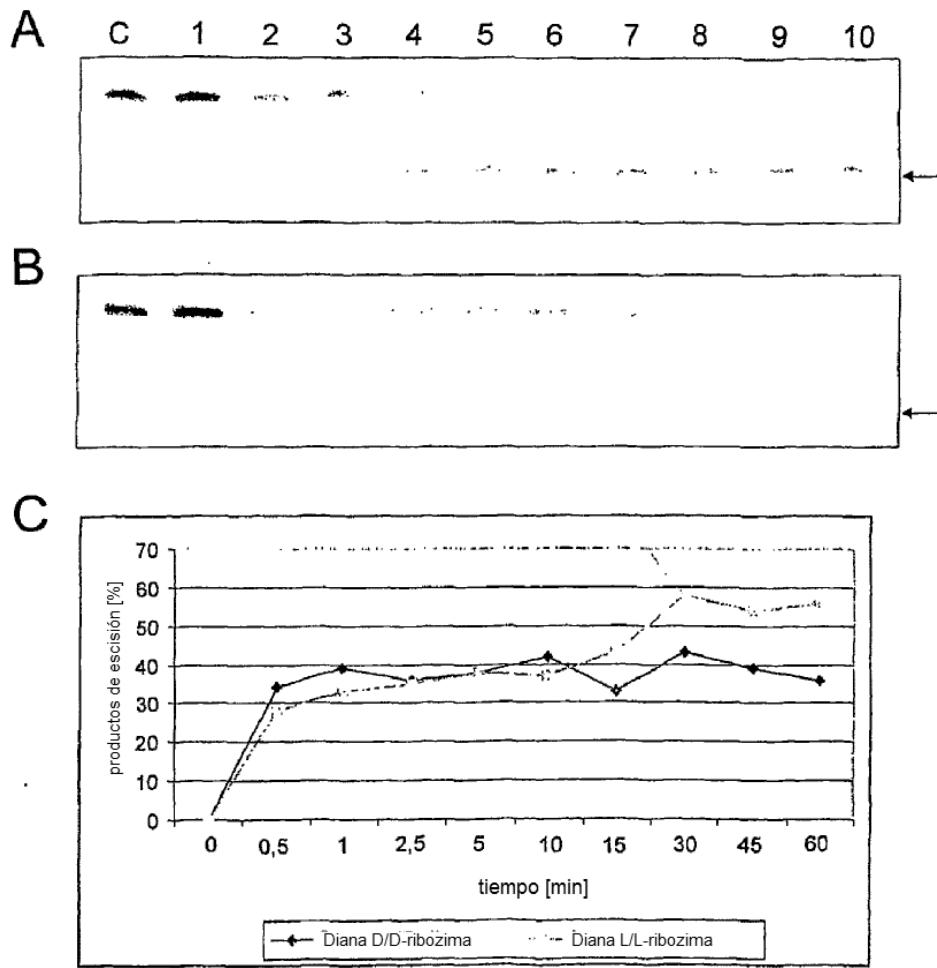


B

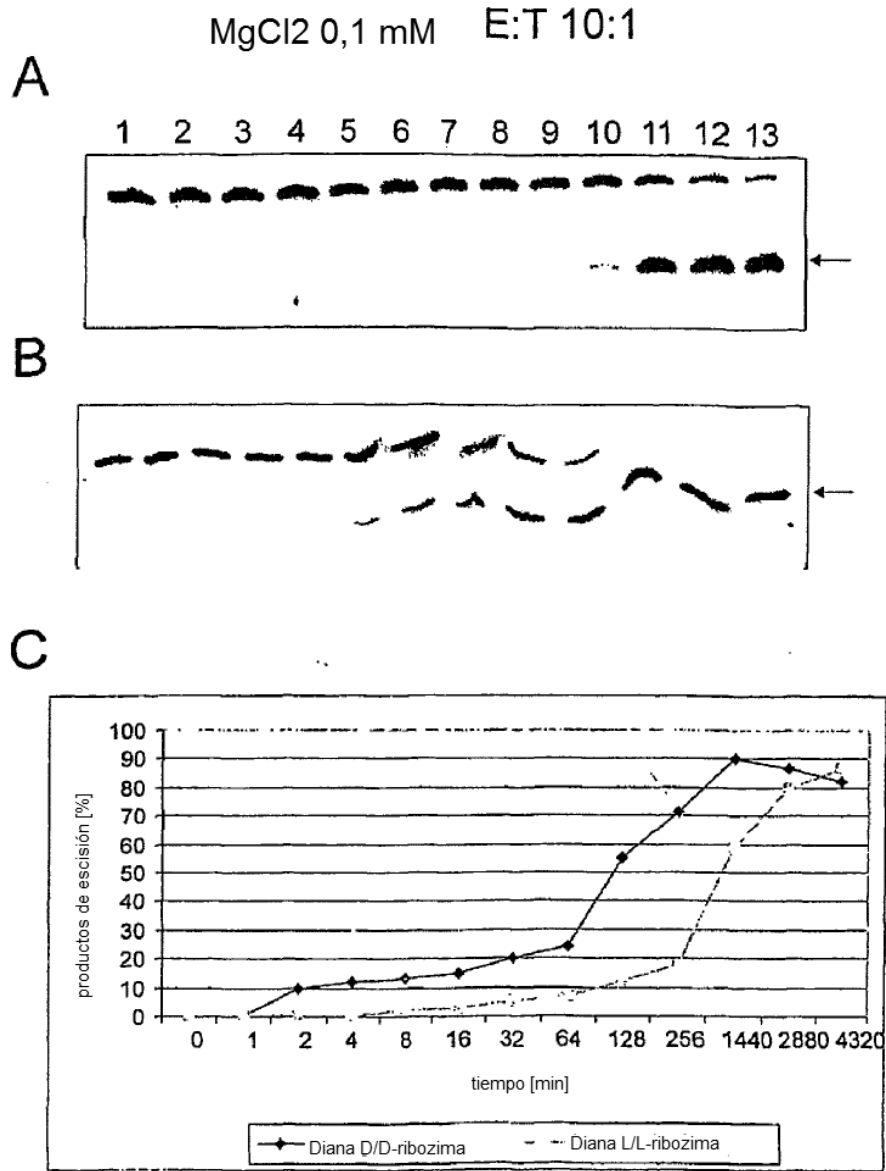


**FIG. 5**

MgCl<sub>2</sub> 10 mM E:T 10:1



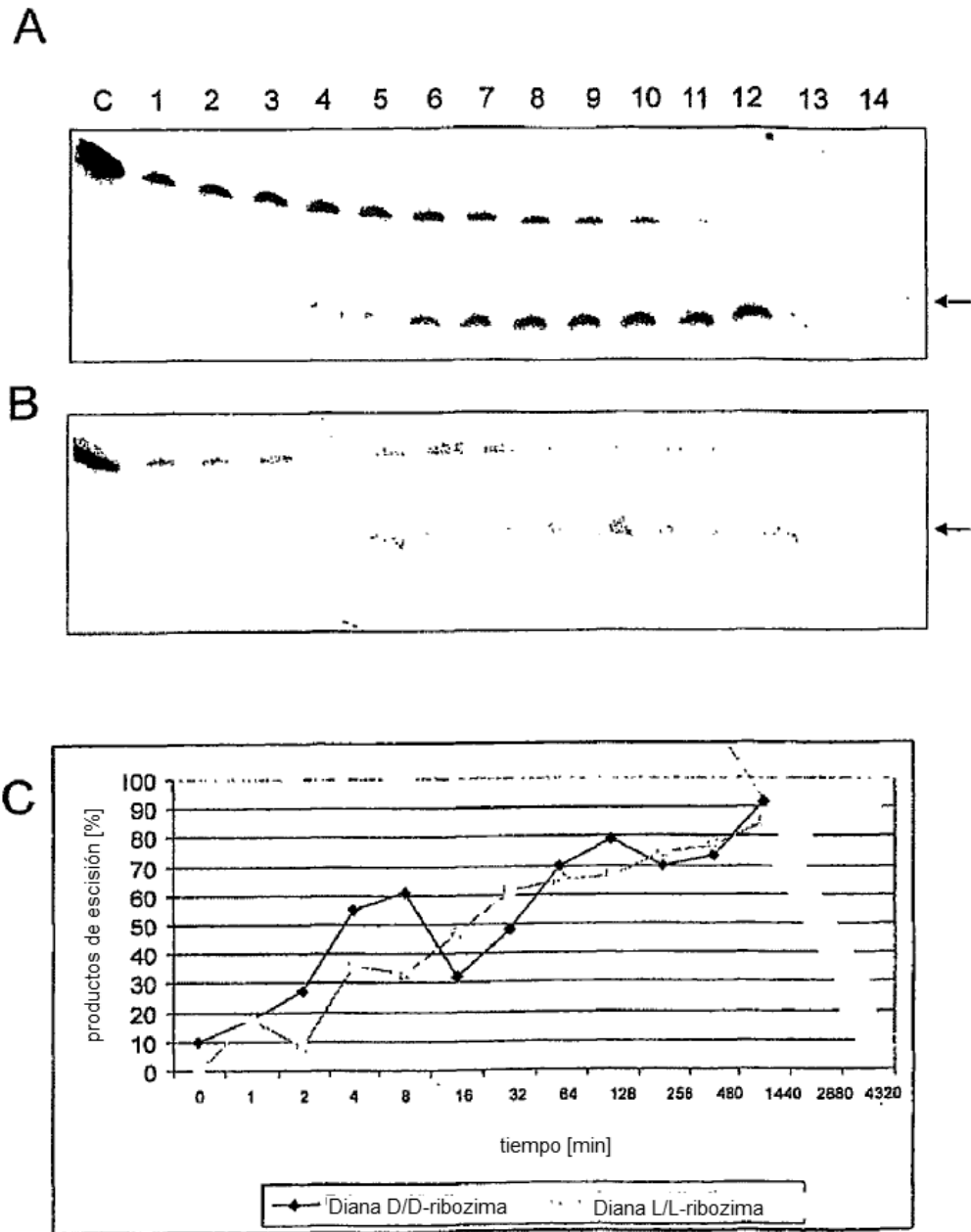
**FIG. 6**



**FIG. 7**

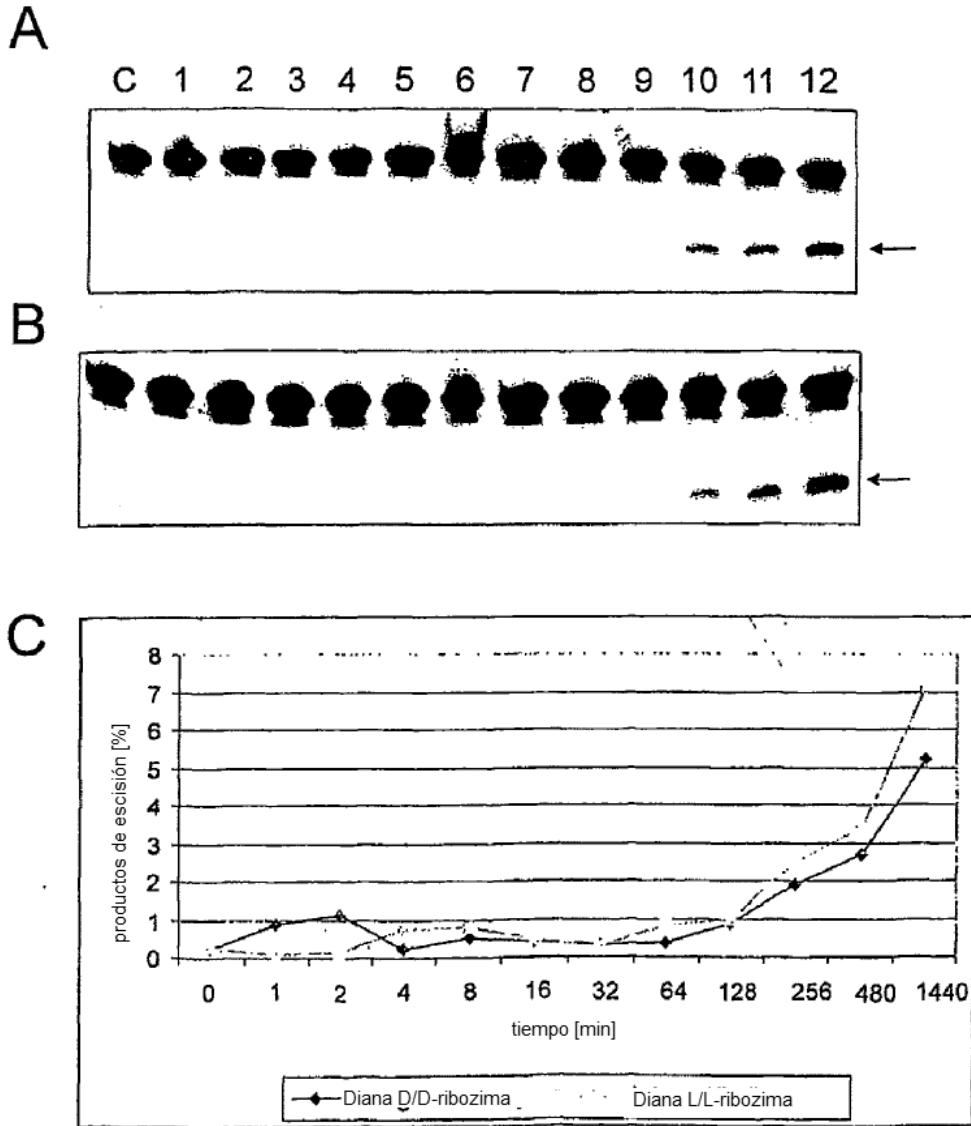


MgCl<sub>2</sub> 1 mM E:T 1:1

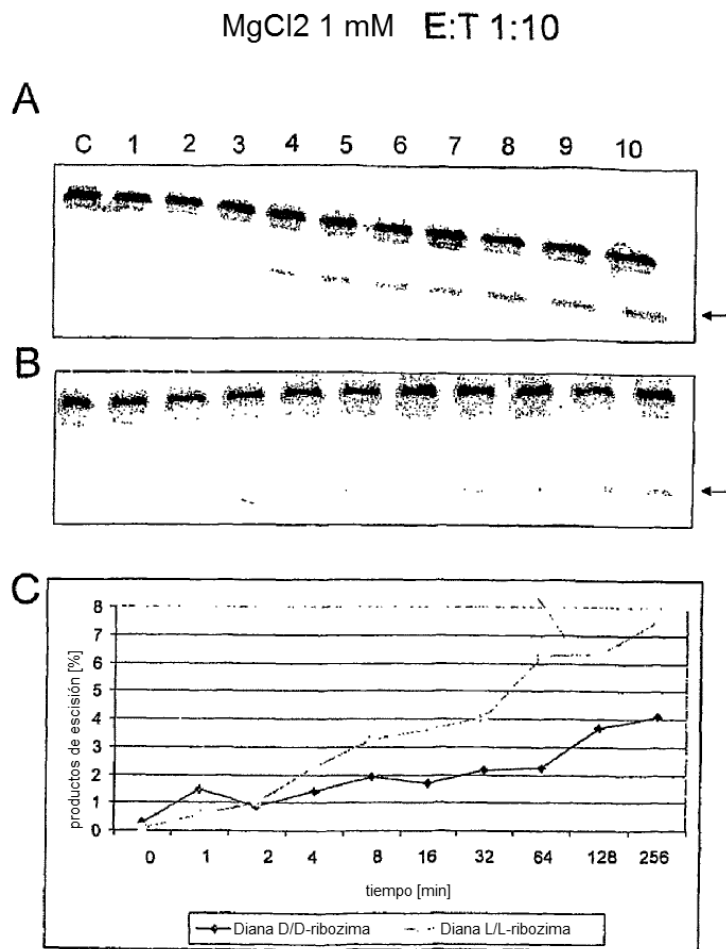


**FIG. 8**

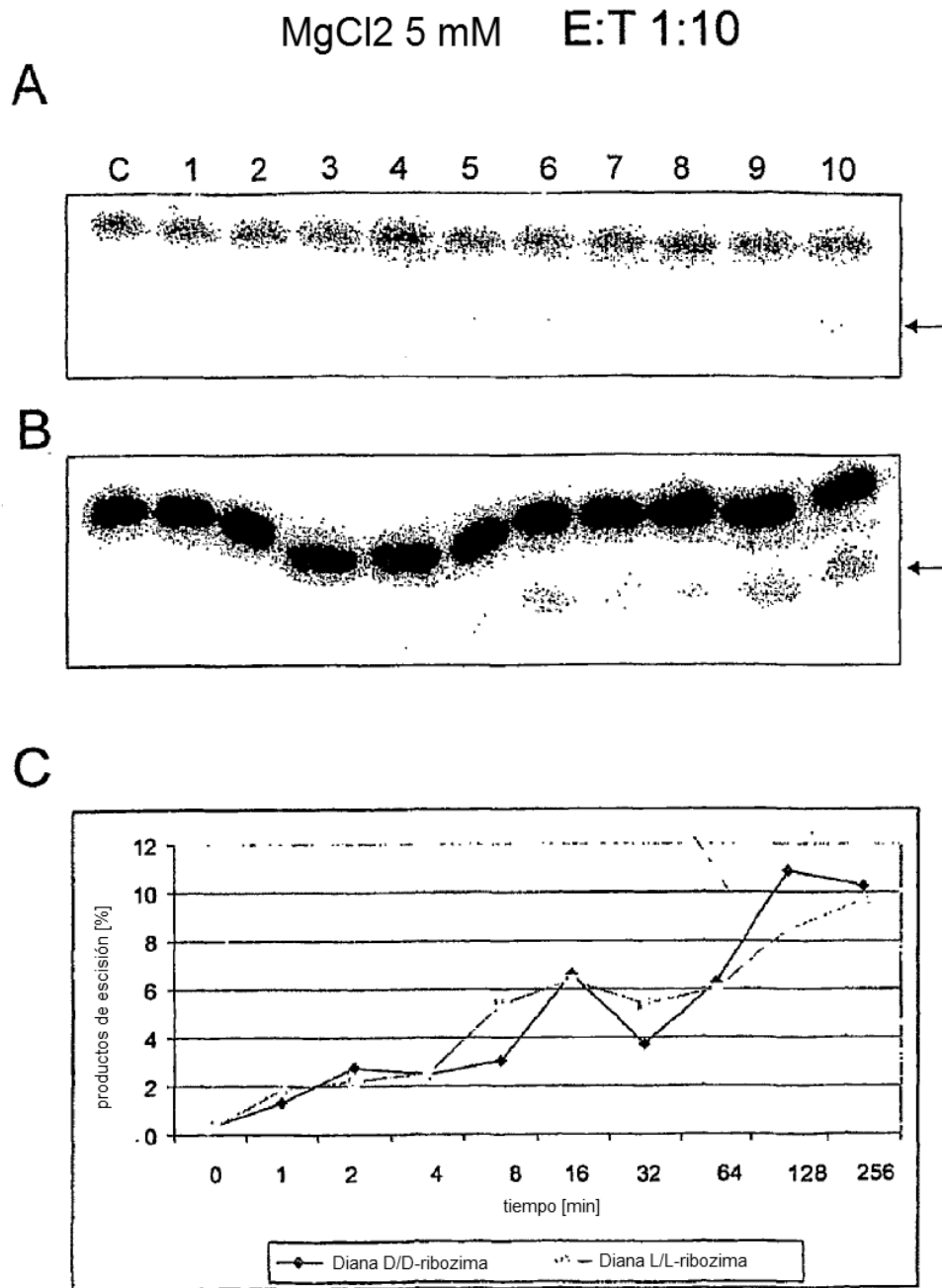
MgCl<sub>2</sub> 1 mM      E:T 1:10



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**

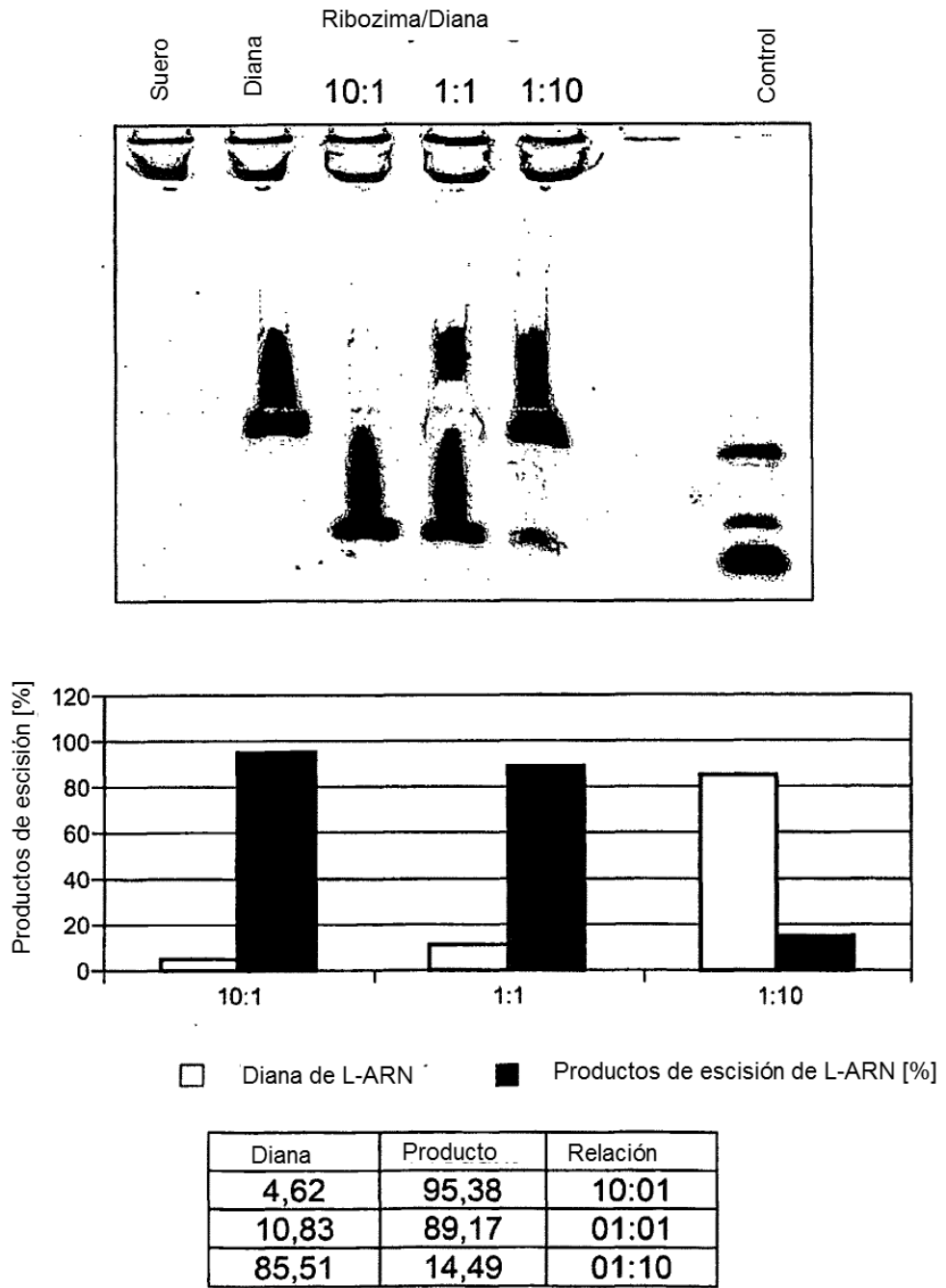


Fig. 12