

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 827**

51 Int. Cl.:

A61K 51/00 (2006.01)

A61M 36/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2008 E 08738250 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2144633**

54 Título: **Un sistema para entregar agentes terapéuticos a células vivas y núcleos de células**

30 Prioridad:

23.04.2007 US 907929 P

17.05.2007 US 924490 P

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

31.10.2014

73 Titular/es:

DELIVERSIR LTD (100.0%)

Hamazmera 9

74049 Nes Tziona, IL

72 Inventor/es:

SEGEV, DAVID

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 516 827 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

Un sistema para entregar agentes terapéuticos a células vivas y núcleos de células

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un sistema de entrega para entregar agentes terapéuticos a células vivas, y más particularmente, a restos químicos que son diseñados para ser capaces de acceder a y/o penetrar células u otras dianas de interés, y capaces además de unirse a agentes terapéuticos a ser entregados a estas células, y a sistemas de entrega que contienen los mismos.

Antecedentes de la invención

10 Uno de los objetivos que suponen mayor desafío es entregar materiales genéticos a células de manera segura. La identificación de genes defectivos responsables de estados de enfermedad, bien mediante un control defectivo de la expresión de genes, que conduce a sobreproducción o infraproducción de proteínas clave, o bien mediante la producción de proteínas defectivas, ofrece nuevas posibilidades para el tratamiento de enfermedades. Controlando el defecto a nivel genético, se podría tratar potencialmente con eficacia un abanico de enfermedades, en lugar de tratar meramente los síntomas de estas enfermedades.

15 El uso de material genético para entregar genes para fines terapéuticos ha sido practicado durante muchos años.

La generación de productos génicos terapéuticos (tales como polipéptidos, proteínas, mRNA y ARNi) mediante expresión de ADN codificador de productos génicos terapéuticos en células transformadas ha atraído amplia atención como método para tratar diversas enfermedades de mamíferos y potenciar la producción de proteínas específicas u otros productos celulares. Esta prometedora tecnología, denominada a menudo terapia génica (Crystal et al., Science 1995, 270, 404), se lleva a cabo generalmente introduciendo material genético exógeno en células de un paciente mamífero. Las células transformadas se pueden conseguir bien por transformación directa de células diana dentro del sujeto mamífero (terapia génica in vivo) o bien transformación de células in vitro e implantación posterior de las células transformadas en el sujeto mamífero (terapia génica ex vivo) (para revisiones, véase Chang et al. 1994 Gastroenterol. 106:1076-84;). El material genético introducido puede ser diseñado para sustituir un gen anormal (defectivo) del paciente mamífero ("terapia de sustitución de genes"), o puede ser diseñado para la expresión de la proteína codificada u otro producto terapéutico sin sustitución de ningún gen defectivo ("aumento de genes"). Debido a que muchos trastornos médicos congénitos y adquiridos resultan de una producción inadecuada de diversos productos génicos, la terapia génica proporciona medios para tratar estas enfermedades mediante expresión transiente o bien estable de ácido nucleico exógeno que codifica el producto terapéutico. Aunque la motivación inicial para la terapia génica era el tratamiento de trastornos genéticos, está llegando a ser cada vez más evidente que la terapia génica será útil para el tratamiento de un abanico más amplio de enfermedades adquiridas, tales como cáncer, trastornos infecciosos (tales como SIDA), enfermedad del corazón, artritis, y trastornos neurodegenerativos tales como enfermedades de Parkinson y de Alzheimer.

35 El ADN es inherentemente un material inestable en un entorno biológico activo, donde se encuentran muchas enzimas específicas capaces de degradar y metabolizar ADN (Ledoux et al., Prog. Nucl. Acid. Res., 1965, 4, 231). Además, existe en el cuerpo protección natural contra ADN ajeno. Así, las estrategias de terapia génica, terapia de oligonucleótidos antisentido y vacunación de genes descritas anteriormente requieren que el ADN y análogos del ADN sobrevivan en tal entorno biológico hostil, y además, que el ADN y análogos del ADN penetren las barreras biológicas, sean absorbidos en las células y sean entregados al compartimento subcelular correcto para ejercer sus efectos terapéuticos. Aunque algo de ADN es absorbido naturalmente en las células, la cantidad absorbida es típicamente pequeña e inconsistente, y la expresión del ADN añadido es por lo tanto escasa e impredecible.

45 Se han propuesto varias estrategias para conseguir la entrega de ADN a células vivas. Estas incluyen el uso de liposomas (Fraleigh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 3348), lípidos catiónicos (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413), y el uso de polímeros catiónicos, o policationes, tales como polilisina y poliornitina como agentes de entrega de ADN (Farber et al., Biochim. Biophys. Acta, 1975, 390, 298 y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 3410).

Las estrategias terapéuticas que implican la intervención a nivel genético están ampliamente reconocidas como tecnologías prometedoras, estos métodos están limitados por la ausencia de un método eficaz y fiable para entregar ADN y ARN.

50 Hay por tanto una necesidad ampliamente reconocida de, y sería sumamente ventajoso tener, un nuevo sistema de entrega para entregar agentes terapéuticos tales como moléculas de ADN y ARN a células vivas, que venciera las presentes limitaciones asociadas con la terapia génica.

El documento US 2006/0160763 describe sistemas para entregar agentes terapéuticos a células vivas.

biológicamente activos, que se pueden usar beneficiosamente para una entrega eficaz de tales agentes a dianas corporales tales como células vivas y/o núcleos de células.

5 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

Breve descripción de los dibujos

10 El tema contemplado como la invención está particularmente señalado y claramente reivindicado en la parte concluyente de la memoria descriptiva. La invención, sin embargo, tanto en cuanto a la organización como al método de operación, junto con objetos, rasgos y ventajas de la misma, puede ser entendida mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se lea con los dibujos acompañantes, en los que:

La Fig. 1 representa un esquema de síntesis.

La Fig. 2 representa un esquema de síntesis para la preparación del compuesto del Compuesto 44.

15 Se apreciará que por simplicidad y claridad de ilustración, los elementos mostrados en las figuras no han sido dibujados necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos pueden estar exageradas en relación a otros elementos por claridad. Además, donde se considere apropiado, los números de referencia pueden estar repetidos entre las figuras para indicar elementos correspondientes o análogos.

Descripción detallada de la presente invención

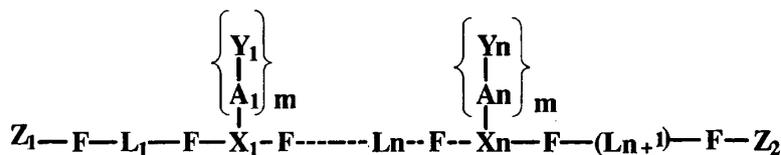
20 En la siguiente descripción detallada, se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar un entendimiento completo de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que la presente invención puede ser practicada sin estos detalles específicos. En otros casos, métodos, procedimientos y componentes bien conocidos no se han descrito en detalle para no complicar la presente invención.

25 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, es de entender que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los Ejemplos. También, es de entender que la fraseología y terminología empleada en la presente memoria es para un fin descriptivo, y no debe ser contemplada como limitante.

30 Se describe una clase de compuestos oligoméricos diseñados para formar conjugados con sustancias biológicamente activas y entregar estas sustancias a la diana deseada. La presente descripción es por tanto de conjugados adicionales de restos biológicos y tales compuestos oligoméricos, de composiciones farmacéuticas que contienen los conjugados, y de usos de estos conjugados para entregar las sustancias biológicamente activas a una diana deseada, y por tanto para tratar una infinidad de afecciones médicas. La presente descripción proporciona además procedimientos para preparar los conjugados y los compuestos oligoméricos y de compuestos intermedios diseñados para y usados en estos procedimientos.

35 En un aspecto, el sistema de entrega de esta descripción comprende compuestos oligoméricos biocompatibles, que están diseñados para incorporar grupos de entrega tales como grupos penetradores en células, grupos de reconocimiento y/o otros grupos que pueden dirigir el resto conjugado a la diana deseada, ya sea un órgano, un tejido, una célula, un compartimento celular y similares, como se detalla en la presente memoria. El compuesto oligomérico está diseñado además para incluir grupos reactivos, opcionalmente y preferiblemente grupos reactivos protegidos, que se seleccionan adecuadamente para unirse a un resto biológicamente activo deseado, y formar así el sistema de entrega. El sistema de entrega proporcionado en la presente memoria se puede usar eficazmente por 40 lo tanto para terapia y/o aplicaciones de diagnóstico, y particularmente para terapia celular.

Por tanto, según un aspecto de la presente descripción, se proporciona un compuesto oligomérico representado por la estructura de Fórmula I:



Fórmula I

45 en donde:

n es un número entero de entre 2 y 10, preferiblemente de 2 a 3;

m es un número entero de entre 1 y 6;

cada uno de X₁-X_n es independientemente un grupo cíclico o acíclico;

cada uno de L₁-L_n es independientemente un primer grupo enlazante;

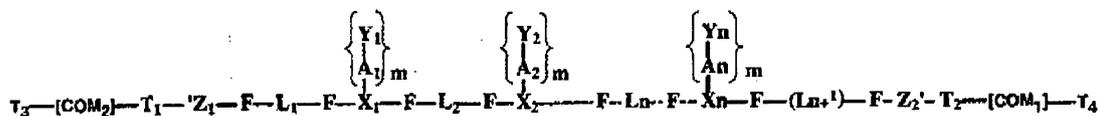
cada uno de A₁-A_n es independientemente un segundo grupo enlazante;

5 cada uno de Y₁-Y_n es independientemente un grupo de entrega o está ausente, a condición de que al menos uno de Y₁-Y_n sea el grupo de entrega;

cada uno de F es independientemente nada, N, O, S fosfato, amida, amina, o un grupo -C(O)O- y

10 cada uno de Z₁ y Z₂ es independientemente un grupo reactivo capaz de unirse a un resto biológicamente activo o está ausente, a condición de que al menos uno de Z₁ y Z₂ sea un grupo reactivo, en donde dicho grupo reactivo es hidroxilo, amina, haluro, un grupo que contiene fósforo, fosforamida, C-amida, N-amida, tiol o COOH.

En un aspecto, esta descripción proporciona un conjugado que comprende al menos un resto de entrega y al menos un resto biológicamente activo que está enlazado al mismo, que tiene la estructura de Fórmula II:

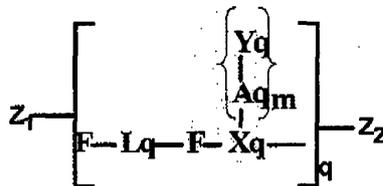


Fórmula II

15 en donde X₁-X_n, A₁-A_n, Y₁-Y_n, F y L₁-L_n, son como se describieron anteriormente para el Compuesto I;

cada uno de T₁, T₂, T₃ y T₄ es independientemente un resto biológicamente activo, en donde al menos uno de T₁ y T₂ es un resto biológicamente activo y T₃ y T₄ son opcionalmente;

[COM₁] y [COM₂] son un oligómero representado por lo siguiente -



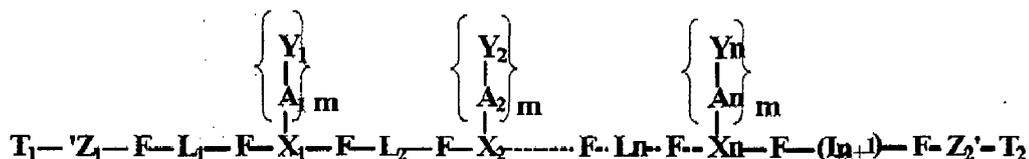
20 en donde F, Z₁, Z₂, y m son como se describieron anteriormente;

L_q, X_q, A_q y Y_q son como se definieron anteriormente para L₁-L_n, X₁-X_n, A₁-A_n y Y₁-Y_n respectivamente

q es entre 2 y 10; COM₁ y COM₂ son opcionalmente;

25 cada uno de Z₁' y Z₂' es independientemente un derivado de Z₁ y Z₂, respectivamente, como resultado de unirse al grupo biológicamente activo, en donde dicho grupo reactivo Z₁ y Z₂ es hidroxilo, amina, haluro, un grupo que contiene fósforo, fosforamida, C-amida, N-amida, tiol o COOH.

En un aspecto, esta descripción proporciona un conjugado que comprende al menos un resto de entrega y al menos un resto biológicamente activo o un grupo etiqueta que está enlazado al mismo, representado por la estructura de Fórmula IIa:



Fórmula IIa

en donde:

n es un número entero de entre 2 y 10;

m es un número entero de entre 1 y 6;

cada uno de X_1 - X_n es independientemente un grupo cíclico o acíclico;

cada uno de L_1 - L_n es independientemente un primer grupo enlazante;

cada uno de A_1 - A_n es independientemente un segundo grupo enlazante;

- 5 cada uno de Y_1 - Y_n es independientemente un grupo de entrega o está ausente, a condición de que al menos uno de Y_1 - Y_n sea el grupo de entrega;

cada uno de F es independientemente nada, N, O, S fosfato, amida, amina, o un grupo -C(O)O-;

cada uno de T_1 y T_2 es independientemente un resto biológicamente activo, en donde al menos uno de T_1 y T_2 es un resto biológicamente activo; y

- 10 cada uno de Z_1' , Z_2' , es independientemente un derivado de Z_1 y Z_2 , respectivamente, como resultado de unirse al grupo biológicamente activo, en donde dicho grupo reactivo Z_1 y Z_2 es hidroxilo, amina, haluro, un grupo que contiene fósforo, fosforamida, C-amida, N-amida, tiol o COOH.

- 15 En algunos aspectos, las estructuras oligoméricas de fórmula I o II comprenden un residuo X_1 - X_n . En otros aspectos, X_1 - X_n y X_q es un resto hidrocarbonado cíclico tal como, por ejemplo, un cicloalquilo o un arilo. En otra realización, X_1 - X_n y X_q es un resto heterocíclico, tal como heteroalíclico o heteroarilo. En otros aspectos, X_1 - X_n y X_q es un alquilo lineal o ramificado.

- 20 En un aspecto, X_1 - X_n y X_q de Fórmula I y/o II es un cicloalquilo. Como se emplea en la presente memoria, el término "cicloalquilo" describe un grupo anular monocíclico o condensado totalmente de carbono (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos de carbono) donde uno o más de los anillos no tiene un sistema pi-electrónico completamente conjugado. En otros aspectos, el cicloalquilo es cicloalquilo saturado. En otros aspectos, el cicloalquilo es un anillo insaturado, que no tiene un carácter aromático. En otros aspectos, el cicloalquilo se refiere a un anillo de 3 a 12 miembros. En otro aspecto, el cicloalquilo se refiere a un anillo de 4-8 miembros. En otro aspecto, el cicloalquilo se refiere a un anillo de 5 miembros. En otro aspecto, el cicloalquilo se refiere a un anillo de 6 miembros. Los ejemplos incluyen ciclopentano, ciclohexano, 1-ciclohexeno y similares. En otra realización, el cicloalquilo puede ser anillo sustituido o no sustituido, en donde dicho sustituyente es por ejemplo, pero no se limita a, un halógeno, alquilo, ciano, un fosfato, nitro, una amina o cualquier combinación de los mismos.

- 30 En un aspecto, X_1 - X_n y X_q de Fórmula I y/o II es un heteroalíclico. El término "heteroalíclico" se refiere a una cadena alifática y anillo heterocíclico. En otro aspecto, un anillo heteroalíclico contiene uno o más anillos que pueden ser saturados o bien insaturados, pero no tienen carácter aromático. El grupo heteroalíclico incluye, por ejemplo, tetrahidrofurilo, tetrahidrotienilo, cromanilo, o éter cíclico (p.ej., un monosacárido). En otra realización, el heteroalíclico se refiere a un anillo de 3-12 miembros. En otra realización, el heteroalíclico se refiere a un anillo de 4-8 miembros. En otro aspecto, el heteroalíclico se refiere a un anillo de 5 miembros. En otro aspecto, el heteroalíclico se refiere a un anillo de 6 miembros. En otro aspecto, el heteroalíclico puede ser anillo sustituido o no sustituido, en donde dicho sustituyente es por ejemplo, pero no se limita a, un halógeno, alquilo, ciano, un fosfato, nitro, una amina o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, X_1 - X_n y X_q de Fórmula I y/o II es un arilo. El término "arilo" describe un grupo monocíclico o policíclico de anillos condensados (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) totalmente de carbono que tiene un sistema pi-electrónico completamente conjugado. Los ejemplos incluyen fenilo, bifenilo, grupos fenilo oligoméricos, naftaleno, cumulenos, y similares. En otro aspecto, el arilo se refiere a un anillo de 3-12 miembros. En otro aspecto, el arilo se refiere a un anillo de 4-8 miembros. En otro aspecto, el arilo se refiere a un anillo de 5 miembros. En otro aspecto, el arilo se refiere a un anillo de 6 miembros. En otro aspecto, el arilo puede ser anillo sustituido o no sustituido, en donde dicho sustituyente es por ejemplo, pero no se limita a, un halógeno, alquilo, ciano, un fosfato, nitro, una amina o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, X_1 - X_n y X_q de Fórmula I y/o II es un heteroarilo. El término "heteroarilo" describe un grupo monocíclico o de anillos condensados (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos) que tiene en el (los) anillo(s) uno o más átomos, tales como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre y, además, que tiene un sistema pi-electrónico completamente conjugado. Los ejemplos, sin limitación, de grupos heteroarilo incluyen pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. En otro aspecto, el heteroarilo se refiere a un anillo de 3-12 miembros. En otro aspecto, el heteroarilo se refiere a un anillo de 4-8 miembros. En otro aspecto, el heteroarilo se refiere a un anillo de 5 miembros. En otro aspecto, el heteroarilo se refiere a un anillo de 6 miembros. En otro aspecto, el heteroarilo puede ser anillo sustituido o no sustituido, en donde dicho sustituyente es por ejemplo, pero no se limita a, un halógeno, alquilo, ciano, un fosfato, nitro, una amina o cualquier combinación de los mismos.

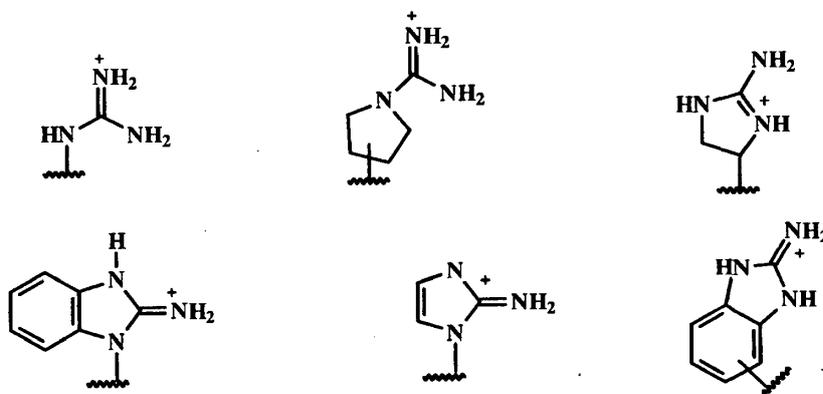
- 55 En un aspecto X_1 - X_n y X_q de Fórmula I y/o II es un monosacárido. El término "monosacárido", como se emplea en la presente memoria y es bien conocido en la técnica, se refiere a una forma simple de un azúcar que consiste en una única molécula de sacárido que no puede ser descompuesta más por hidrólisis. En otro aspecto el monosacárido es glucosa (dextrosa), fructosa, galactosa, o ribosa. En otro aspecto, los monosacáridos se clasifican según el número de átomos de carbono del carbohidrato, es decir, triosa, que tiene 3 átomos de carbono, tales como gliceraldehído y

- 5 dihidroxiacetona; tetrosa, que tiene 4 átomos de carbono, tales como eritrosa, treosa y eritrolulosa; pentosa, que tiene 5 átomos de carbono, tales como arabinosa, lixosa, ribosa, xilosa, ribulosa y xilulosa; hexosa, que tiene 6 átomos de carbono, tales como alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa y tagatosa; heptosa, que tiene 7 átomos de carbono, tales como manoheptulosa, sedoheptulosa; octosa, que tiene 8 átomos de carbono, tales como 2-ceto-3-desoxi-mano-octonato; nonosa, que tiene 9 átomos de carbono, tales como sialosa; y decosa, que tiene 10 átomos de carbono. En otra realización, los monosacáridos son los bloques constructores de oligosacáridos como la sacarosa (azúcar común) y otros polisacáridos (tales como celulosa y almidón).
- 10 En un aspecto X_1 - X_n y X_q de Fórmula I y/o II es un alquilo lineal o ramificado. El término "alquilo" se refiere, en una realización, a un hidrocarburo alifático saturado, que incluye de cadena lineal o de cadena ramificada. En un aspecto, el grupo alquilo tiene 1-12 carbonos. En otro aspecto, el grupo alquilo tiene 1-7 carbonos. En otro aspecto, el grupo alquilo tiene 1-6 carbonos. En otro aspecto, el grupo alquilo tiene 1-4 carbonos. En otro aspecto, el alquilo ramificado es un alquilo sustituido por cadenas laterales alquilo de 1 a 5 carbonos. En otro aspecto, el alquilo ramificado es un alquilo sustituido por cadenas laterales haloalquilo de 1 a 5 carbonos. El grupo alquilo puede ser sustituido o no sustituido, en donde dicho sustituyente es por ejemplo, pero no se limita a, un halógeno, alquilo, ciano, un fosfato, nitro, una amina o cualquier combinación de los mismos.
- 15 En un aspecto X_1 - X_n y X_q de Fórmula I y/o II es un alquiléter lineal o ramificado o un alquilfosfato. En un aspecto X_1 - X_n de Fórmula I y/o II es un alquilo lineal o cíclico interrumpido por uno o más heteroátomos tales como O, N, S, P o cualquier combinación de los mismos.
- 20 En algunos aspectos, las estructuras oligoméricas de fórmula I o II comprenden un puente F. En otro aspecto, cada uno de F se selecciona independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fosfato y azufre. En otra realización es oxígeno. En otra realización, F es fosfato.
- 25 En algunos aspectos, las estructuras oligoméricas de fórmula I o II comprenden un número entero m de 1 a 10. En otra realización, m es un número entero entre 1 y 5. En otro aspecto, m es 4 o 5 y X_1 - X_n y X_q es un resto cíclico que comprende un anillo de 5 o 6 miembros respectivamente. En otro aspecto, m es menor que 4 o 5, y las restantes posiciones de X_1 - X_n y X_q son hidrógeno o bien llevan sustituyentes tales como alquilo, definido anteriormente.
- 30 En un aspecto, los residuos X_1 - X_n que forman la cadena principal del oligómero según la presente invención pueden estar conectados uno al otro, bien directamente o bien por medio de un grupo enlazante. Tal grupo enlazante se denomina en la presente memoria primer grupo enlazante, y se denota como L_1 - L_n y L_q de las estructuras de Fórmula I y II. En otra realización, L_1 - L_n y L_q es una cadena hidrocarbonada sustituida o no sustituida, saturada o insaturada. En otra realización, L_1 - L_n y L_q es independientemente una cadena hidrocarbonada sustituida o no sustituida interrumpida por al menos un doble enlace o triple enlace, un heteroátomo o cualquier combinación de los mismos, en donde el heteroátomo se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre.
- 35 En un aspecto, el término "cadena hidrocarbonada" de esta invención se refiere a una sustancia que incluye una pluralidad de átomos de carbono que tienen mayoritariamente átomos de hidrógeno unidos a los mismos. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada de L_1 - L_n y L_q puede ser alifática, alicíclica y/o aromática, y por tanto puede estar compuesta de, por ejemplo, alquilos, alquencilos, alquinilos, cicloalquilos, y arilos, como se definen estos términos en la presente memoria, o cualquier combinación de los mismos.
- 40 El término "alquencilo" se refiere a una sustancia que incluye al menos dos átomos de carbono y al menos un doble enlace.
- El término "alquencilo" se refiere a una sustancia que incluye al menos dos átomos de carbono y al menos un triple enlace.
- 45 En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada de L_1 - L_n y L_q comprende entre 2 y 20 átomos de carbono. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada comprende entre 2 y 10 átomos de carbono. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada comprende entre 2 y 6 átomos de carbono. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada comprende entre 4 y 6 átomos de carbono. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada comprende entre 4 y 10 átomos de carbono.
- 50 La incorporación de tales restos enlazantes dentro de la cadena principal del oligómero descrito en la presente memoria puede dotar al oligómero de ciertas características tales como una naturaleza hidrófoba, una naturaleza hidrófila, una naturaleza anfifílica y similares. Además, la incorporación de tales restos enlazantes puede servir además para espaciar los grupos de entrega unos de otros o para determinar el espacio entre los mismos, en casos donde se desea tal espacio.
- 55 En un aspecto, la Fórmula I y/o II oligomérica comprende un grupo de entrega Y_1 - Y_n y Y_q . La expresión "grupo de entrega", se refiere a un grupo químico o biológico, que permite el transporte de una sustancia que contiene tal grupo a la membrana; restos de reconocimiento, un ligando, un anticuerpo, un antígeno, un sustrato, un inhibidor o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, el grupo permeable a la membrana comprende al menos un

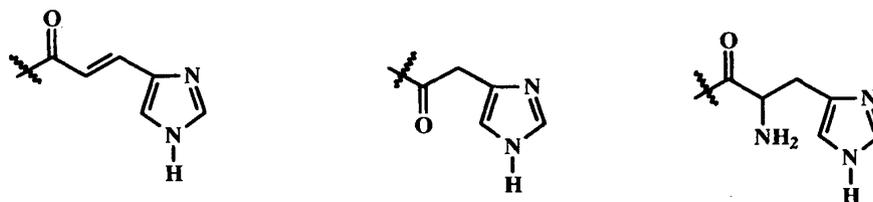
grupo cargado positivamente. En otro aspecto, cada una de la Fórmula I o II oligomérica comprende al menos un grupo de entrega. En otro aspecto, cada una de la Fórmula I o II oligomérica comprende 1 o 2 grupos de entrega. En otro aspecto, cada una de la Fórmula I o II oligomérica comprende al menos cuatro grupos de entrega. En otro aspecto, los oligómeros proporcionan entre 1 y 8 grupos de entrega. En otro aspecto, los oligómeros proporcionan entre 4 y 10 grupos de entrega. En otro aspecto, los oligómeros proporcionan entre 5 y 10 grupos de entrega. En otro aspecto, los oligómeros proporcionan entre 4 y 20 grupos de entrega.

En un aspecto, la Fórmula I y/o II oligomérica comprende un grupo de entrega Y_1-Y_n y Y_q en donde Y_1-Y_n y Y_q es un grupo permeable a la membrana. La expresión "grupos permeables a la membrana" se refiere a un grupo que es capaz de penetrar una membrana corporal, p.ej., una membrana celular, una membrana de núcleo y similares. Los grupos permeables a la membrana proporcionan por tanto características penetradoras de la membrana o de permeabilidad a la membrana a compuestos que incorporan los mismos, y permiten la penetración de tales compuestos en células, núcleos y similares. Tales grupos de entrega sirven por tanto para entregar sustancias a células y/o compartimentos celulares. En otro aspecto, Y_1-Y_n y Y_q es un grupo permeable a la membrana que comprende al menos un grupo cargado positivamente. En otra realización, el grupo cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en amina, histidina, guanidina, poliguanidina, imidazol y polimidazol.

En otro aspecto, Y_1-Y_n o Y_q es independientemente guanidina o un derivado de guanidina tal como, pero no limitado a:



En otro aspecto, Y_1-Y_n y Y_q es independientemente histidina o un derivado de histidina tal como, pero no limitado a, o derivados de histidina tales como:



En un aspecto, la Fórmula I y/o II oligomérica comprende un grupo de entrega Y_1-Y_n y Y_q en donde Y_1-Y_n y Y_q es un resto de reconocimiento. La expresión "resto de reconocimiento" describe una sustancia que interactúa con un sitio específico por medio de reconocimiento molecular; un fenómeno también conocido como química de "anfitrión-huésped", en la que se distinguen adecuadamente moléculas de otras moléculas. Químicamente, ello indica que ciertas moléculas se unen anormalmente con otras moléculas (o la misma especie) con respecto a otras moléculas encontradas en el mismo entorno. Este fenómeno implica el posicionamiento tridimensional de diversas funcionalidades submoleculares que pueden formar interacciones entre moléculas por medio de acciones recíprocas tales como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, interacción iónica, u otras interacciones no de enlace covalente. Los ejemplos específicos de reconocimiento molecular incluyen sistemas en los que están incluidas moléculas hidrófobas en ciclodextrina así como la relativamente simple interacción entre éter corona y metales alcalinos, sistemas ligando-receptor a sistemas complejos tales como interacción proteína-proteína.

El reconocimiento molecular consiste en reconocimiento molecular estático y reconocimiento molecular dinámico. El reconocimiento molecular estático se compara con la interacción entre una llave y una cerradura; es una reacción de complejación de tipo 1:1 entre una molécula anfitriona y una molécula huésped. Para conseguir reconocimiento molecular estático avanzado, es necesario hacer sitios de reconocimiento que sean adecuados para moléculas huésped. El reconocimiento molecular dinámico es una reacción de reconocimiento molecular que cambia dinámicamente el equilibrio a un complejo anfitrión-huésped de tipo n:m mediante una molécula de reconocimiento huésped. Hay algunos equivalentes por la combinación de moléculas anfitrionas. El reconocimiento molecular dinámico que aparece en supramoléculas es esencial para diseñar sensores químicos altamente funcionales y

dispositivos moleculares. Por tanto, un resto de reconocimiento es típicamente cualquier sustancia que forme parte de un par biológico tal como receptor-ligando, enzima-sustrato, anticuerpo-antígeno, biotina-avidina y similares.

5 Los restos de reconocimiento se usan en el contexto de la presente invención para transportar selectivamente un resto biológicamente activo a una diana específica, aprovechando la ventaja de la alta afinidad del resto de reconocimiento para un resto biológico que está asociado con o está presente en la diana.

10 En un aspecto, la Fórmula I y/o II oligomérica comprende un grupo de entrega Y_1 - Y_n y Y_q en donde Y_1 - Y_n y Y_q es un resto de reconocimiento tal como, por ejemplo, un ligando que se sabe que se une a un receptor que está presente típicamente en la diana deseada; un sustrato o un inhibidor que puede unirse a una enzima que está presente típicamente en la diana deseada; un anticuerpo que puede unirse a un antígeno que está presente típicamente en la diana deseada; un antígeno de un anticuerpo que está presente típicamente en la diana deseada; un resto biotinilado que puede formar un complejo con estreptavidina; o un resto que contiene avidina que puede formar un complejo con biotina mitocondrial.

15 En un aspecto, el oligómero descrito en la presente memoria puede incluir grupos de entrega iguales o diferentes (Y_1 - Y_n , Y_q) y por tanto puede incluir varios, iguales o diferentes, grupos con permeabilidad a la membrana, varios, iguales o diferentes, restos de reconocimiento descritos anteriormente y una combinación de grupos permeables a la membrana y uno o más restos de reconocimiento.

20 En un aspecto, el oligómero puede incluir uno o más grupos capaces de ser convertidos en grupos de entrega (Y_1 - Y_n , Y_q). Tales grupos, que también se denominan en la presente memoria "grupos de pro-entrega", incluyen, por ejemplo, grupos funcionales que pueden ser convertidos químicamente en los grupos de entrega y grupos funcionales a los que el resto de entrega puede unirse. Los ejemplos representativos incluyen aminas, que, por ejemplo, por una simple reacción con 1h-pirazol-1-carboxamida, pueden ser convertidas en guanidina, o que, por una reacción de adición, se pueden usar para unir diversos restos de reconocimiento. Ejemplos adicionales incluyen grupos reactivos, como se define este término en la presente memoria, que se seleccionan químicamente compatibles con grupos funcionales en el resto de reconocimiento y por tanto se puedan usar para unirse a tales restos.

25 En un aspecto, los grupos de entrega y pro-entrega incorporados en el oligómero descrito en la presente memoria están opcionalmente y preferiblemente protegidos, es decir, tienen grupos protectores unidos a los mismos. Se detallan más adelante grupos protectores que son adecuados para el uso en este contexto.

30 En un aspecto, el grupo de entrega (Y_1 - Y_n , Y_q) o el grupo de pro-entrega puede estar unido a un residuo de bloque constructor en el oligómero, bien directamente o bien por medio de un grupo enlazante. Un grupo enlazante que conecta el grupo de entrega a la cadena principal del oligómero se denota como A_1 - A_n y A_q en las estructuras de Fórmula I o II anteriores, y también se denomina en la presente memoria segundo grupo enlazante. En otro aspecto, el segundo grupo enlazante sirve para unir químicamente el resto de entrega al residuo de bloque constructor dentro del oligómero, y puede proporcionar características deseadas adicionales tales como una naturaleza hidrófoba, una naturaleza hidrófila y una naturaleza anfífilica. El segundo grupo enlazante permite además espaciar el grupo de entrega de la cadena principal del oligómero. Tal espaciado es particularmente ventajoso en casos donde el oligómero es un oligonucleótido, dado que, de lo contrario, el grupo de entrega puede afectar a la actividad esencial del oligonucleótido en términos de interacciones de hibridación (emparejamiento), reacciones enzimáticas y similares. En otro aspecto, los segundos grupos enlazantes incluyen, sin limitación, una cadena hidrocarbonada sustituida o no sustituida, saturada o insaturada. En otro aspecto, A_1 - A_n y A_q es independientemente una cadena hidrocarbonada sustituida o no sustituida interrumpida por al menos un doble enlace o triple enlace, un heteroátomo o cualquier combinación de los mismos, en donde el heteroátomo se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada de A_1 - A_n y A_q es una cadena alifática, alicíclica y/o aromática, y por tanto puede estar compuesta de, por ejemplo, alquilos, alquénilos, alquínilos, cicloalquilos, y arilos, como se definen estos términos en la presente memoria, o cualquier combinación de los mismos.

35 En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada de A_1 - A_n y A_q comprende entre 2 y 20 átomos de carbono. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada comprende entre 2 y 10 átomos de carbono. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada comprende entre 2 y 6 átomos de carbono. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada comprende entre 4 y 6 átomos de carbono. En otro aspecto, la cadena hidrocarbonada comprende entre 4 y 10 átomos de carbono.

40 En un aspecto, el oligómero descrito en la presente memoria tiene como objetivo formar un conjugado con diversos restos (Fórmula II), como se detalla más adelante, para entregar restos biológicamente activos a una diana deseada. En otro aspecto, el oligómero de Fórmula I termina en al menos un grupo reactivo (denotado en la presente memoria como Z_1 - Z_2), como se detalla más adelante, que es capaz de reaccionar con un resto biológicamente activo deseado. El oligómero de Fórmula I, incluye por lo tanto uno o dos grupos reactivos, dependiendo del número deseado de restos biológicamente activos que se unirían al mismo. De manera similar, cada uno de los grupos reactivos se selecciona dependiendo de la naturaleza química del resto biológicamente activo, para que sea químicamente compatible con grupos funcionales presentes dentro del resto biológico.

En un aspecto, el compuesto oligomérico de Fórmula I comprende un grupo reactivo (Z_1-Z_2) capaz de unirse a un resto biológicamente activo. Según aún otros rasgos adicionales en los aspectos preferidos descritos, cada uno de Z_1 y Z_2 es hidroxilo, amina, haluro, un grupo que contiene fósforo (tal como una fosforamida), C-amida, N-amida, carboxi, tiol, COOH, tioamida, tiocarboxi, alcoxi, tioalcoxi, ariloxi, tioariloxi, hidrazina, hidrazida, epóxido o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, al menos uno de los grupos reactivos es un grupo reactivo protegido.

En otro aspecto, el compuesto oligomérico de Fórmula I comprende un grupo reactivo (Z_1-Z_2) capaz de unirse a un resto biológicamente activo. Tras unirse al resto biológicamente activo mediante, por ejemplo, pero no limitado a, una reacción de acoplamiento o reacción de sustitución, el Z_1-Z_2 puede ser derivatizado para dar los correspondientes Z_1' y Z_2' . Se entiende que si Z_1 y/o Z_2 es un halógeno, entonces, tras reaccionar con el resto biológicamente activo, el grupo halógeno puede ser retirado de la estructura oligomérica y T se enlazará directamente a F o L. Se entiende también que si Z_1 y/o Z_2 son hidroxilo, entonces tras unirse al resto biológicamente activo, el grupo -OH puede ser un puente -O- (Z_1' o Z_2'); etc.

El término "oligómero", como se emplea en la presente memoria, describe una sustancia química, o un residuo de una sustancia química, que está constituido por dos o más unidades básicas que están químicamente enlazadas una a otra de una manera secuencial, formando así una cadena de residuos repetitivos de estas unidades, que constituye el oligómero.

Como se emplea en la presente memoria, la frase "bloque constructor" describe una unidad básica, que sirve para ensamblar un oligómero, como se define este término en la presente memoria (denotado en la presente memoria como "X").

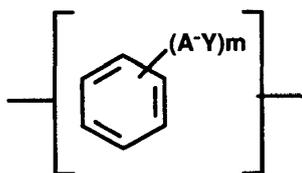
Como es bien sabido en la técnica, el término "residuo" se refiere en la presente memoria a una porción principal de una molécula, que está enlazada químicamente a otra molécula.

En un aspecto, los bloques constructores de esta invención X_1-X_n y X_q que construyen los oligómeros proporcionados en la presente memoria son idénticos, similares (que pertenecen a la misma familia de compuestos) o diferentes uno del otro (que pertenecen a una familia diferente de compuestos).

En un aspecto, los compuestos de Fórmula I y/o II, comprenden residuos de bloques constructores (denotados en la presente memoria como " X_1-X_n o X_q ") que construyen el compuesto oligomérico para tener uno o más, preferiblemente dos o más, grupos de entrega enlazados al mismo directamente o bien indirectamente. La incorporación de los grupos de entrega se puede realizar proporcionando un oligómero no modificado correspondiente y modificando el oligómero uniendo al mismo un grupo de entrega o un grupo enlazante al que está unido un grupo de entrega. Alternativamente, se pueden preparar primero bloques constructores modificados que incorporan el grupo de entrega y ensamblarse después para formar el oligómero. En cualquier caso, los bloques constructores se seleccionan para permitir la formación de tal oligómero que contiene grupo de entrega.

El término "entregar" o "entrega", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere al acto de permitir el transporte de una sustancia a una ubicación específica, y más específicamente, a una diana corporal deseada, por lo cual la diana puede ser, por ejemplo, un órgano, un tejido, una célula, y un compartimento celular tal como el núcleo, la mitocondria, el citoplasma, etc. El grupo(s) reactivo(s) (Z_1-Z_2), así como los grupos de entrega y los grupos de pro-entrega, en el oligómero descrito en la presente memoria, puede(n) ser protegido(s) por un grupo protector. Los grupos protectores se seleccionan de compuestos químicos compatibles con el procedimiento de oligomerización y el procedimiento de unión al resto biológicamente activo que sigue. El grupo protector se selecciona por tanto de tal modo que proporcione una estabilidad selectiva al grupo protegido durante o posteriormente a los diversos procedimientos sintéticos y/o enzimáticos emprendidos en la ruta hacia el oligómero final, y se pueden seleccionar además por las condiciones requeridas para su retirada. Tales condiciones no deben afectar a otros restos deseables que estén presentes dentro del oligómero. La expresión "grupo protector", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un grupo que cuando está unido a un grupo reactivo en una molécula, enmascara selectivamente, reduce o impide la reactividad del grupo reactivo. Se pueden encontrar ejemplos de grupos protectores en Green et al., "Protective Groups in Organic Chemistry", (Wiley, 2ª ed. 1991) y Harrison et al., "Compendium of Synthetic Organic Methods", Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996).

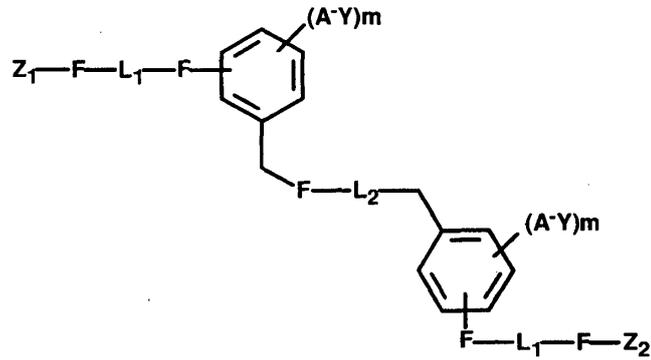
En un aspecto, el $X(A-Y)_m$ de Fórmula I y/o II se representa por la estructura del Compuesto III:



50

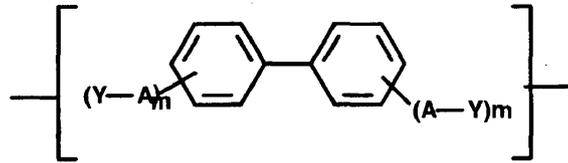
Compuesto (III)

En un aspecto, el compuesto oligomérico de Fórmula I se representa por la estructura del Compuesto IV:



Compuesto (IV)

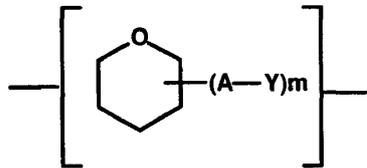
En un aspecto, el X(A-Y)m de Fórmula I y/o II se representa por la estructura del Compuesto V:



5

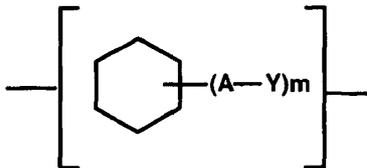
Compuesto (V)

En un aspecto, el X(A-Y)m de Fórmula I y/o II se representa por la estructura del Compuesto VI:



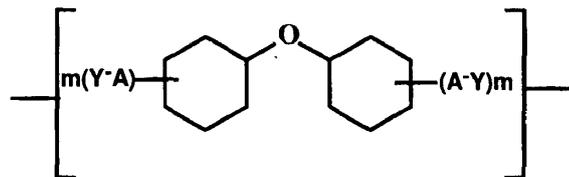
Compuesto (VI)

10 En un aspecto, el X(A-Y)m de Fórmula I y/o II se representa por la estructura del Compuesto VII:



Compuesto (VII)

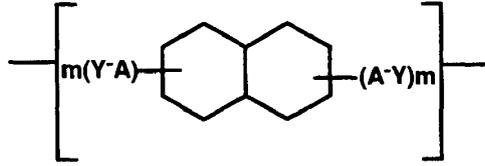
En un aspecto, el X(A-Y)m de Fórmula I y/o II se representa por la estructura del Compuesto VIII:



15

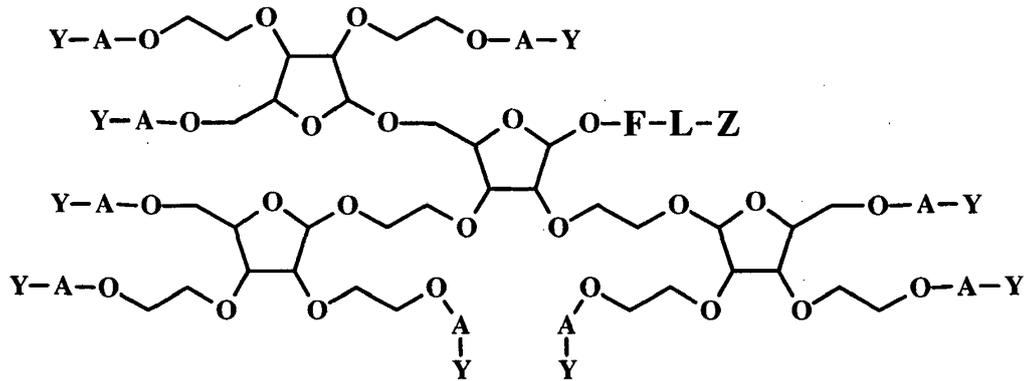
Compuesto (VIII)

En un aspecto, el X(A-Y)_m de Fórmula I y/o II se representa por la estructura del Compuesto IX:



Compuesto (IX)

En un aspecto, el compuesto oligomérico de Fórmula I se representa por la estructura del Compuesto X:

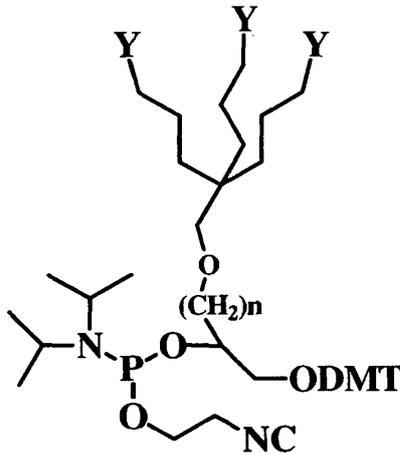


5

Compuesto X

en donde los grupos Y y restos F-L-Z podrían ser dispuestos arbitrariamente.

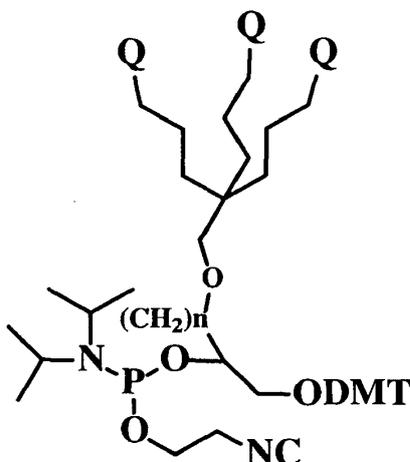
En un aspecto, el X(A-Y)_m de Fórmula I y/o II se representa por la estructura del Compuesto XI:



Compuesto (XI)

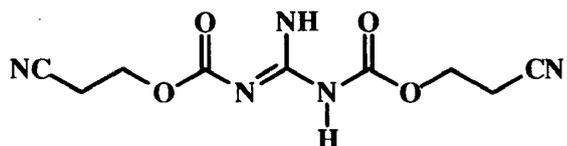
10

En un aspecto, el X(A-Y)_m de Fórmula I y/o II se representa por la estructura del Compuesto XIa:



Compuesto (XIa)

- 5 en donde Q es -NHC(O)CF₃ y DMT se refiere a dimetoxitritilo. Incorporando uno o más grupos de entrega (denotados en la presente memoria como Q₁-Q_n, el resto Q será convertido en Y mediante varias etapas químicas como se describe en los Ejemplos). En otra realización Q es:



- 10 Los compuestos oligoméricos de Fórmula I y/o II descritos en la presente memoria pueden servir eficazmente como sistema de entrega para entregar restos deseados a dianas corporales deseadas, tras conjugar a las mismas tal resto deseado.

- 15 En un aspecto, el conjugado oligomérico de Fórmula II comprende un resto biológicamente activo T₁-T₂. Según aún más rasgos en los aspectos preferidos descritos, el resto biológicamente activo es un agente terapéuticamente activo, un fármaco, un resto marcador, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el agente terapéuticamente activo es un oligonucleótido, un constructo de ácido nucleico, un antisentido, un plásmido, un polinucleótido, un aminoácido, un péptido, un polipéptido, una hormona, un esteroide, un anticuerpo, un antígeno, un radioisótopo, un agente quimioterapéutico, una toxina, un agente antiinflamatorio, un factor de crecimiento o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el resto marcador es un resto fluorescente, un resto radiomarcado, un resto fosforescente, un resto de clúster de metal pesado o cualquier combinación de los mismos.

- 20 En un aspecto uno de L₁-L_n, L_q o uno de "F" se une a un grupo reactivo (denotado en la presente memoria como "Z") capaz de unirse a un resto biológicamente activo que está unido al mismo. En otro aspecto, T₁, T₂, T₃ y/o T₄ se une a uno de L₁-L_n, L_q o uno de "F".

- 25 En un aspecto, el conjugado de Fórmula II y el compuesto oligomérico de Fórmula I comprenden la misma cadena principal, en donde el conjugado de Fórmula II se forma tras conjugar el compuesto oligomérico de Fórmula I, por medio de los grupos reactivos Z₁ y Z₂ (véase la Fórmula I general anterior) con uno o más restos biológicamente activos, como se detalla más adelante. Después de tal conjugación, T₁, T₂, T₃ y/o T₄ en la Fórmula II general anterior, que unen el resto biológicamente activo al sistema de entrega, se forman mediante los grupos reactivos.

- En un aspecto, el grupo reactivo (p.ej., Z₁) en el sistema de entrega, el compuesto oligomérico de Fórmula I es un epóxido, que se hace reaccionar con un fármaco que tiene un grupo funcional amina y se forma un conjugado -CH(OH)-CH₂-NH-resto de fármaco.

- 30 La naturaleza de los grupos reactivos se puede determinar en base al grupo funcional del resto biológicamente activo que se une al oligómero.

- 35 Los restos biológicamente activos que pueden ser entregados beneficiosamente a diversas dianas corporales utilizando el sistema de entrega descrito en la presente memoria incluyen, por ejemplo, agentes terapéuticamente activos, agentes marcadores (restos) y combinaciones de los mismos, esto es, agentes terapéuticamente activos marcados.

La expresión "resto biológicamente activo", como se emplea en la presente memoria, describe una molécula, compuesto, complejo, aducto y material compuesto que tiene una función biológica y/o ejerce una o más actividades farmacéuticas, bien in vivo o bien in vitro, y se usa para prevenir, tratar, diagnosticar o seguir una afección médica de cualquier tipo en cualquier fase y en cualquier sujeto.

- 5 La expresión "agente terapéuticamente activo", como se emplea en la presente memoria, describe una molécula, compuesto, complejo, aducto y material compuesto, que ejerce una o más actividades farmacéuticas, y se usa para prevenir, aliviar o tratar una afección médica.

Ejemplos representativos de agentes terapéuticamente activos que se pueden incorporar beneficiosamente en el sistema de entrega descrito en la presente memoria incluyen, sin limitación, agonistas, aminoácidos, antagonistas, ácido nucleico, ácidos nucleicos protegidos, ADN, ARN, ADN modificado, ARN modificado, antihistaminas, antibióticos, antígenos, antidepresivos, agentes antihipertensivos, agentes antiinflamatorios, antioxidantes, agentes antiproliferativos, antisentido, agentes antivirales, agentes quimioterapéuticos, co-factores, ácidos grasos, factores de crecimiento, haptenos, hormonas, inhibidores, ligandos, oligonucleótidos, oligonucleótidos marcados, constructos de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, polisacáridos, radioisótopos, esteroides, toxinas, vitaminas y radioisótopos y cualquier combinación de los mismos. Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes quimioterapéuticos que contienen amino tales como daunorubicina, doxorubicina, N-(5,5-diacetoxipentil)doxorubicina, antraciclina, mitomicina C, mitomicina A, 9-amino-camptotecina, aminoptertina, antinomina, N⁸-acetil-espermidina, 1-(2-cloroetil)-1,2-dimetanosulfonil-hidrazina, bleomicina, talisomucina, y derivados de los mismos; agentes quimioterapéuticos que contienen hidroxilo tales como etopósido, camptotecina, irinotecan, topotecan, 9-amino-camptotecina, paclitaxel, docetaxel, esperamicina, 1,8-dihidroxi-biciclo[7.3.1]trideca-4-eno-2,6-diino-13-ona, anguidina, morfolino-doxorubicina, vincristina y vinblastina, y derivados de los mismos, agentes quimioterapéuticos que contienen sulfhidrilo y agentes quimioterapéuticos que contienen carboxilo, así como agentes que contienen platino tales como cisplatino.

Ejemplos de radioisótopos incluyen radioisótopos citotóxicos tales como emisores de radiación β , emisores γ y materiales emisores de radiación α . Ejemplos de emisores de radiación β que son útiles como agentes citotóxicos incluyen isótopos tales como escandio-46, escandio-47, escandio-48, cobre-67, galio-72, galio-73, ytrio-90, rutenio-97, paladio-100, rodio-101, paladio-109, samario-153, renio-186, renio-188, renio-189, oro-198, radio-212 y plomo-212. Los emisores γ más útiles son yodo-131 e indio 114. Otros radioisótopos útiles con la invención incluyen materiales emisores de radiación α tales como bismuto-212, bismuto-213, y At-211 así como emisores de positrones tales como galio-68 y circonio-89.

Ejemplos de toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar como agentes citotóxicos incluyen toxina de cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), toxina shiga, verotoxina, cadena A de ricina, toxina de cadena A de abrina, toxina de cadena A de moadicina A, toxina de α -sarcina, toxina de *Abrus precatorius*, amanitina, proteína antiviral de fitolaca, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

Ejemplos no limitantes de antibióticos incluyen octopirox, eritromicina, cinc, tetraciclina, triclosan, ácido azelaico y sus derivados, fenoxietanol y fenoxiproponol, acetato de etilo, clindamicina y meclociclina; seboestáticos tales como flavinoides; alfa y beta hidroxiaácidos. Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios no esteroideos incluyen oxicamos, tales como piroxicam, isoxicam, tenoxicam, sudoxicam, y CP-14,304; salicilatos, tales como aspirina, disalcid, benorilato, trilisato, safaprina, solprina, diflunisal, y fendosal; derivados de ácido acético, tales como diclofenaco, fenclofenaco, indometacina, sulindaco, tolmetina, isoxepaco, furofenaco, tiopinaco, zidometacina, acematacina, fentiazaco, zomepiraco, clindanaco, oxepinaco, felbinaco, y ketorolaco; fenamatos, tales como ácidos mefenámico, meclufenámico, flufenámico, niflúmico, y tolfenámico; derivados de ácido propiónico, tales como ibuprofeno, naproxeno, benoxaprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, fenbufeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, miroprofeno, tioxaprofeno, suprofeno, alminoprofeno, y tiaprofenico; pirazoles, tales como fenilbutazona, oxifenbutazona, feprazona, azapropazona, y trimetazona.

Ejemplos no limitantes de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, sin limitación, corticosteroides tales como hidrocortisona, hidroxiltriamicinolona, alfa-metil-dexametasona, dexametasona-fosfato, beclometasona dipropionatos, clobetasol valerato, desonida, desoximetasona, desoxicorticosterona acetato, dexametasona, diclorisona, diflorasona diacetato, diflucortolona valerato, fludrenolona, fluclorolona acetónido, fludrocortisona, flumetasona pivalato, fluosinolona acetónido, flucinonida, flucortina butilésteres, flucortolona, fluprednido (fluprednilideno) acetato, flurandrenolona, halcinonida, hidrocortisona acetato, hidrocortisona butirato, metilprednisolona, triamicinolona acetónido, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, difluorasona diacetato, fluradrenolona, fludrocortisona, difluorasona diacetato, fluradrenolona acetónido, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el resto de sus ésteres, clorprednisona, clorprednisona acetato, clocortelona, clescincinolona, diclorisona, difluprednato, fluclorolona, flunisolido, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, hidrocortisona valerato, hidrocortisona ciclopentilpropionato, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, beclometasona dipropionato, triamicinolona, y mezclas de los mismos.

5 Ejemplos no limitantes de antioxidantes incluyen ácido ascórbico (vitamina C) y sus sales, ésteres de ascorbilo de ácidos grasos, derivados de ácido ascórbico (p.ej., ascorbilfosfato de magnesio, ascorbilfosfato de sodio, sorbato de ascorbilo), tocoferol (vitamina E), sorbato de tocoferol, acetato de tocoferol, otros ésteres de tocoferol, ácidos hidroxibenzoicos butilados y sus sales, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (disponible en el mercado bajo el nombre comercial Trolox^R), ácido gálico y sus ésteres de alquilo, especialmente galato de propilo, ácido úrico y sus sales y ésteres de alquilo, ácido sórbico y sus sales, ácido lipoico, aminas (p.ej., N,N-dietilhidroxilamina, amino-guanidina), compuestos de sulfhidrilo (p.ej., glutatión), ácido dihidroxifumárico y sus sales, licina pidolato, arginina pilolato, ácido nordihidroguaiarético, bioflavonoides, curcumina, lisina, metionina, prolina, superóxido dismutasa, silimarina, extractos de té, extractos de la piel/semilla de uva, melanina, y extractos de romero.

15 Ejemplos no limitantes de vitaminas incluyen vitamina A y sus análogos y derivados: retinol, retinal, palmitato de retinilo, ácido retinoico, tretinoína, iso-tretinoína (conocidos colectivamente como retinoides), vitamina E (tocoferol y sus derivados), vitamina C (ácido L-ascórbico y sus ésteres y otros derivados), vitamina B₃ (niacinamida y sus derivados), alfa-hidroxiácidos (tales como ácido glicólico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, etc.) y betahidroxiácidos (tales como ácido salicílico y similares).

20 Ejemplos no limitantes de hormonas incluyen compuestos androgénicos y compuestos de progestina tales como metiltestosterona, androsterona, androsterona acetato, androsterona propionato, androsterona benzoato, androsteronadiol, androsteronadiol-3-acetato, androsteronadiol-17-acetato, androsteronadiol 3-17-diacetato, androsteronadiol-17-benzoato, androsteronadiona, androstenodiona, androstenodiol, dehidroepiandrosterona, dehidroepiandrosterona sulfato de sodio, dromostanolona, dromostanolona propionato, etilestrenol, fluoximesterona, nandrolona fenpropionato, nandrolona decanoato, nandrolona furilpropionato, nandrolona ciclohexano-propionato, nandrolona benzoato, nandrolona ciclohexanecarboxilato, androsteronadiol-3-acetato-1-7-benzoato, oxandrolona, oximetolona, estanozolol, testosterona, testosterona decanoato, 4-dihidrotestosterona, 5 α -dihidrotestosterona, testolactona, 17 α -metil-19-nortestosterona y ésteres farmacéuticamente aceptables y sales de los mismos, y combinaciones de cualquiera de los anteriores, desogestrel, didrogesterona, etinodiol diacetato, medroxiprogesterona, levonorgestrel, medroxiprogesterona acetato, hidroxiprogesterona caproato, noretindrona, noretindrona acetato, noretinodrel, alilestrenol, 19-nortestosterona, linoestrenol, quingestanol acetato, medrogestona, norgestriena, dimethisterona, etisterona, ciproterona acetato, clormadinona acetato, megestrol acetato, norgestimato, norgestrel, desogestrel, trimegestona, gestodeno, nomegestrol acetato, progesterona, 5 α -pregnan-3 β ,20 α -diol sulfato, 5 α -pregnan-3 β ,20 β -diol sulfato, 5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona, 16,5 α -pregnen-3 β -ol-20-ona, 4-pregnen-20 β -ol-3-ona-20-sulfato, acetoxipregnenolona, anagestona acetato, ciproterona, dihidrogesterona, flurogestona acetato, gestadeno, hidroxiprogesterona acetato, hidroximetilprogesterona, hidroximetilprogesterona acetato, 3-cetodesogestrel, megestrol, melengestrol acetato, noretisterona y mezclas de los mismos.

35 Ligandos, inhibidores, agonistas, antagonistas, co-factores y similares se pueden seleccionar según una indicación específica.

40 Según un aspecto preferido, el agente terapéuticamente eficaz es un material genético, a saber, un agente de ácido nucleico, que incluye oligonucleótidos, polinucleótidos (ácidos nucleicos), antisentido y oligonucleótidos productores de antisentido como se define estos en la presente memoria, cromosomas y constructos de ácidos nucleicos tales como plásmidos. Tales sustancias genéticas se denominan colectivamente en la presente memoria agentes de ácido nucleico o oligonucleótidos.

45 El término "plásmido" se refiere a una unidad circular, de doble hebra de ADN que se replica dentro de una célula independientemente del ADN cromosómico. Se encuentran plásmidos muy a menudo en bacterias, y se usan en investigación de ADN recombinante para transferir genes entre células, usadas como vector para inserción de genes o usos de ingeniería genética. Los plásmidos son a menudo el sitio de genes que codifican para resistencia a los antibióticos.

El término "cromosoma", como se emplea en la presente memoria, describe pequeños cuerpos en el núcleo de una célula que llevan las "instrucciones" químicas para la reproducción de la célula, y consisten en ADN de doble hebra envuelto en hélices alrededor de un núcleo de proteínas. Cada especie de planta o animal tiene un número característico de cromosomas (46 en los seres humanos).

50 El término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de hebra única o de doble hebra de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de bases existentes en la naturaleza, azúcares y enlaces internucleósido covalentes (p.ej., cadena principal) así como oligonucleótidos que tienen porciones no existentes en la naturaleza que funcionan de manera similar. El término incluye ARN modificado o ADN modificado. En otro aspecto el ARN y/o ADN modificados incluyen bases protegidas.

55 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "un polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es aislada y provista en la forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido complementaria (cADN), una secuencia de polinucleótido genómica y/o secuencias de polinucleótidos compuestas (p.ej., una combinación de los anteriores).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "secuencia de polinucleótido complementaria" se refiere a una secuencia, que resulta de transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. Tal secuencia puede ser amplificada posteriormente in vivo o in vitro usando una ADN polimerasa dependiente de ADN.

- 5 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "secuencia de polinucleótido genómico" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y por tanto representa una porción contigua de un cromosoma.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "secuencia de polinucleótido compuesta" se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. Una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exonales requeridas para codificar el polipéptido de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas que se interponen entre el mismo. Las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes, y típicamente incluirán secuencias de señales divisoras conservadas. Tales secuencias intrónicas pueden incluir además elementos regulatorios de expresión cis actuantes.

Alternativamente, los oligonucleótidos pueden incluir pequeños oligonucleótidos dúplex interfirientes [es decir, ARN interfiriente pequeño (siRNA)], que dirigen la degradación específica de secuencia de mRNA mediante el mecanismo descrito previamente de interferencia de ARN (RNAi) [Hutvagner y Zamore (2002) Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232].

Como se emplea en la presente memoria, la frase "oligonucleótido dúplex" se refiere a una estructura de oligonucleótido o miméticos de la misma, que se forma bien por una única hebra de ácido nucleico autocomplementaria o bien por al menos dos hebras de ácido nucleico complementarias. El oligonucleótido dúplex de la presente invención puede estar compuesto de ARN de doble hebra (dsARN), un híbrido ADN-ARN, ARN de hebra única (ssARN), ARN aislado (es decir, ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro), ARN sintético y ARN producido de manera recombinante.

Un oligonucleótido dúplex interfiriente pequeño puede ser un oligorribonucleótido compuesto principalmente de ácidos ribonucleicos.

- 25 Se proporcionan instrucciones para la generación de oligonucleótidos dúplex capaces de mediar la interferencia de ARN en www.ambion.com.

Los constructos de ácidos nucleicos son sustancias que permiten la expresión celular de polinucleótidos, e incluyen típicamente un polinucleótido o un oligonucleótido y al menos un elemento regulatorio de actuación cis. Como se emplea en la presente memoria, la frase "elemento regulatorio de actuación cis" se refiere a una secuencia de polinucleótido, preferiblemente un promotor, que se une a un regulador de actuación trans y regula la transcripción de una secuencia codificante ubicada corriente abajo del mismo.

Los ejemplos de promotores específicos a tipos de células y/o específicos a tejidos incluyen promotores tales como albúmina que es específica al hígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], promotores específicos linfoides [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; en particular promotores de receptores de células T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos a neuronas tales como el promotor del neurofilamento [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], promotores específicos al páncreas [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] o promotores específicos a glándulas mamarias tales como el promotor del suero de leche (patente de EE.UU. N° 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea N° 264.166). El constructo de ácido nucleico puede incluir además un potenciador, que puede estar adyacente o distante de la secuencia del promotor y puede funcionar en la regulación en ascenso de la transcripción del mismo.

El constructo de ácido nucleico puede incluir además un marcador seleccionable apropiado y/o un origen de replicación. Preferiblemente, el constructo de ácido nucleico utilizado es un vector lanzadera, que puede propagarse tanto en E. coli (en donde el constructo comprende un marcador seleccionable apropiado y origen de replicación) y ser compatible para la propagación en células, o integración en un gen y un tejido de elección. El constructo según la presente invención puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

Los ejemplos de constructos adecuados incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, PzeoSV2 (+/-), pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto cada uno de los cuales está disponible en el mercado en Invitrogen Co. (www.invitrogen.com). Los ejemplos de vector retroviral y sistemas de empaquetado son los comercializados por Clontech, San Diego, Calif., incluyendo los vectores Retro-X pLNCX y pLXSN, que permiten la clonación en múltiples sitios de clonación, y el trasgen es transcrito a partir del promotor CMV. También están incluidos vectores derivados de Mo-MuLV, tales como pBabe, donde el trasgen será transcrito a partir del promotor 5'LTR.

El término "antisentido", como se emplea en el contexto de la presente invención, es de, o relacionado con, una secuencia de nucleótido que es complementaria a una secuencia de ARN mensajero. Cuando se añade ADN o ARN antisentido a una célula, se une a una molécula de ARN mensajero específica y la inactiva, por tanto puede ser una herramienta útil para terapia génica.

Los antisentidos también pueden incluir moléculas antisentido, que son moléculas quiméricas. Las "moléculas antisentido quiméricas" son oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en donde el oligonucleótido está modificado para conferir al oligonucleótido una resistencia aumentada a la degradación por nucleasa, absorción celular aumentada, y/o afinidad de unión aumentada para el polinucleótido diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. Un ejemplo para tal incluye RNasa H, que es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión del ARN diana, potenciando en gran medida de este modo la eficacia de la inhibición de oligonucleótido de expresión de genes. Por consiguiente, se pueden obtener a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que hibridan a la misma región diana. La escisión del ARN diana puede ser detectada de manera rutinaria por electroforesis en gel, y, si fuera necesario, por técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

Se pueden formar moléculas antisentido quiméricas como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, como se describe anteriormente. Las patentes de EE.UU. representativas que muestran la preparación de tales estructuras híbridas incluye, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. Nos. 5.013.830; 5.149.797.

La incorporación de los agentes genéticos terapéuticamente activos descritos anteriormente en los sistemas de entrega acordes con la presente invención es sumamente beneficiosa, dado que (i) como se discutió en detalle anteriormente, tales agentes se pueden usar beneficiosamente para tratar afecciones médicas interfiriendo con la causa de la afección en lugar de con los síntomas; y (ii) el uso de tales agentes en aplicaciones in vivo está limitado por su escasa resistencia al entorno biológico. Por tanto, incorporando tales agentes en los sistemas de entrega descritos en la presente memoria, se consigue una eficaz y rápida entrega de los mismos a las células y núcleos de las células, venciendo por tanto las limitaciones asociadas con la rápida eliminación de los mismos.

Otros agentes terapéuticamente activos preferibles que se pueden usar eficazmente como restos biológicamente activos entregados por el sistema de entrega incluyen aminoácidos, péptidos y polipéptidos (proteínas).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "resto marcador" se refiere a un resto detectable, una etiqueta o una sonda que se puede usar en la diagnosis y seguimiento de afecciones médicas tanto in vitro como in vivo, e incluye, por ejemplo, cromóforos, compuestos fosforescentes y fluorescentes, clústers de metales pesados, compuestos marcadores radioactivos (radiomarcados), así como cualesquiera otros restos detectables conocidos.

Como se emplea en la presente memoria, el término "cromóforo" se refiere a un resto químico que, cuando está unido a otra molécula, hace a esta última coloreada y por tanto visible cuando se aplican diversas medidas espectrofotométricas.

La expresión "compuesto fluorescente" se refiere a un compuesto que emite luz a una longitud de onda específica durante la exposición a radiación de una fuente externa.

La expresión "compuesto fosforescente" se refiere a un compuesto que emite luz sin calor apreciable o excitación externa, como por oxidación lenta del fósforo.

Un clúster de metal pesado puede ser por ejemplo un clúster de átomos de oro usado, por ejemplo, para marcado en técnicas de microscopía electrónica.

Los compuestos radiomarcados pueden ser casi cualquier compuesto en el que esté incorporado un isótopo radioactivo. Un isótopo radioactivo es un elemento que es un emisor de radiación α , un emisor de radiación β o un emisor de radiación γ .

Un ejemplo de un agente terapéuticamente activo que también puede servir como resto marcador es un oligonucleótido radiomarcado en el que, por ejemplo, está incorporado un isótopo de fósforo. Otro ejemplo de un agente terapéuticamente activo que también puede servir como resto marcador es un oligonucleótido al que está unido un cromóforo, un compuesto fluorescente o un compuesto de fluorescencia. Un cromóforo ilustrativo es la Fluoresceína.

Cualquiera de los restos biológicamente activos usados en el contexto de la presente invención puede ser incorporado dentro de o sobre diversos vehículos tales como, pero no limitados a, liposomas, nanopartículas, micropartículas y polímeros, que están unidos al resto de entrega.

Los liposomas son vesículas microscópicas artificiales que consisten en un núcleo acuoso encerrado en una o más capas de fosfolípidos, usado para transportar vacunas, fármacos, enzimas u otras sustancias a células u órganos diana.

Una nanopartícula o una micropartícula es una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros o micrómetros, que se puede usar en aplicaciones biomédicas actuando como vehículos de fármacos o agentes para toma de imágenes.

- 5 Aunque, como se muestra en la Fórmula I y II generales, el sistema de entrega puede tener cuatro grupos reactivos a los que está unido el resto biológicamente activo, los conjugados descritos en la presente memoria comprenden, en una realización, dos restos biológicamente activos. En otro aspecto, los conjugados de Fórmula II comprenden cuatro restos biológicamente activos. En otro aspecto, los conjugados de Fórmula II comprenden un resto biológicamente activo. En otro aspecto, los conjugados de Fórmula II comprenden tres restos biológicamente activos. Los restos (T₁-T₄) biológicamente activos pueden ser los mismos (idénticos), similares (de la misma familia de sustancias) o diferentes. En un aspecto, T₁ es un fármaco. En otro aspecto, T₁ es un fármaco, T₂ es una etiqueta fluorescente, y COM1, COM2, T₃ y T₄ no son nada. En otro aspecto, T₁, T₂, T₃ o T₄ es una combinación de un fármaco y una etiqueta fluorescente.

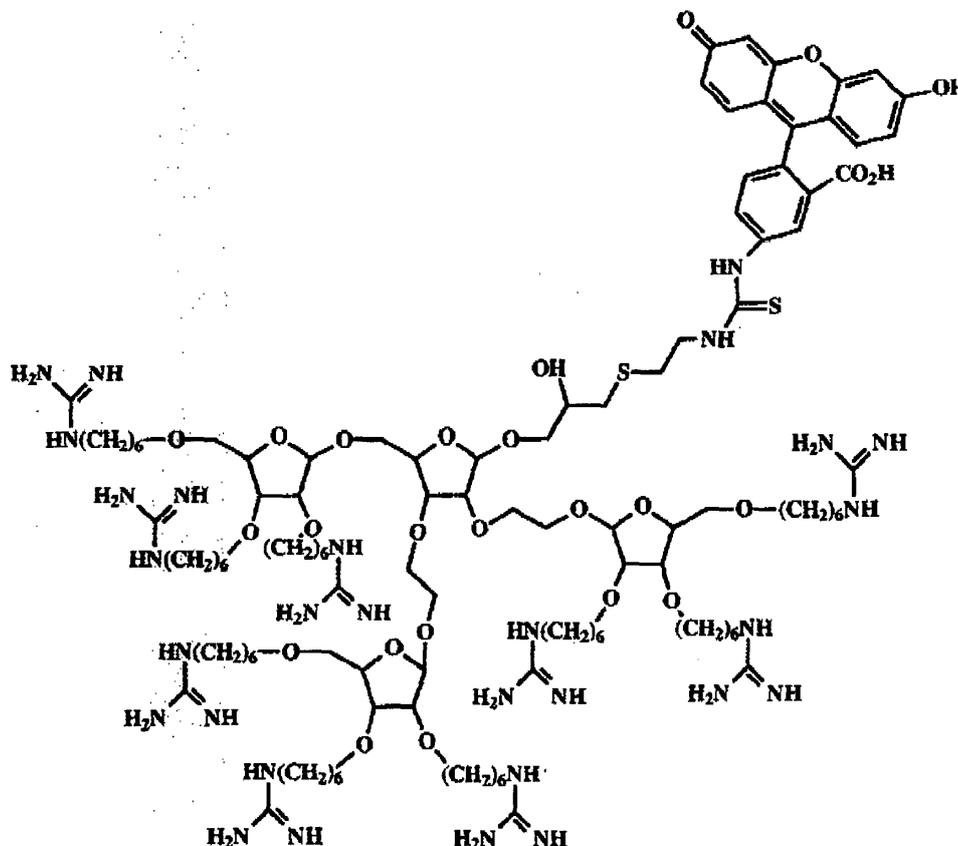
Así, por ejemplo, los restos biológicamente activos pueden incluir un agente terapéuticamente activo y un resto marcador, lo que permitiría la detección de los agentes activos en el cuerpo.

- 15 En una realización preferida de la presente invención, los restos biológicamente activos conjugados con el resto de entrega son oligonucleótidos.

Tales conjugados se pueden formar diseñando un resto de entrega al que puede unirse el extremo 5' y/o el extremo 3' de un oligonucleótido.

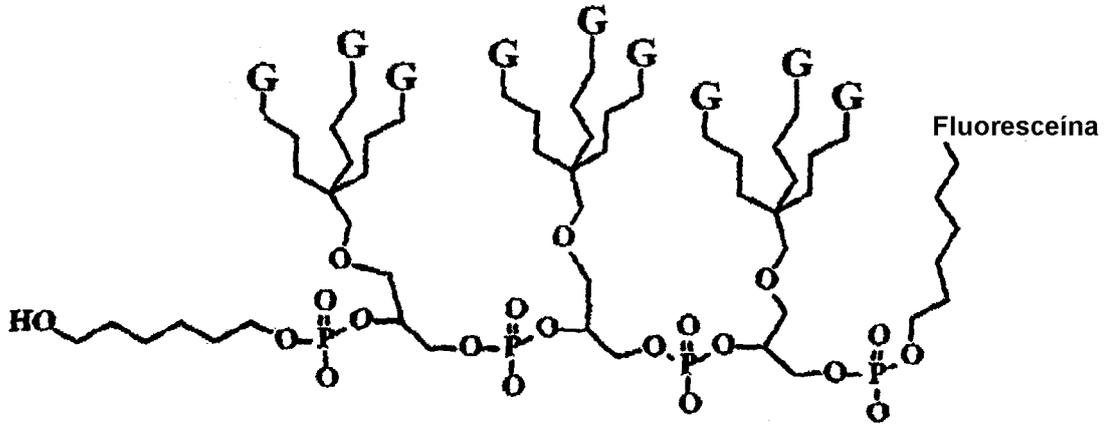
- 20 Como se ilustra en la sección de Ejemplos que sigue, tales restos de entrega han sido diseñados y usado con éxito para proporcionar tales conjugados, seleccionando apropiadamente los bloques constructores, los grupos reactivos y los grupos protectores usados para construir tal conjugado por síntesis en fase sólida y/o síntesis enzimáticas convenientes.

Un conjugado de Fórmula II se presenta mediante la siguiente estructura:



- 25 La D-Ribosa puede ser reemplazada por cualquier otro bloque constructor sacárido, formando cualquier otra cadena principal de azúcar.

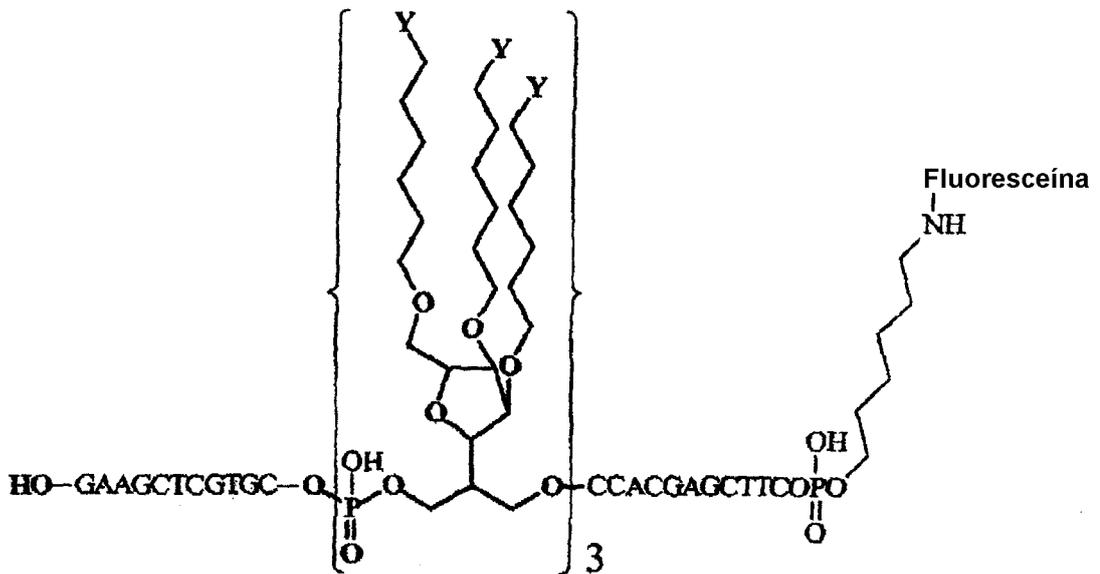
En una realización de la invención, un conjugado de Fórmula II se presenta mediante la estructura del Compuesto 44:



En donde G es un grupo guanidina.

Compuesto 44

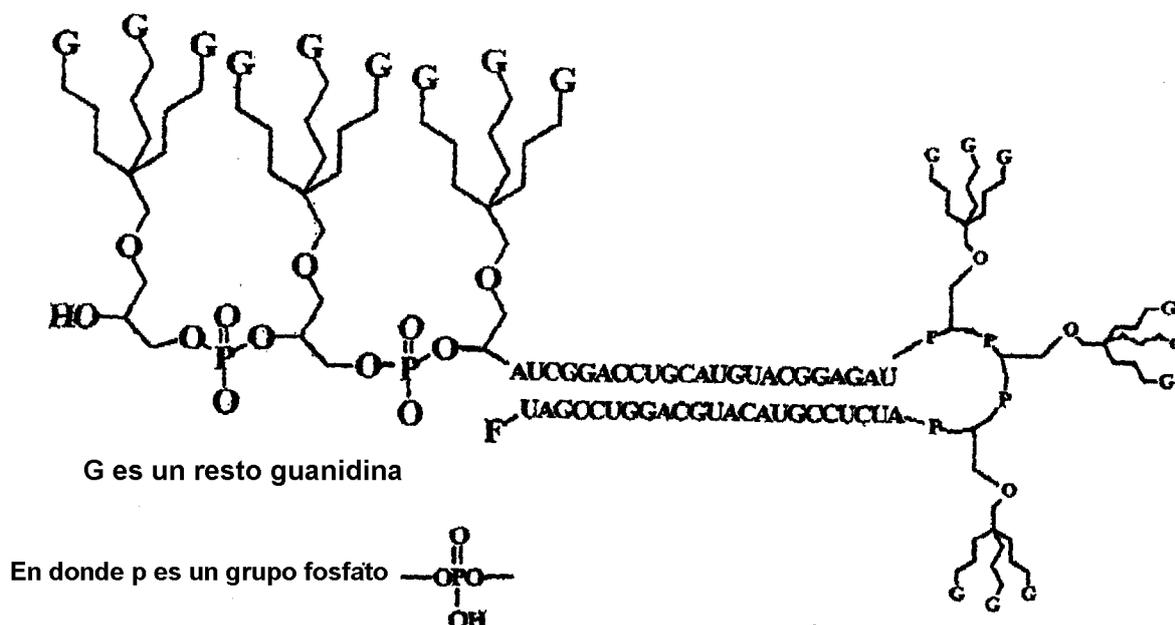
5 En un aspecto, un conjugado de Fórmula II se presenta mediante la estructura del Compuesto 26:



GAAGCTCGTGC (SEQ ID No: 1)

CCACGAGCTTC (SEQ ID No: 2)

En un aspecto, un conjugado de Fórmula II se presenta mediante la estructura del Compuesto 46:



AUCGGACCUGCAUGUACGGAGAU (SEQ ID No: 3) UAGCCUGGACGUAACAUGCCUCUA (SEQ ID No: 4)

5 Un conjugado según este aspecto se puede utilizar beneficiosamente para entregar diversos oligonucleótidos, incluyendo plásmidos, constructos de ácidos nucleicos, antisentidos y ácidos nucleicos, descritos anteriormente, a células.

Los conjugados descritos en la presente memoria, al contener un resto biológicamente activo, se pueden usar eficazmente por tanto para entregar diversos restos biológicamente activos a un sitio corporal deseado. Estos conjugados son particularmente útiles para entregar diversos restos biológicamente activos a células.

10 Métodos para entregar el resto biológicamente activo a la célula

Por tanto, según otro aspecto se proporciona un método para entregar un resto biológicamente activo a una célula. El método efectúa poniendo en contacto células con un conjugado descrito anteriormente en la presente memoria, y preferiblemente con conjugados que incluyen oligonucleótidos y/o agentes de ácidos nucleicos, descritos anteriormente en la presente memoria.

15 Poner en contacto las células con el conjugado se puede efectuar bien in-vivo o bien ex-vivo. Cuando se realiza ex-vivo, las células pueden ser puestas en contacto con el conjugado incubando las células con una solución que contiene el conjugado y un tampón, a una temperatura que está en el intervalo de 4 °C a 37 °C.

20 En un aspecto preferido, la célula puede ser una célula animal que es mantenida en un cultivo tisular, tal como líneas celulares que están inmortalizadas o transformadas. Estas incluyen varias líneas celulares que se pueden obtener en American Type Culture Collection (Bethesda) tales como, pero no limitadas a: células 3T3 (fibroblasto de ratón), células Rat1 (fibroblasto de rata), células CHO (ovario de hámster chino), células CV-1 (riñón de mono), células COS (riñón de mono), células 293 (riñón embrionario humano), células HeLa (carcinoma cervical humano), células HepG2 (hepatocitos humanos), células Sf9 (epiteliales de ovario de insecto) y similares.

25 En otro aspecto preferido, la célula puede ser una célula primaria o secundaria, lo que significa que la célula ha sido mantenida en cultivo durante un tiempo relativamente corto después de ser obtenida de un animal. Estas incluyen, pero no se limitan a, células de hígado primarias y células musculares primarias y similares. Las células dentro del tejido son separadas por molienda y digestión con enzimas tales como tripsina o colagenasas que destruyen la matriz extracelular. Los tejidos consisten en varios tipos de células diferentes, y se pueden usar métodos de purificación tales como centrifugación en gradiente o clasificación por anticuerpos para obtener cantidades purificadas del tipo celular preferido. Por ejemplo, los mioblastos primarios son separados de fibroblastos contaminantes usando centrifugación en gradiente de Percoll (Sigma).

30

En otro aspecto preferido, la célula puede ser una célula animal que está dentro del tejido in situ o in vivo, lo que significa que la célula no ha sido retirada del tejido o el animal. Cuando se realiza in-vivo, poner en contacto las células con el conjugado se puede efectuar administrando el compuesto a un sujeto necesitado del mismo.

Los conjugados descritos en la presente memoria se pueden administrar o utilizar de otro modo según los diversos aspectos de la presente invención, bien per se o bien como parte de una composición farmacéutica.

Composición farmacéutica

5 Así, según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende el conjugado, descrito en la presente memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se emplea en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los conjugados descritos en la presente memoria, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables y adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

10 En lo sucesivo, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y no suprime la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Son ejemplos, sin limitaciones, de vehículos: propilenglicol, suero salino, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua, así como vehículos sólidos (p.ej., en polvo) y gaseosos.

15 En la presente memoria el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Se pueden encontrar técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

20 En un aspecto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar por procedimientos bien conocidos en la técnica, p.ej., por medio de procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, molienda en húmedo, emulsión, encapsulación, atrapado o liofilización.

25 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente descripción se pueden formular por tanto de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los conjugados en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada es dependiente de la ruta de administración elegida.

Para inyección, los conjugados descritos en la presente memoria se pueden formular en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de suero salino fisiológico con o sin disolventes orgánicos tales como propilenglicol, polietilenglicol.

30 Para administración transmucosal, se usan penetrantes en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

35 Para administración oral, los conjugados descritos en la presente memoria se pueden formular fácilmente combinando los conjugados con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los conjugados de la invención se formen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla en gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

45 Los núcleos de grageas son dotados de revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis activas de los conjugados.

50 Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas, hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con cargas tales como lactosa, ligantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los conjugados pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para
55 administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la ruta de administración elegida.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de manera convencional.

5 Los conjugados descritos en la presente memoria se pueden formular para administración parenteral, p.ej., por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p.ej., en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formulatorios tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

10 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación del conjugado en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los conjugados como suspensiones y emulsiones oleosas para inyección apropiadas (p.ej., emulsiones agua en aceite, aceite en agua o agua en aceite en aceite). Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede
15 contener estabilizantes o agentes adecuados, que aumentan la solubilidad de los conjugados para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, los conjugados pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, p.ej., agua estéril apirogénica, antes del uso.

20 Los conjugados descritos en la presente memoria también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, p.ej., bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

25 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos de fase gel. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en el contexto de la presente descripción incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de conjugados eficaz para prevenir, aliviar o mitigar los síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se trata.

30 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

35 Para cualesquiera conjugados usados en el contexto de la descripción, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos de actividad en animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluya el IC₅₀ determinado por ensayos de actividad. Tal información se puede usar para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

40 La toxicidad y eficacia terapéutica de los conjugados descritos en la presente memoria puede ser determinada por procedimientos farmacéuticos estándar en animales experimentales, p.ej., determinando el EC₅₀, el IC₅₀ y el LD₅₀ (dosis letal que causa la muerte en el 50 % de los animales ensayados) para un conjugado en cuestión. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de actividad y estudios con animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para el uso en el ser humano.

La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación, ruta de administración y dosificación exactas pueden ser elegidas por el médico individual a la vista del estado del paciente. (Veáse p.ej., Fingl et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

45 La cantidad e intervalo de la dosificación pueden ser ajustados individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo que sean suficientes para mantener los efectos deseados, denominado concentración mínima eficaz (MEC). La MEC variará para cada preparación, pero puede ser estimada a partir de datos in vitro; p.ej., la concentración necesaria para conseguir un 50-90 % de vasorelajación de arterias contraídas. Las dosificaciones necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características del individuo y la ruta de administración. Se
50 pueden usar ensayos de HPLC o bioensayos para determinar concentraciones en plasma.

Los intervalos de dosificación también se pueden determinar usando el valor MEC. Las preparaciones deben ser administradas usando un régimen, que mantiene los niveles en plasma por encima de la MEC para el 10-90 % del tiempo, preferiblemente entre 30-90 % y lo más preferiblemente 50-90 %.

55 La cantidad de una composición a ser administrada será dependiente, por supuesto, del sujeto que se trata, la gravedad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico prescriptor, etc.

Las composiciones de la presente invención se pueden presentar, si se desea, en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA (la Administración de Alimentos y Fármacos de EE.UU.), que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, papel de metal o plástico, tal como, pero no limitado a, un paquete "blister" o un recipiente presurizado (para inhalación). El paquete o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración. El paquete o dispensador también puede estar acompañado de una nota asociada con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, nota que refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones para administración humana o veterinaria. Tal nota, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de EE.UU. para fármacos de prescripción o de un inserto de producto aprobado. También se pueden preparar composiciones que comprenden un conjugado como los descritos en la presente memoria formulado en un vehículo farmacéutico compatible, ser colocadas en un recipiente apropiado, y etiquetadas para el tratamiento de una afección o diagnosis indicada, dependiendo del resto biológico usado.

Por tanto, según un aspecto de la presente descripción, dependiendo de los componentes seleccionados de los conjugados, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son envasadas en un material de envasado e identificadas de manera impresa, dentro o sobre el material de envasado, para el uso en el tratamiento de una afección en la que la entrega del resto biológico a una cierta diana corporal es beneficiosa. Tales afecciones incluyen, por ejemplo, cualesquiera afecciones médicas en las que la administración intracelular del resto activo es terapéuticamente o diagnósticamente beneficiosa.

Como se mencionó anteriormente, el diseño de los conjugados descritos en la presente memoria se hizo mientras se tomaban en consideración las condiciones en las que tales conjugados pueden ser ensamblados, a la vista de la relativamente alta reactividad e inestabilidad de al menos algunos de los componentes de los mismos. Por tanto, se han desarrollado métodos de síntesis especiales para ese fin, como sigue.

Según aspectos adicionales de la presente descripción, se proporcionan procedimientos para preparar los conjugados y los bloques constructores descritos en la presente memoria. En un aspecto se prepara un conjugado del Compuesto 17 según el esquema de síntesis presentado en la Figura 1 y el Ejemplo 1. En una realización de la invención, se prepara un conjugado del Compuesto 44 según el esquema de síntesis presentado en la Figura 2 y el Ejemplo 4.

Llegarán a ser evidentes objetos adicionales, ventajas y rasgos nuevos de la presente invención para un experto habitual en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención delineada anteriormente y reivindicada en la sección de las reivindicaciones más adelante encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de un modo no limitante.

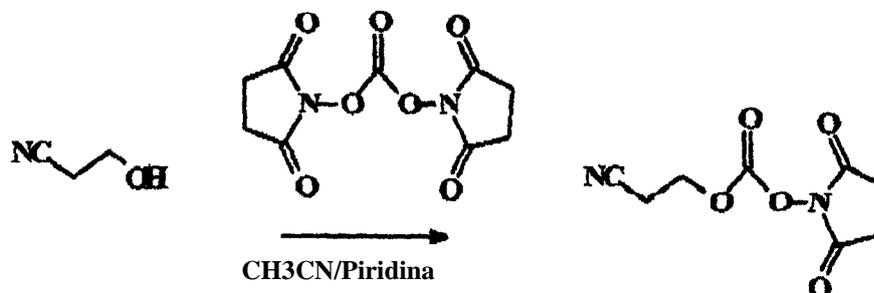
De manera general, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican de manera extensa en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986). Se proporcionan otras referencias generales a largo de todo este documento. Se cree que los procedimientos en las mismas son bien conocidos en la técnica, y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información contenida en las mismas se incorpora en la presente memoria por referencia.

45

Ejemplo 1

Todos los compuestos se adquirieron en Aldrich.

Preparación de N-(2-cianoetoxicarboniloxi)succinimida (CEOC-O-Succinimida:

5 **Compuesto 1**

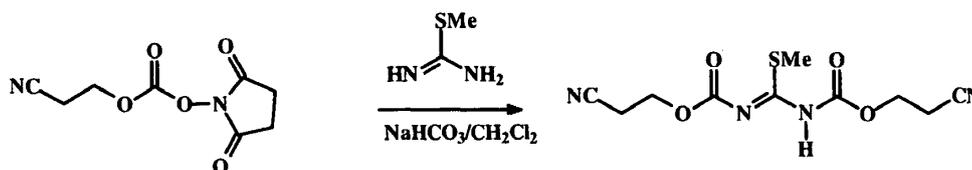
A una disolución agitada de 2-cianoetanol (7,23 gramos, 102 mmol) en CH_3CN anhidro (300 ml), en atmósfera de argón, se añadió carbonato de N,N'-disuccinimidilo (34,0 gramos, 133 mmol), seguido de la adición de piridina (11,3 ml, 140 mmol). La suspensión resultante se agitó, y se convirtió en una disolución transparente después de aproximadamente 1 hora. La disolución se agitó durante 6 horas adicionales, y después se concentró a presión reducida. El residuo se redisolvió en diclorometano (200 ml), y se lavó con una disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 50 ml) y una disolución saturada de NaCl (3 x 50 ml). Después se secó la capa orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró para dar el producto bruto como un sólido blanco. Las trazas de piridina se retiraron del producto bruto por co-evaporación con acetonitrilo seco. El sólido blanco obtenido se secó durante una noche a presión reducida y después se trituró con éter (150 ml) para dar 20,23 gramos (94 % de rendimiento) del Compuesto 1 parcialmente purificado como un polvo amorfo incoloro. El producto parcialmente purificado fue estable a temperatura ambiente, cuando se almacenó en desecadores durante un periodo extenso (1-2 años). Los espectros de NMR de protones y de carbono mostraron que el compuesto parcialmente purificado es homogéneo. Se realizó una purificación adicional del producto por cromatografía en gel de sílice usando una mezcla 50:50 de CH_2Cl_2 :EtOAc como eluyente, para dar el Compuesto 1 puro como un compuesto cristalino blanco (18,72 gramos, 87 % de rendimiento).

20 TLC: (50:50 CH_2Cl_2 :EtOAc) $R_f=0,21$;

p.f. = 105,5° C;

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2,85 (t, $J=6,62$ Hz, 2H), 2,86 (s, 4H), 4,45 (t, $J=5,96$ Hz).

Preparación de N,N'-bis-CEOC-2-metil-2-tiopseudourea 2-Metil-2-tiopseudourea (Compuesto 2):

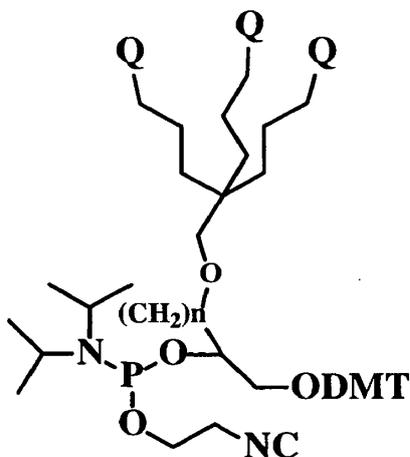
25 **Compuesto 2**

Se suspendió hemisulfato de S-metilisotiourea (5,29 gramos, 38,0 mmol) en CH_2Cl_2 (250 ml) y una disolución saturada de NaHCO_3 (250 ml). Se añadió cianoetoxicarboniloxisuccinimida (Compuesto 1, 20,2 gramos, 95,3 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 2 horas. Después, se separó la fase orgánica, la fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 200 ml) y la fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó. El producto bruto se purificó por cromatografía de desarrollo rápido usando AcOEt/DCM 95:5 como eluyente, para dar el Compuesto 2 (3,78 gramos, 35 % de rendimiento) como un sólido blanco.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 11,80 (s ancho, 1H), 4,39 (q, 4H), 2,80 (t, 4H), 2,45 (s, 3H).

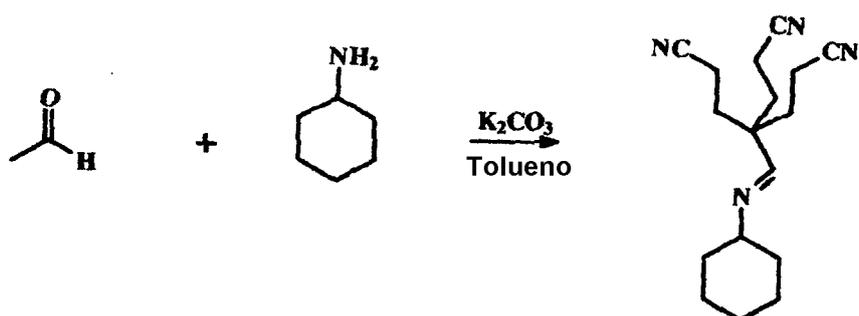
Ejemplo 3

Preparación del Compuesto (XIa) y otros compuestos oligoméricos de base heterocíclica.



Compuesto XI

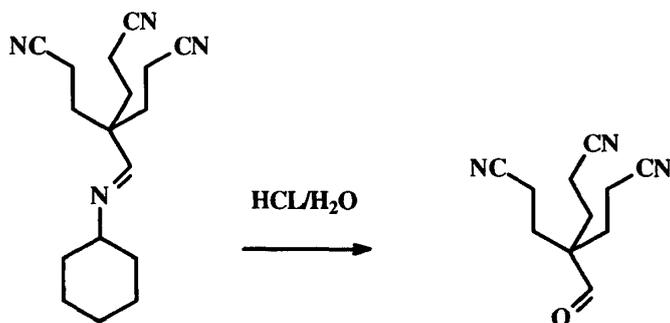
5 Preparación del Compuesto 27



Compuesto 27

10 Se añadió lentamente acetaldehído (16,9 ml) a una disolución de ciclohexilamina (34,3 g, 0,3 mmol) en tolueno seco (15 ml) a 0 °C, a lo largo de 20 min. Se añadió carbonato de potasio (2,5 g) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min y después se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. La capa orgánica se puso en un autoclave y se añadió acrilonitrilo (68,5 ml). La disolución se agitó durante 6 horas a 160 °C. La mezcla de reacción negra se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió en éter (800 ml). El precipitado (es decir, el Compuesto 27) se filtró y se lavó con éter para dar 40 gramos (sólido amarillo, 48 %), que se usó sin purificación adicional. Pf: 99 °C.

Preparación del Compuesto 28:



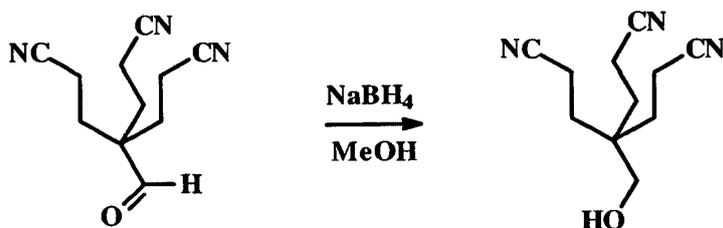
Compuesto 28

15

Se disolvió el Compuesto 27 (10 g, 35,2 mmol) en una disolución de HCl concentrado (5 ml) y agua (130 ml). La mezcla resultante se llevó a reflujo durante 30 min, se filtró en caliente y se dejó enfriar hasta 0°C. El precipitado amarillo (es decir, el Compuesto 28) se recogió, se lavó con agua, se secó y se purificó por recristalización a partir de metanol, dando cristales blancos (6,6 g, 92 %).

5 P.f. 108 °C. Rf - 0,49 en (Acetato de etilo 2: 1 Hexano)

Preparación del Compuesto 29:



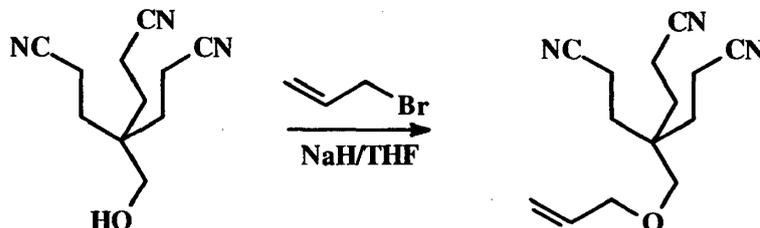
Compuesto 29

10 Se añadió NaBH₄ (1,5 g) a una disolución del Compuesto 28 (5 g, 24,6 mmol) en metanol seco (250 ml) en atmósfera de argón a 0°C en 30 min. La disolución se agitó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Se añadió agua (50 ml) y la mezcla resultante se enfrió hasta 0°C y después se aciduló con HCl concentrado hasta pH 1. Se evaporó el metanol y el producto se extrajo con diclorometano (3x75 ml), los extractos combinados se secaron con sulfato de sodio anhidro. El disolvente se retiró para dar el producto (es decir, el Compuesto 29) como un material cristalino blanco (4,6 g, 92 %).

15 Pf: 69 °C. Rf - 0,31 en (Acetato de etilo 2: 1 Hexano).

H¹ NMR- (CDCl₃): δ 1,68 (m, 6H), 2,45 (m, 6H), 3,30 (s, 2H), 4,83 (s, 1H).

Preparación del Compuesto 30:



Compuesto 30

20 Se añadió gota a gota una disolución del Compuesto 29 (10 g, 48,8 mmol) en tetrahidrofurano seco (70 ml) a una mezcla en suspensión de NaH al 60% (2,34 g, 58,5 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) a temperatura ambiente durante 40 minutos. A la mezcla de reacción en suspensión, se añadió gota a gota bromuro de alilo (13 ml, 146 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 3 horas y agitación continua a temperatura ambiente durante 16 horas.

25 Después de esto, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida, el residuo se extrajo con acetato de etilo (250 ml), salmuera (200 ml), y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró por evaporador rotatorio hasta una espuma. El producto (es decir, el Compuesto 30) se purificó por cromatografía en columna sobre una columna de gel de sílice neutralizado, usando un gradiente lineal de hexano 100% a (Acetato de etilo 1: 1 Hexano). Dando 11 gramos (92 %) de un aceite amarillento.

30 Rf - 0,38 en (Acetato de etilo 1: 1 Hexano)

H¹ NMR- (CDCl₃): δ 1,73 (m, 6H), 2,36 (m, 6H), 3,21 (2H), 3,94 (m, 2H), 5,24 (m, 2H), 5,83 (m, 1H).

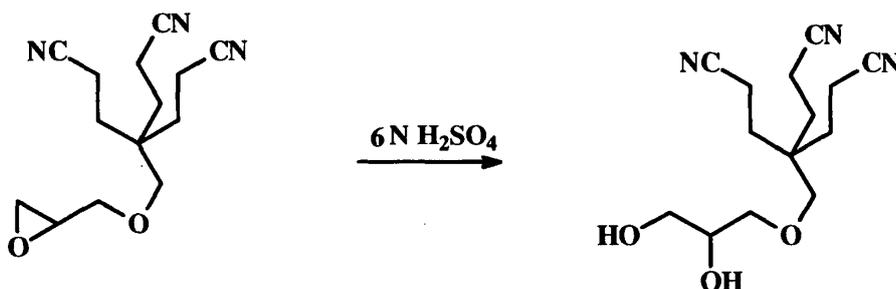
Preparación del Compuesto 31:



Compuesto 31

5 A una disolución fría (0°C) del Compuesto 30 (5 g, 20,4 mmol) en diclorometano (100 ml), se añadió gota a gota una disolución de ácido meta-cloroperbenzoico (77%, 5,49 g, 24,48 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Esta disolución se extrajo con bisulfito saturado (20 ml) seguido de lavados con bicarbonato de sodio saturado (100 ml), agua y con salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró por evaporador rotatorio hasta un aceite. El producto (es decir, el Compuesto) se purificó por cromatografía en columna sobre una columna de gel de sílice neutralizado, usando (Acetato de etilo 1: 1 Hexano) como eluyente, dando (4,93 g, 92 %). Rf - 0,16 en (Acetato de etilo 1: 1 Hexano).

Preparación del Compuesto 32:



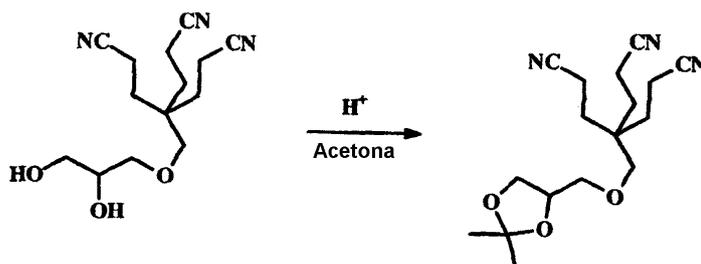
Compuesto 32

15 A una disolución del Compuesto 31 (3,2 g, 12,24 mmol) en dioxano (100 ml), agua (50 ml) y acetonitrilo se añadió una disolución de ácido sulfúrico 6N (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, seguido de neutralización con una disolución saturada de bicarbonato de sodio hasta pH 7,8. Después de esto la mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida, el residuo se extrajo con acetato de etilo (250 ml), salmuera (200 ml), y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró por evaporador rotatorio hasta una espuma. El producto (es decir, el Compuesto 32) se purificó por cromatografía en columna sobre una columna de gel de sílice neutralizado, usando Acetato de etilo como eluyente. Dando (3,31 gramos, 96%) de un aceite.

Rf - 0,25 en (Acetato de etilo).

$^1\text{H NMR}$ - (CDCl_3): δ 1,68 (m, 6H), 2,45 (m, 6H), 3,30 (s, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,59 (m, 2H), 3,78 (m, 1H).

Preparación del Compuesto 33:



Compuesto 33

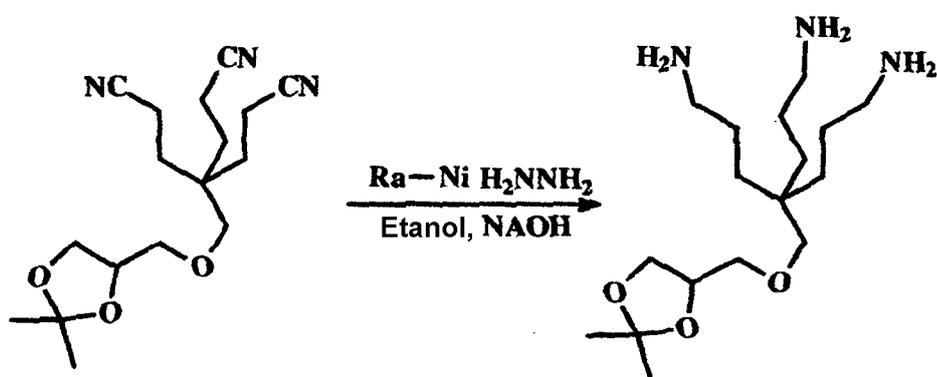
25

5 A una disolución del Compuesto 32 (10,31 g, 36,9 mmol) en acetona seca (100 ml) y dimetoxipropano (100 ml), se añadió ácido para-toluenosulfónico (300 mg) y sulfato de sodio anhidro (10 gramos). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se filtró y se neutralizó con una disolución saturada de bicarbonato de sodio hasta pH 7,5. Después de esto la mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida, el residuo se extrajo con acetato de etilo (250 ml), salmuera (200 ml), y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró por evaporador rotatorio hasta un aceite. El producto (es decir, el Compuesto 33) se purificó por cromatografía en columna sobre una columna de gel de sílice neutralizado, usando Acetato de etilo como eluyente. Dando (9,59 gramos, 81,4%) de un aceite.

Rf - 0,72 en (Acetato de etilo).

10 $^1\text{H NMR}$ - (CDCl_3): δ 1,28, 1,34 (2s, 6H), 1,65 (m, 6H), 2,47 (m, 6H), 3,35 (s, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,9 (m, 2H), 4,20 (m, 1H).

Preparación del Compuesto 34:

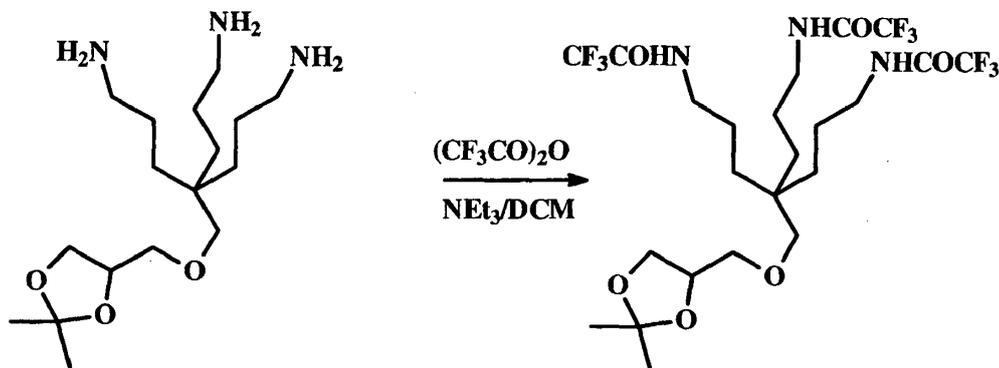


Compuesto 34

15 Una disolución del Compuesto 33 (3,19 g, 10 mmol) en etanol (95%, 100 ml), se enfrió hasta 0°C . A la mezcla de reacción se añadió NaOH (1,51 g, 37,75 mmol), hidrato de hidrazina (5 ml) y suspensión de Ra-Ni en agua, en porciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de reflujo durante 2 horas. La disolución caliente se filtró sobre Celite y se lavó con etanol (50 ml). Después de esto la mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida, y el residuo se coevaporó con tolueno varias veces hasta que precipitó NaOH. La suspensión amarillenta se llevó a reflujo con diclorometano durante 1 hora y se filtró. El sobrenadante se evaporó a sequedad y el producto (es decir, el Compuesto 34) se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

20

Preparación del Compuesto 35:



Compuesto 35

25 A una disolución del Compuesto 34 de la etapa previa en diclorometano (50 ml), se añadió trietilamina (10 ml). La disolución se enfrió hasta 0°C , y se añadió gota a gota una disolución de anhídrido trifluoroacético (5 ml) en diclorometano (50 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de esto la mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida, el residuo se extrajo con acetato de etilo (250 ml), salmuera (200 ml), y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró por evaporador

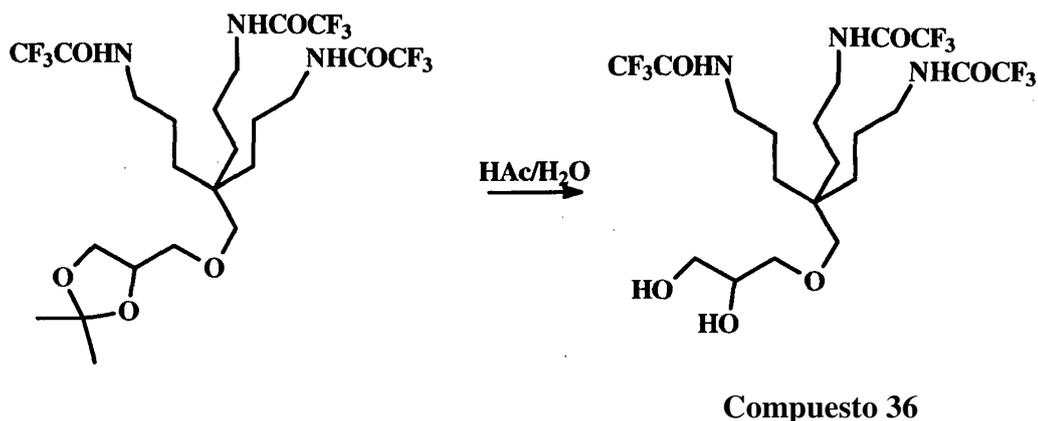
30

rotatorio hasta un aceite. El producto (es decir, el Compuesto 35) se purificó por cromatografía en columna sobre una columna de gel de sílice neutralizado, usando (Acetato de etilo 1: 1 Hexano) como eluyente. Dando (4,3 gramos, 89,7%) de un aceite.

Rf - 0,29 en (Acetato de etilo 1: 1 Hexano)

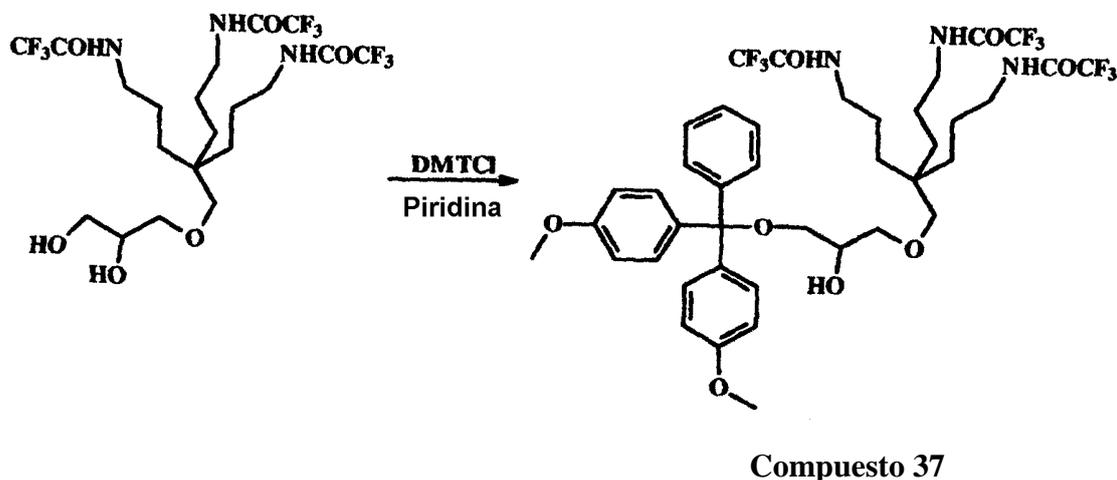
- 5 $^1\text{H NMR}$ - (CDCl_3): δ 1,28, 1,34 (2s, 6H), 1,65 (m, 6H), 3,21 (m, 2H), 3,30 (s, 6H), 3,41 (m, 2H), 3,9 (m, 2H), 4,25 (m, 1H).

Preparación del Compuesto 36:



- 10 Se disolvió el Compuesto 35 (6,19 g, 10 mmol) en una disolución de (80 ácido acético : 20 agua, 100 ml), y se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Después de esto la mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida, el residuo se extrajo con acetato de etilo (250 ml), salmuera (200 ml), y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró por evaporador rotatorio hasta un aceite. El producto (es decir, el Compuesto 36) se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. Rf - 0,16 en (Acetato de etilo 7: 3 Hexano)

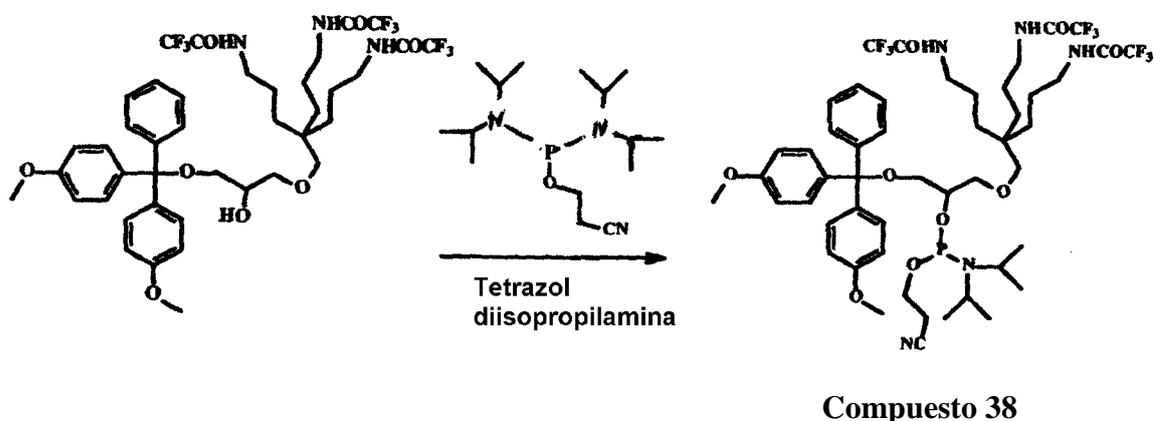
15 Preparación del Compuesto 37:



- 20 El Compuesto 36 (13,2 g, 22,78 mmol) se coevaporó dos veces con piridina seca (50 ml) a presión reducida, después de esto el residuo se disolvió en piridina seca (100 ml) y se enfrió hasta 0°C . A esta disolución se añadió gota a gota una disolución de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (8,47 g, 25,06 mmol) en piridina seca (100 ml) en atmósfera de argón. Después de la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y se agitó durante 5 horas. Después de esto la mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida, el residuo se extrajo con acetato de etilo (250 ml), salmuera (200 ml), y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró por evaporador rotatorio hasta una espuma. El producto (es decir, el Compuesto 37) se purificó por cromatografía en columna sobre una columna de gel de sílice neutralizado, usando un gradiente lineal de 100% hexano que contenía 0,2 % de trietilamina a una mezcla de (Acetato de etilo 7: 3 Hexano) como eluyente, dando (12,66 gramos, 77 %). Rf - 0,67 en (Acetato de etilo 7: 3 Hexano).

- 25 $^1\text{H NMR}$ - (CDCl_3): δ 1,21 (m, 6H), 1,44 (m, 6H), 3,15 (m, 4H), 3,25 (s, 6H), 3,41 (m, 2H), 3,78 (s, 6H), 6,81-7,4 (aromáticos, 13H).

Preparación del Compuesto 38:



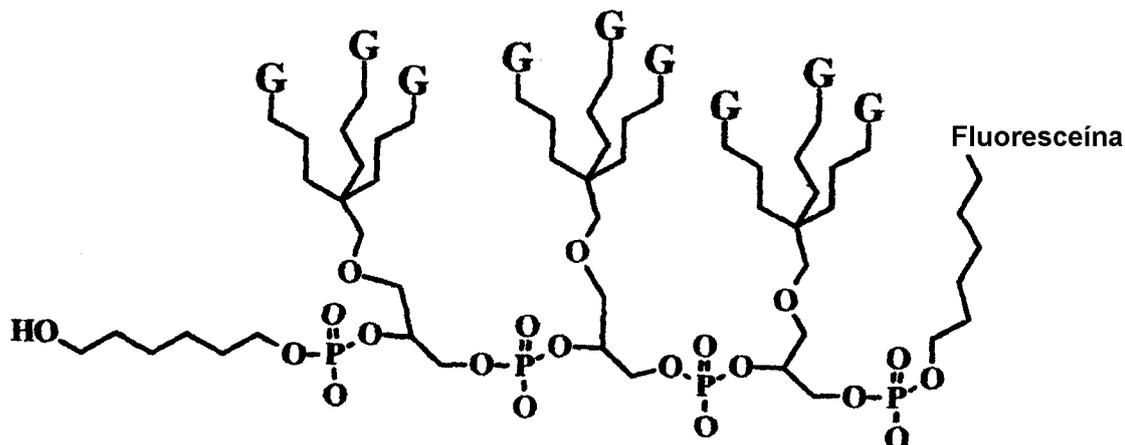
5 Una mezcla del Compuesto 37 (8,81 g, 10 mmol), y sal de tetrazol y diisopropilamina (2,53 g, 15 mmol) se secó a alto vacío durante 2 horas. Después de esto, se llenó el matraz con argón y se añadió acetonitrilo seco. A la mezcla de reacción se inyectó gota a gota, en atmósfera de argón, una disolución de N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (4,52 g, 15 mmol) en acetonitrilo seco (20 ml). La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón durante 16 horas a temperatura ambiente. Después de esto la mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida, el residuo se extrajo con acetato de etilo (250 ml), salmuera (200 ml), y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró por evaporador rotatorio hasta una espuma. El producto (es decir, el Compuesto 38)

10 se purificó por cromatografía en columna sobre una columna de gel de sílice neutralizado, usando un gradiente lineal de 100% de hexano que contenía 0,2 % de trietilamina a una mezcla de (Acetato de etilo 1: 1 Hexano) como eluyente, dando (9,83 g, 90,8 %). Rf - 0,59 en (Acetato de etilo 1:1 Hexano).

15 $^1\text{H NMR}$ - (CDCl_3): δ 1,12-1,18 (m, 18H), 1,39 (m, 6H), 2,4-2,5 (m, 2H), 3,09 (m, 4H), 3,15-3,25 (8H), 3,5-3,7(m, 4H), 3,8 (s, 6H), 4,12 (m, 1H), 6,81-7,4 (aromáticos, 13H).

Ejemplo 4

Preparación del Conjugado 44.

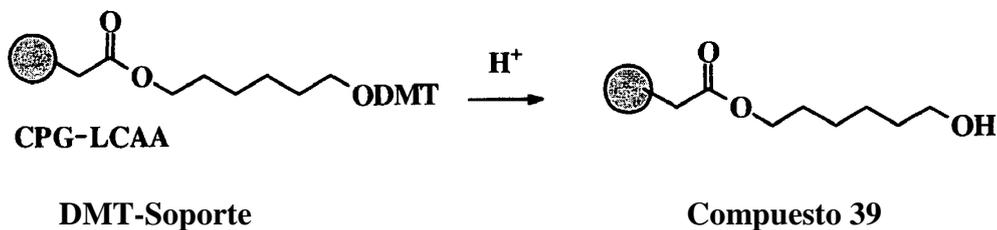


En donde G es un grupo guanidina.

Compuesto 44

El conjugado 44 se preparó según las siguientes etapas:

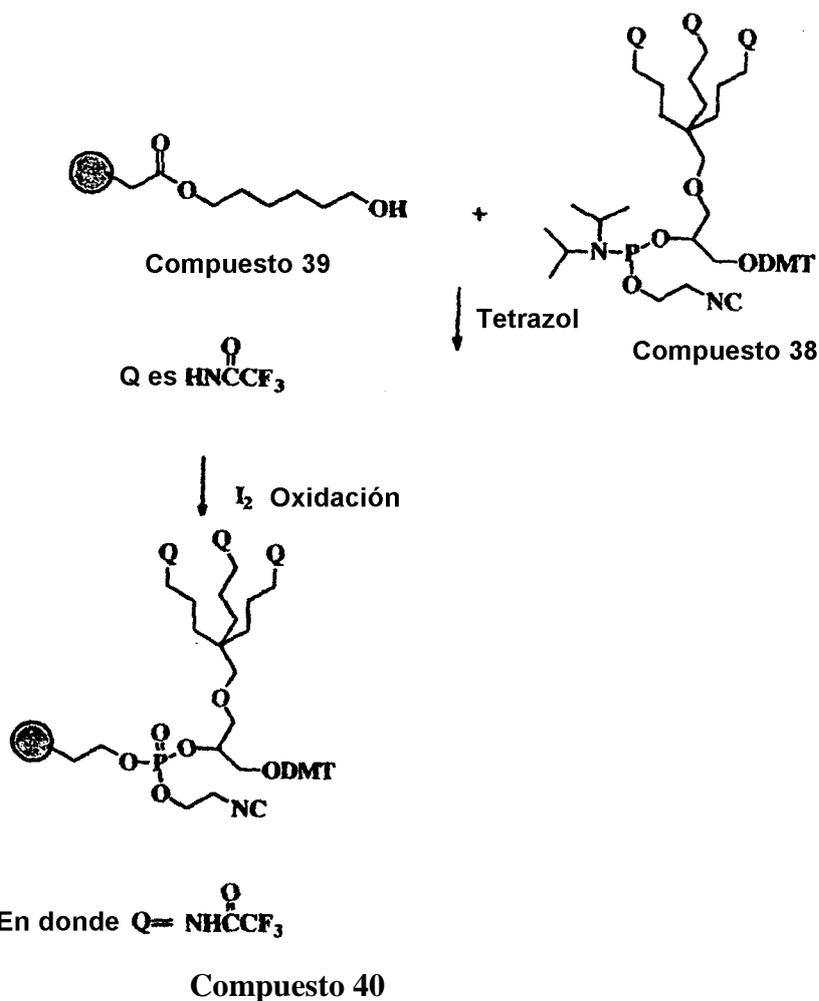
Derivatización de CPG (Vidrio de Poro Controlado).



- 5 La síntesis del Compuesto 39 se llevó a cabo usando un soporte de vidrio de poro controlado (CPG) de 1000 Å de tamaño de poro, cargado a 35 mmol por gramo con 3'-succinilhexanol.

El Compuesto 39 se preparó según el procedimiento general descrito por Gait en "oligonucleotide synthesis" IRL Press (1984), página 47. La síntesis del polímero orgánico se inicia por desprotección del grupo dimetoxitritilo (DMT), añadiendo una disolución de ácido tricloroacético al 2% en diclorometano, a 100 mg del DMT-Soporte. La mezcla de reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 s, seguido de lavados con metanol 2x10 ml, y con diclorometano 2x10 ml.

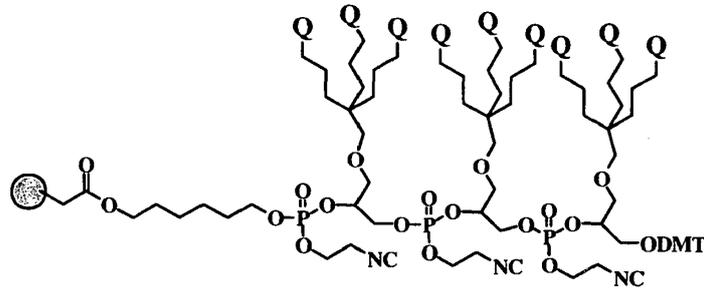
Unión del Compuesto 38 al Compuesto 39 para obtener el Compuesto 40.



- 15 La síntesis del Compuesto 40 se llevó a cabo usando un soporte de vidrio de poro controlado (CPG) de 1000 Å de tamaño de poro, cargado a 35 mmol por gramo con 3'-succinilhexanol. Seguido de condensación del Compuesto 38, en un Sintetizador de ADN de Applied Biosystems 381A usando desoxinucleósido fosoramiditas estándar, como describen Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters 22, 5843-5846

Preparación del oligómero 41:

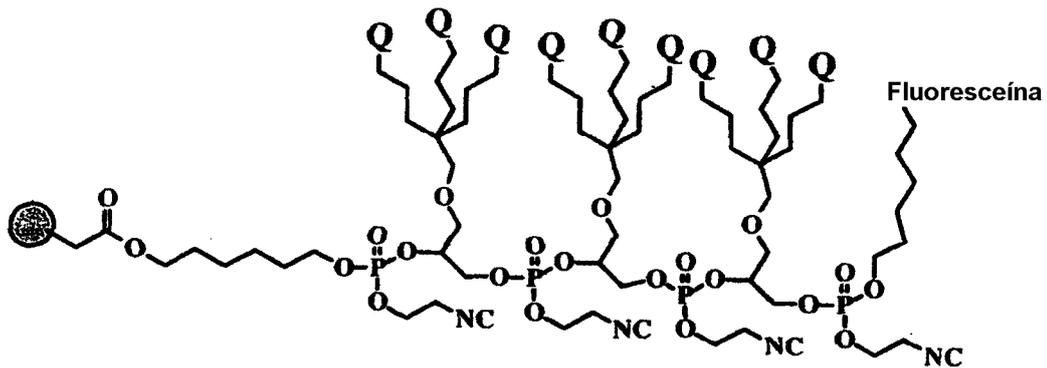
Se usó el protocolo anterior para condensar dos veces más el Compuesto 38 para obtener el Compuesto 41.



Compuesto 41

- 5 El Compuesto 40 se desprotegió con una disolución de ácido tricloroacético al 2% en diclorometano, después de la condensación, oxidación para obtener el siguiente compuesto oligomérico 41. El polímero oligomérico se preparó a la escala de 0,35 mmol en un Sintetizador de ADN de Applied Biosystems 381A usando desoxinucleósido fosforamiditas estándar, como describen Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters 22, 5843-5846.

Unión de fluoresceína al oligómero 41 para obtener el oligómero 42.

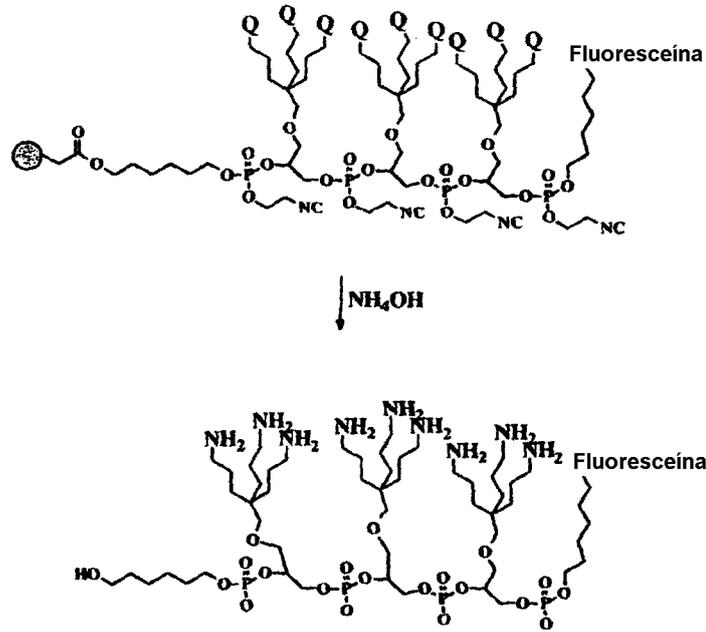


10

Compuesto 42

- 15 El oligómero 41 se desprotegió con una disolución de ácido tricloroacético al 2% en diclorometano, después de la condensación, con Fluoresceína-(di-t-butilato)-hexametileno-fosforamidita (FAM-HPA, Glen Research) se añadió al grupo 5'-hidroxilo del Compuesto 41 esencialmente como describen Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters 22, 5843-5846.

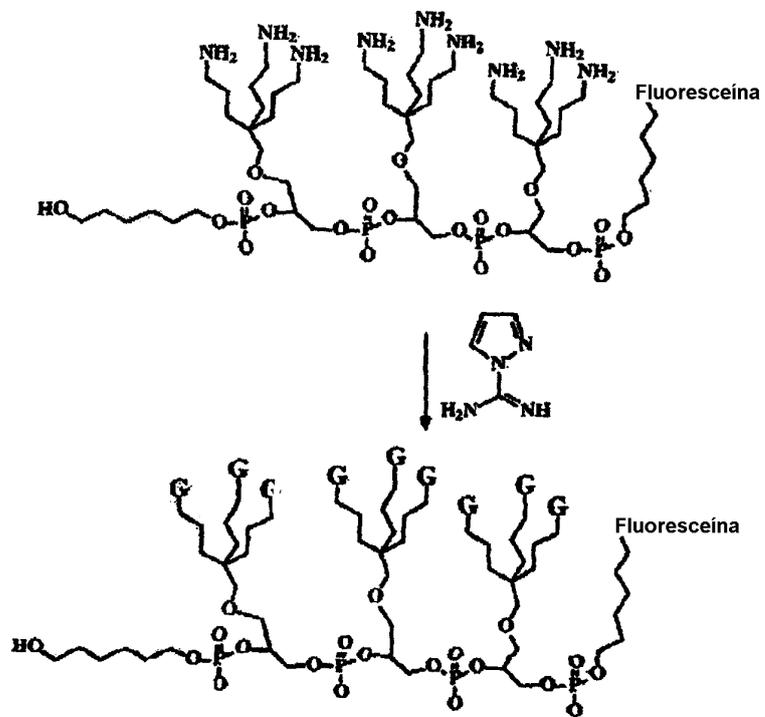
Preparación del oligómero 43



Compuesto 43

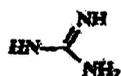
- 5 Se mezcló el oligómero 42 con hidróxido de amonio concentrado en un tubo sellado, y se calentó a 60°C durante 18 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, la disolución acuosa se decantó y se evaporó a sequedad para obtener 43 como un gránulo.

Preparación del oligómero 44



Compuesto 44

En donde G es un grupo guanidina.



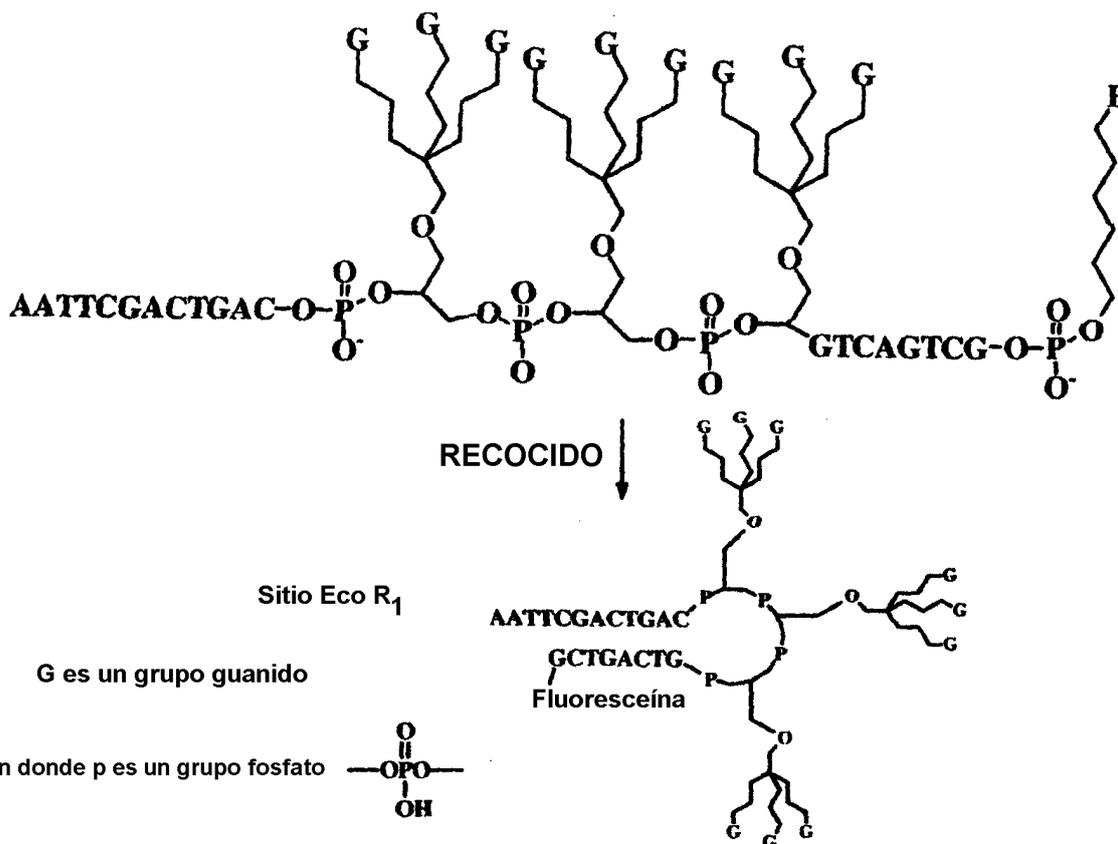
El gránulo resultante se trató con una disolución de hidrócloruro de 1H-pirazol-1-carboxamida (Aldrich) (50 equivalentes) en carbonato de sodio al 5% (5 ml). La disolución se calentó a 50°C durante 24 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente. El producto bruto (es decir, el Compuesto 44) se disolvió en agua desionizada doblemente destilada (1 ml) y se purificó por HPLC. El Compuesto 44 está listo para su entrega a células.

5

Ejemplo 5

Unión de ácidos nucleicos, a un resto heterocíclico oligomérico.

A. Preparación de un oligodesoxinucleótido de secuencia 3'-AATTCGACTGAC-OH-5', y su secuencia complementaria a un resto heterocíclico oligomérico.



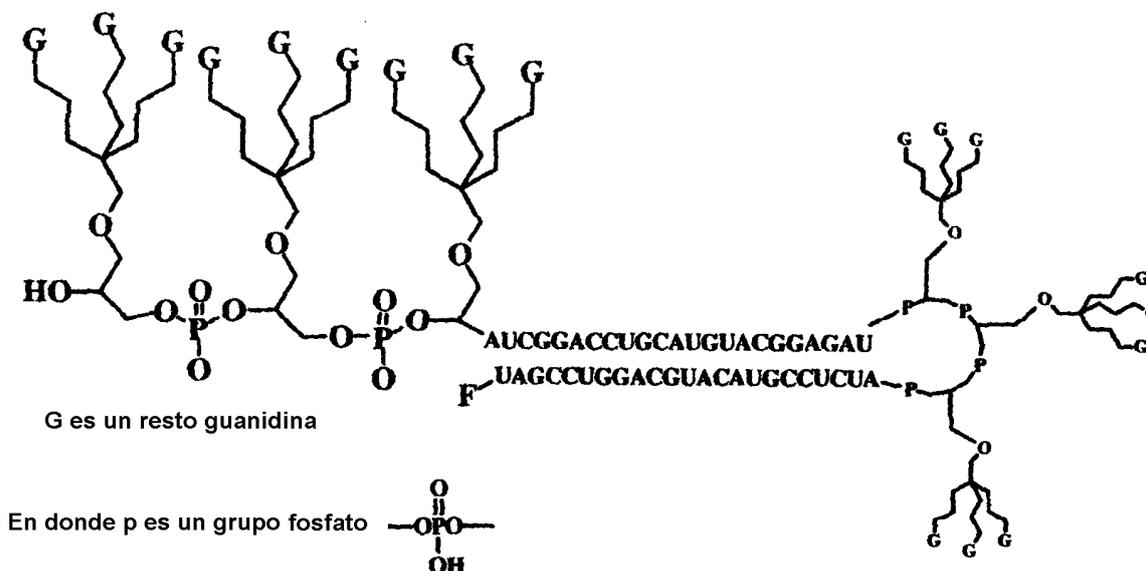
10

La síntesis del Compuesto 45 se llevó a cabo usando un soporte de vidrio de poro controlado (CPG) de 1000 Å de tamaño de poro, cargado a 35 mmol por gramo con 3'-succinilhexanol. El oligodesoxinucleótido 12-mer de secuencia 3'-AATTCGACTGAC-OH-5' (una secuencia de sitio de restricción para la enzima de restricción EcoR1) se prepara en la escala de 0,35 mmol en un Sintetizador de ADN de Applied Biosystems 381A usando desoxinucleósido fosforamiditas estándar, seguido de condensación secuencial del Compuesto 38, y condensación de la secuencia complementaria 3'-GTCAGTCG-5', seguido de condensación de FAM-HPA como se describe anteriormente. Usar el protocolo descrito por Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters 22, 5843-5846. El Compuesto 45 fue separado de la resina CPG, tratando el soporte polimérico con hidróxido de amonio concentrado, seguido de purificación del producto fluoresceinado, usando Sephadex G-25. El Compuesto 45 está listo para la absorción celular.

15

20

B. Síntesis de ARN, Protocolo de desprotección y purificación oligodesoxinucleótido de secuencia 3'-AUCGGACCUGCAUGUACGGAGAU y su secuencia complementaria 5'-(F)-UAGCCUGGACGUACAUGCCUCUA y unión a un resto heterocíclico oligomérico.



5

Compuesto 46

La síntesis del Compuesto 46 se llevó a cabo usando un soporte de vidrio de poro controlado (CPG) de 1000 Å de tamaño de poro, cargado a 35 mmol por gramo con 3'-succinilhexanol. El soporte se puso en una columna que se ajusta a una máquina 394 ABI y se dejó reaccionar con el Compuesto 38 descrito anteriormente, seguido de síntesis de ARN, y de nuevo condensación con el Compuesto 38 como se desea seguido de síntesis de ARN y condensación última con fluoresceína. Las moléculas de ARN fueron sintetizadas usando el ciclo de etapas estándar escrito por el fabricante con modificaciones a unas pocas etapas de espera como se describe más adelante. Los monómeros fueron fosforamiditas de ARN con grupos protectores estándar (N⁶-benzoyl-5'-O-dimoxitritiladenosina-2'-butildimetilsilil-3'-O--N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimoxitritiluridina-2'-butildimetilsilil-3'-O--N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, N^{sup}.2-isobutiril-5'-O-dimoxitritilguanosina-2'-butildimetilsililo, 3'-O--N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, y N⁴-benzoyl-5'-O-dimoxitritilcitidina-2'-butildimetilsilil-3'-O--N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, de Chemgenes Corp Mass.) usados a una concentración de 0,15 M en acetonitrilo (CH₃CN) y un tiempo de acoplamiento de 7,5 min. El activador fue tiotetrazol (0,25M). Para la PO-oxidación se usó yodo/agua/piridina. Todos los reactivos para síntesis también fueron de Glen Research.

Desprotección-I (escisión del oligómero, desprotección de base y fosfato)

Después de completarse la síntesis, el vidrio de poro controlado (CPG) se transfirió a un vial con tapón a rosca (Fisher, número de catálogo 03-340-5N) o un tubo de microfuga exento de ARNasa con tapón a rosca. El oligonucleótido fue escindido del CPG con desprotección simultánea de grupos base y fosfato con 1,0 ml de una mezcla de amoniaco etanólico [amoniaco:etanol (3:1)] durante 6 horas a una noche a 55°C. El vial fue enfriado brevemente en hielo, y después la mezcla de amoniaco etanólica se transfirió a un nuevo tubo de microfuga. El CPG se lavó con porciones de 3x0,25 ml de 50% de acetonitrilo y se liofilizó. El producto bruto se disolvió en una disolución de hidrocloreto de 1H-pirazol-1-carboxamida (Aldrich) (50 equivalentes) en carbonato de sodio al 5% (5 ml). La disolución heterogénea se calentó a 50°C durante 24 horas. Los aproximadamente 1,75 ml de disolución se dividen mejor de manera equitativa en dos tubos de microfuga, tapados fuertemente y enfriados después a -80°C durante 15 min, antes de secar en un speed vac/liofilizador durante aproximadamente 90 min.

Desprotección-II (Retirada del grupo *2' TBDMS)

El residuo blanco obtenido se resuspendió en 200 microlitros de trihidrofluoruro de trietilamina (TEA.3HF, Aldrich) y se calentó a 65°C durante 1,5 h para retirar los grupos terc-butildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. Después la reacción se inactivó con 400 microlitros de isopropoxitrimetilsilano (iPrOMe₃Si Aldrich) y se incubó adicionalmente en el bloque calentador dejando los tapones abiertos durante 15 min; (Esto causa que el aducto volátil de fluoruro de isopropoxitrimetilsililo se vaporice). El reactivo inactivador residual se retiró secando en un "speed vac". Después, el oligómero fue precipitado en metanol anhidro (MeOH, 800 microlitros). El líquido se retiró muy cuidadosamente después de ser centrifugado en una centrífuga durante 5 minutos a la velocidad más alta disponible. El metanol

residual se retiró secando brevemente en un speed vac después de congelar a -80 grados C. El ARN bruto se obtuvo como un material esponjoso blanco en el tubo de microfuga.

Cuantificación del oligómero bruto o análisis bruto

- 5 Se disolvieron muestras en acetonitrilo acuoso al 50% (0,5 ml) y se cuantificaron como sigue: Se realizó primero un blanco con acetonitrilo acuoso al 50% solo (1 ml). 5 microlitros de muestra y 995 microlitros de acetonitrilo al 50% se mezclaron bien en un tubo de microfuga, se transfirieron a cubeta y se obtuvo la lectura de absorbancia a 260 nm. El material bruto se seca y se almacena a -20°C.

Purificación de oligómeros (Compuesto 46).

- 10 Los oligómeros brutos se analizaron y purificaron por HPLC (Mono Q Pharmacia Biotech 5/50). El sistema amortiguador es A= Tris HCl 100 mM, 10% de acetonitrilo de calidad HPLC,

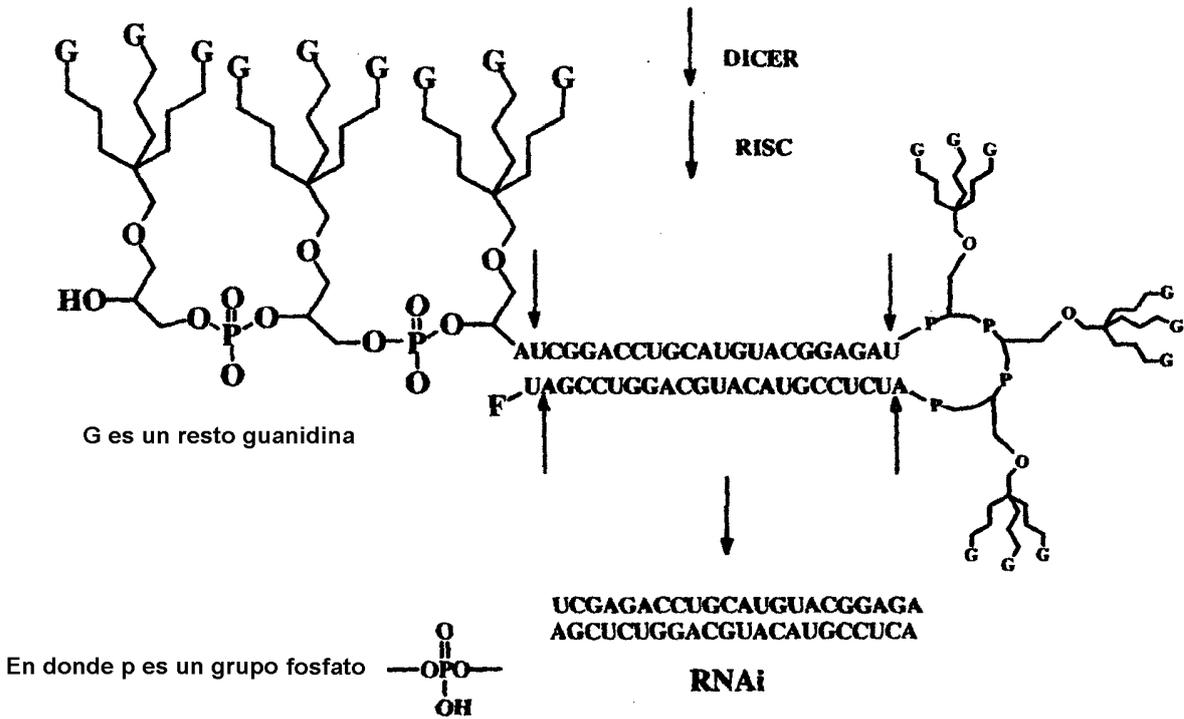
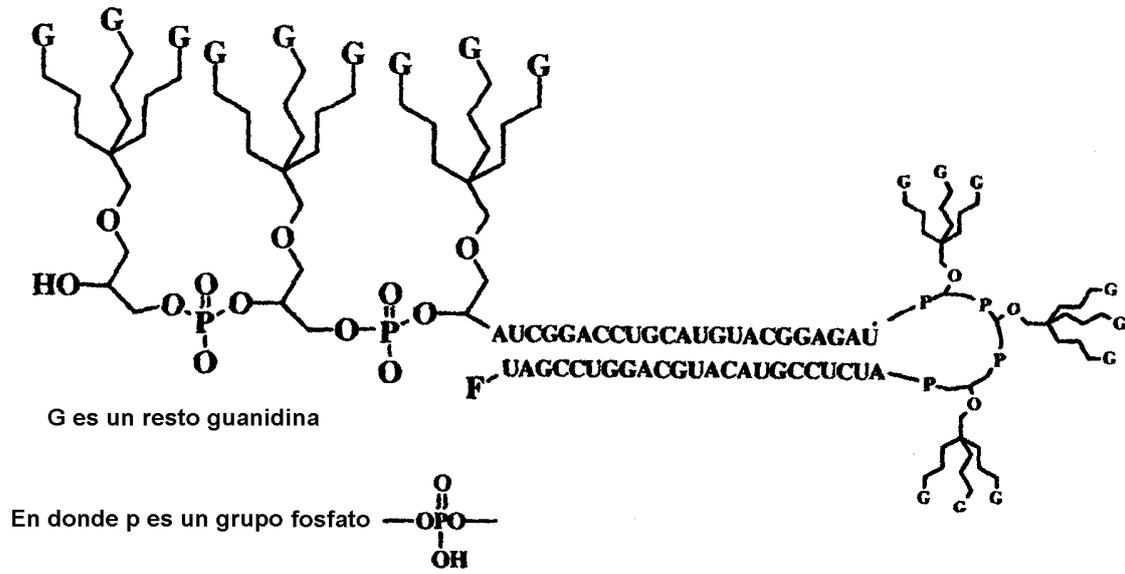
- 15 pH=8, B= Tris-HCl 100 mM pH 8, 10% de acetonitrilo de calidad HPLC, NaCl 1 M, caudal 1,0 ml/min, longitud de onda 260 nm. Para el ARN 21mer no modificado es usualmente adecuado un gradiente de NaCl de 0-0,6 M. Se puede purificar una pequeña cantidad de material (aproximadamente 5 OD) y analizar por CGE o MS. Una vez que la identidad de este material es confirmada, el oligómero bruto se puede purificar después usando una cantidad de material más grande, es decir 40 OD's por ejecución, caudal de 1 ml/min y una longitud de onda menos sensible

de 280 nm para evitar la saturación del detector. Después se reúnen las fracciones que contienen los oligonucleótidos de longitud completa, se evaporan y finalmente se desalan como se describe a continuación.

Desalación del oligómero purificado

- 20 El oligómero seco purificado se desaló después usando cartuchos C-18 Sepak (Waters) o bien Sephadex G-25M (Amersham Biosciences). Cada uno de los cartuchos fue acondicionado con 10 ml de acetonitrilo, seguido de acetonitrilo al 50%, tampón 100 mM (este puede ser acetato de trietilamonio, acetato de sodio o acetato de amonio). Finalmente, el oligómero purificado, disuelto completamente en 10 ml de agua exenta de ARNs, se aplicó al cartucho con elución gota a gota muy lenta. El cartucho se lavó con agua (10 ml) para retirar las sales. Y finalmente el oligómero exento de sal se eluyó con acetonitrilo al 50% o metanol al 50% directamente a un vial con tapón de rosca. El producto fluoresceinado se reunió y se liofilizó para la entrega a células vivas.

- 25 Se describen ejemplos adicionales que describen la activación del mecanismo de RNAi en células en el siguiente esquema, que está incluido expresamente como parte de la descripción de esta patente.

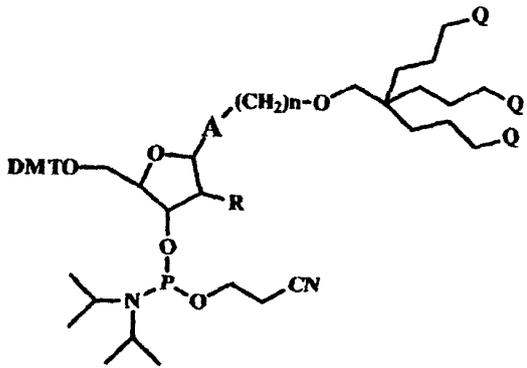


Ejemplo 6

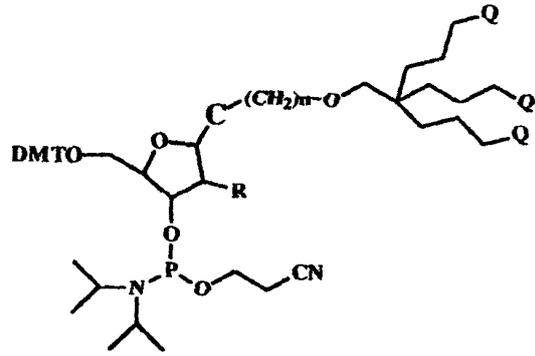
Unión de ácidos nucleicos protegidos, ADN o ARN modificados a un resto heterocíclico oligomérico.

En este ejemplo, los ácidos nucleicos están protegidos, y pueden ser introducidos en el protocolo de síntesis que se describe en el Ejemplo 5, como se presenta en el siguiente esquema.

5

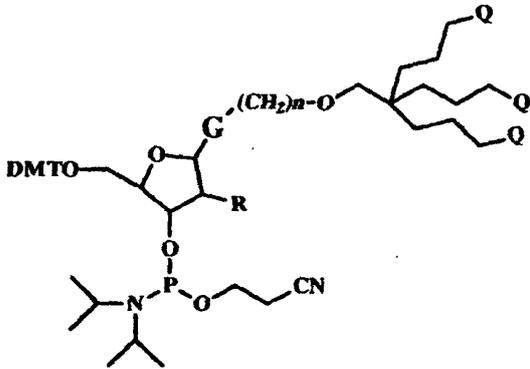


A es Adenina

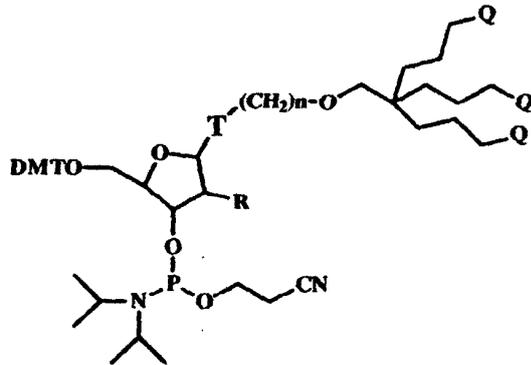


C es citosina

En donde Q es : $\text{HN} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{CCF}_3$

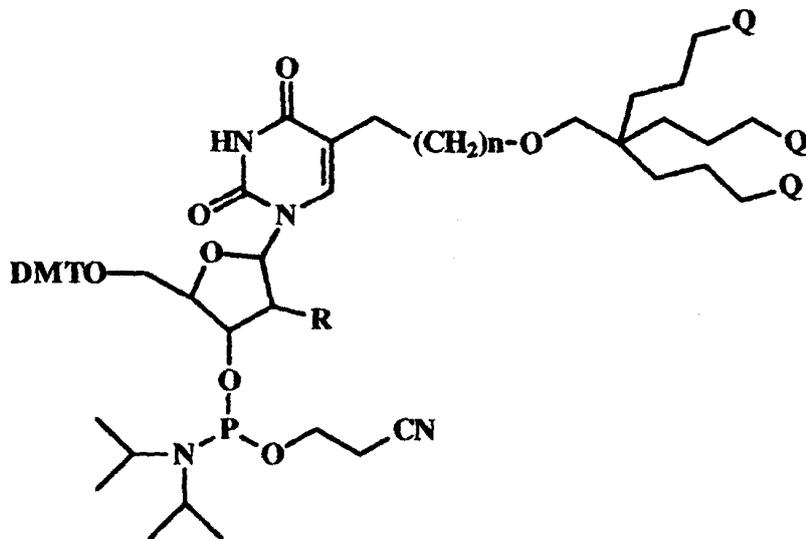


G es guanidina



T es timina

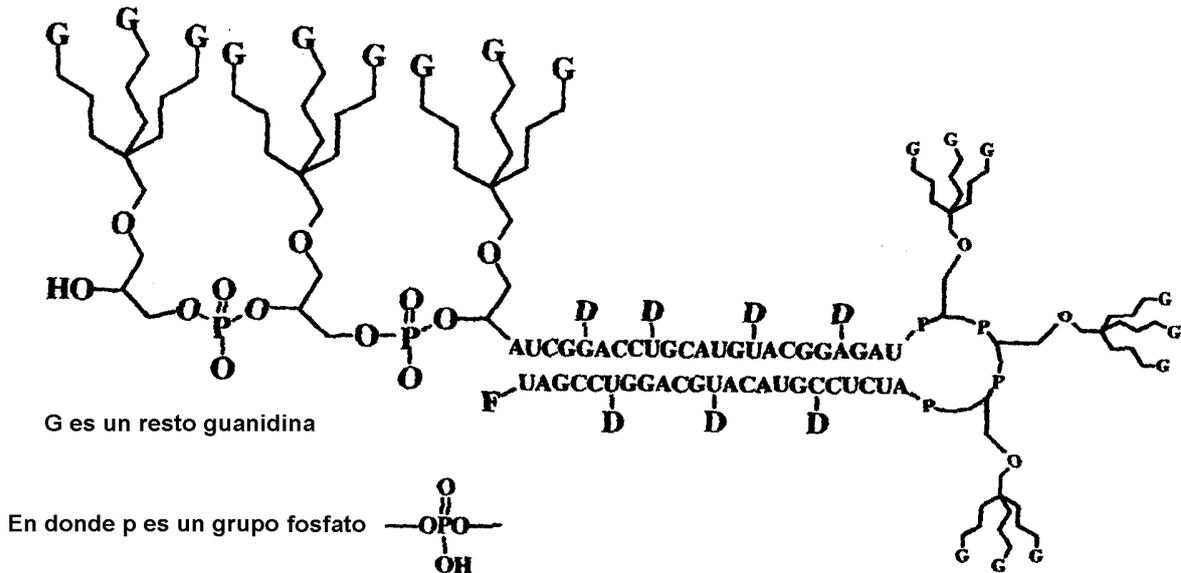
En donde Q es : $\text{HN} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{CCF}_3$



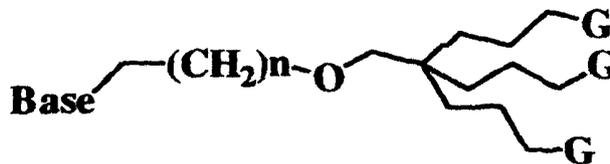
en donde R es H en caso de ADN y OX en caso de ARN;

X es un grupo protector que se usa en síntesis de ARN

5 Después de la aplicación del protocolo descrito en el Ejemplo 5, el siguiente Esquema es ilustrativo del uso de estos ácidos nucleicos protegidos.

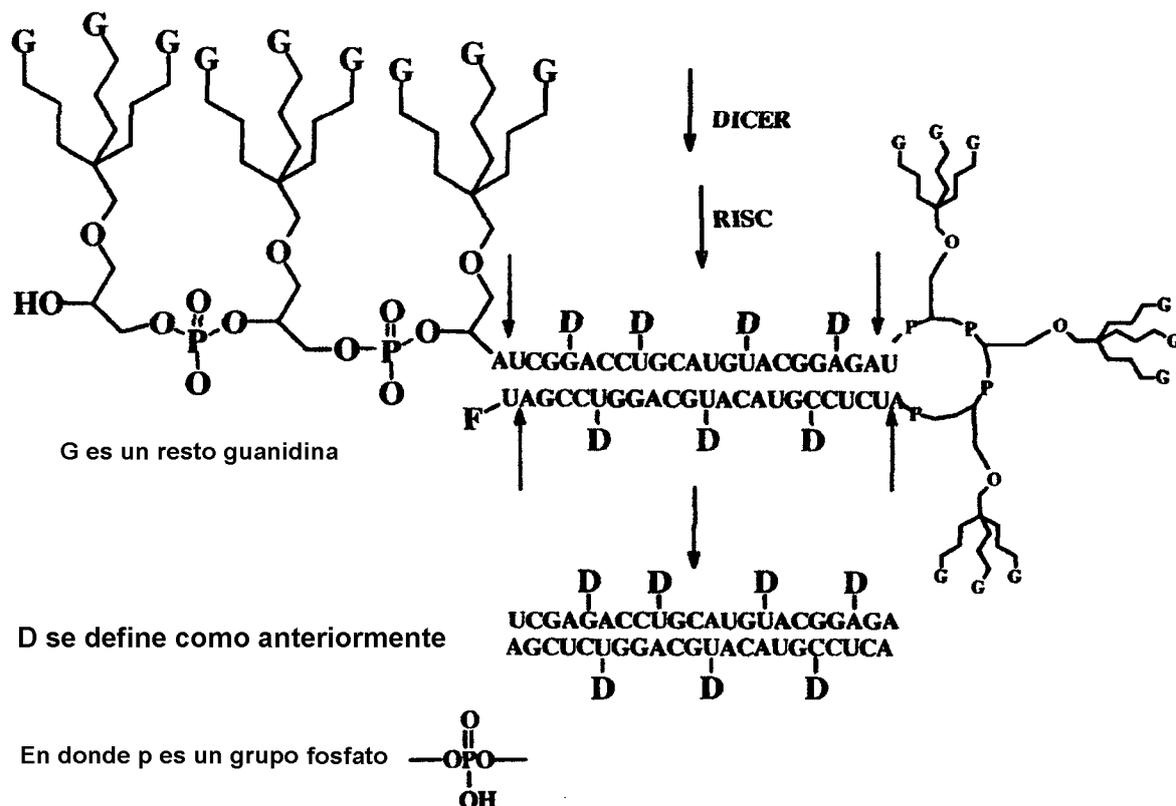


En donde D es :



10 Conduciendo a la formación de secuencia protegida de ARN, que podría ser reconocida por enzimas de Dicer y Risk, y permitiendo sin embargo la protección contra nucleasas y mejorando la eficacia de entrega a células vivas la proteína de Dicer inicia el RNAi procesando dsARN a ARNs pequeño (smARN) de ~ 22 nt de longitud. Los segmentos cortos entran después en un complejo efector, RISC, que busca y degrada sustratos de mRNA homólogos. El complejo silenciador inducido por ARN, o RISC, es un complejo de siARN con multiproteínas que escinde dsARN (incluido viral) y se une a hebras cortas de ARN antisentido, que son después capaces de unirse a hebras complementarias. Cuando encuentra la hebra complementaria, activa la actividad ARNasa y escinde el ARN.

15 Este proceso es importante tanto en regulación de genes por micro-ARNs como en la defensa contra infecciones víricas, que usan a menudo ARN de doble hebra como vector infeccioso.



Este ARN protegido puede servir como resto activador para el mecanismo de RNAi.

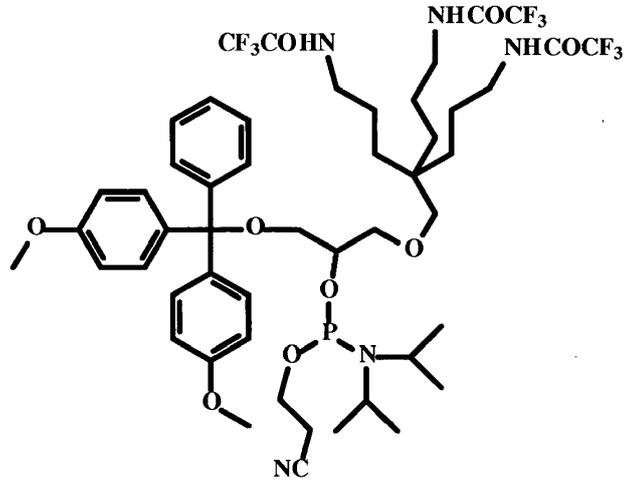
Ejemplo 7

Ensayo de absorción celular para el Compuesto 45 y el Compuesto 46.

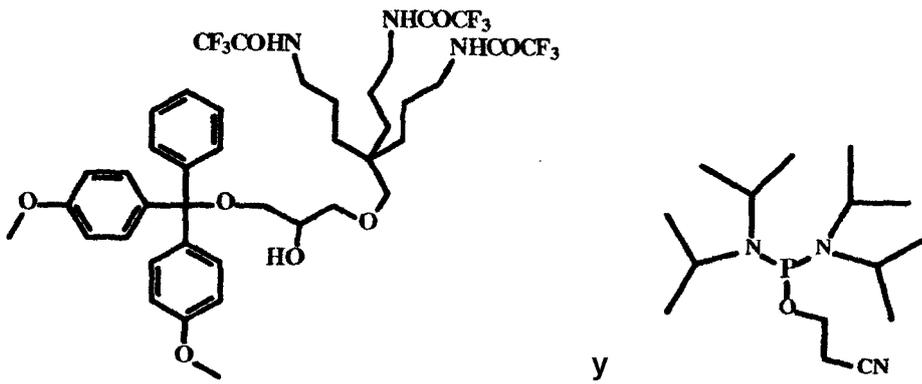
- 5 Los compuestos ensayados se disolvieron en tampón PBS (pH 7,2) y su concentración se determinó por absorción de fluoresceína a 490 nm ($\epsilon = 67.000$). La exactitud de este método para determinar la concentración de transportadores se estableció pesando muestras seleccionadas y disolviéndolas en una cantidad conocida de tampón PBS. Las concentraciones se determinaron por espectroscopía UV correlacionada con los patrones pesados manualmente.
- 10 Se cultivaron células Jurkat (líneas de células T humanas) y células B de murino (CH27) en FCS al 10 % y DMEM y se usaron para los experimentos de absorción celular. Se añadieron diversas cantidades del Compuesto 45 y el Compuesto 46, los compuestos ensayados, a aproximadamente 3×10^6 células en 2 % de FCS/PBS (total combinado de 200 μ l) y se pusieron las células en placas de microtitulación de 96 pocillos, y se incubaron durante cantidades variantes de tiempo a 23°C o 4°C. Después de esto, se centrifugaron las placas de microtitulación y se aislaron las células, se lavaron con PBS frío (3 x 250 μ l), se incubaron con tripsina al 0,05%/AEDT 0,53 mM a 37°C durante 5 minutos, se lavaron con PBS frío, y se resuspendieron en PBS que contenía yoduro de propidio al 0,1%. Las células se analizaron usando citometría de flujo fluorescente (FACScan; Becton Dickinson).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la estructura del compuesto 38:



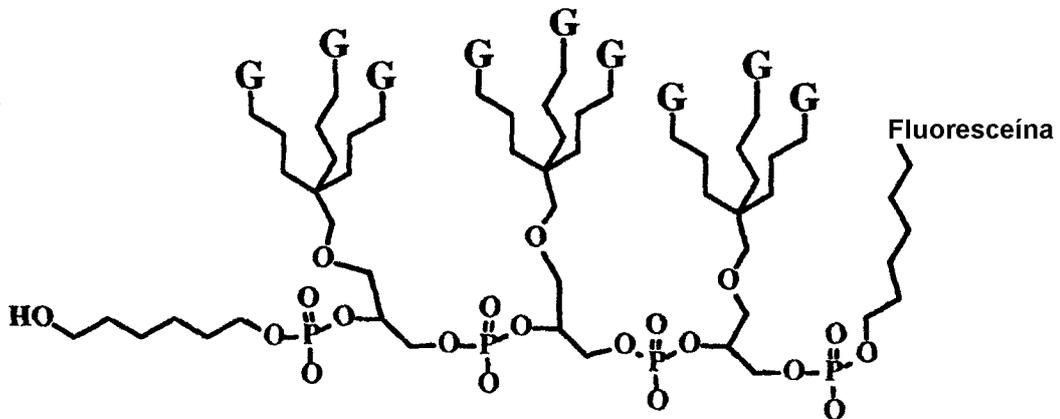
2. Uso de los compuestos:



5

en la preparación del compuesto de la reivindicación 1.

3. Un conjugado representado por la estructura del compuesto 44:



en donde G es un grupo guanidina.

10

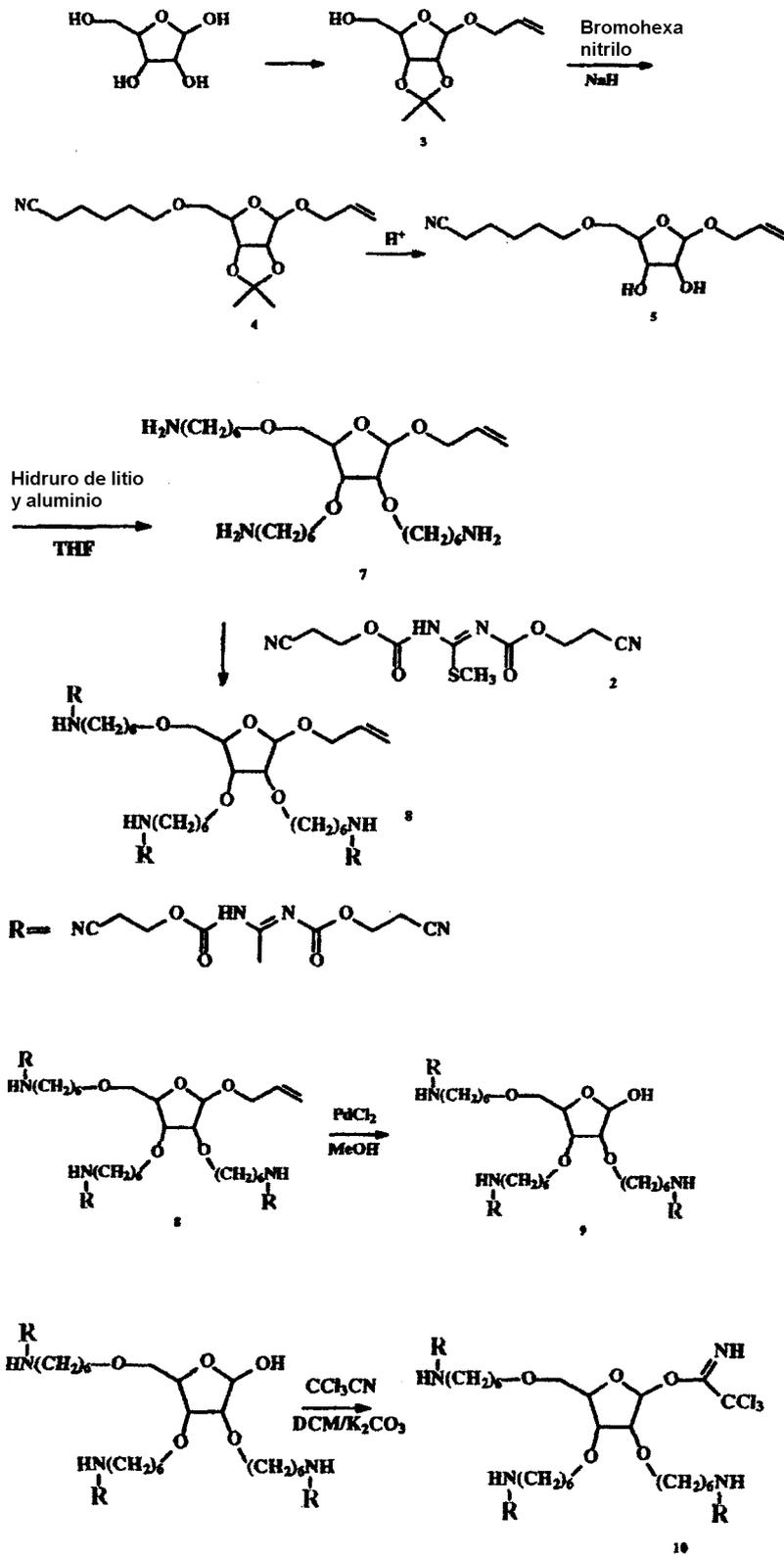


FIGURA 1A

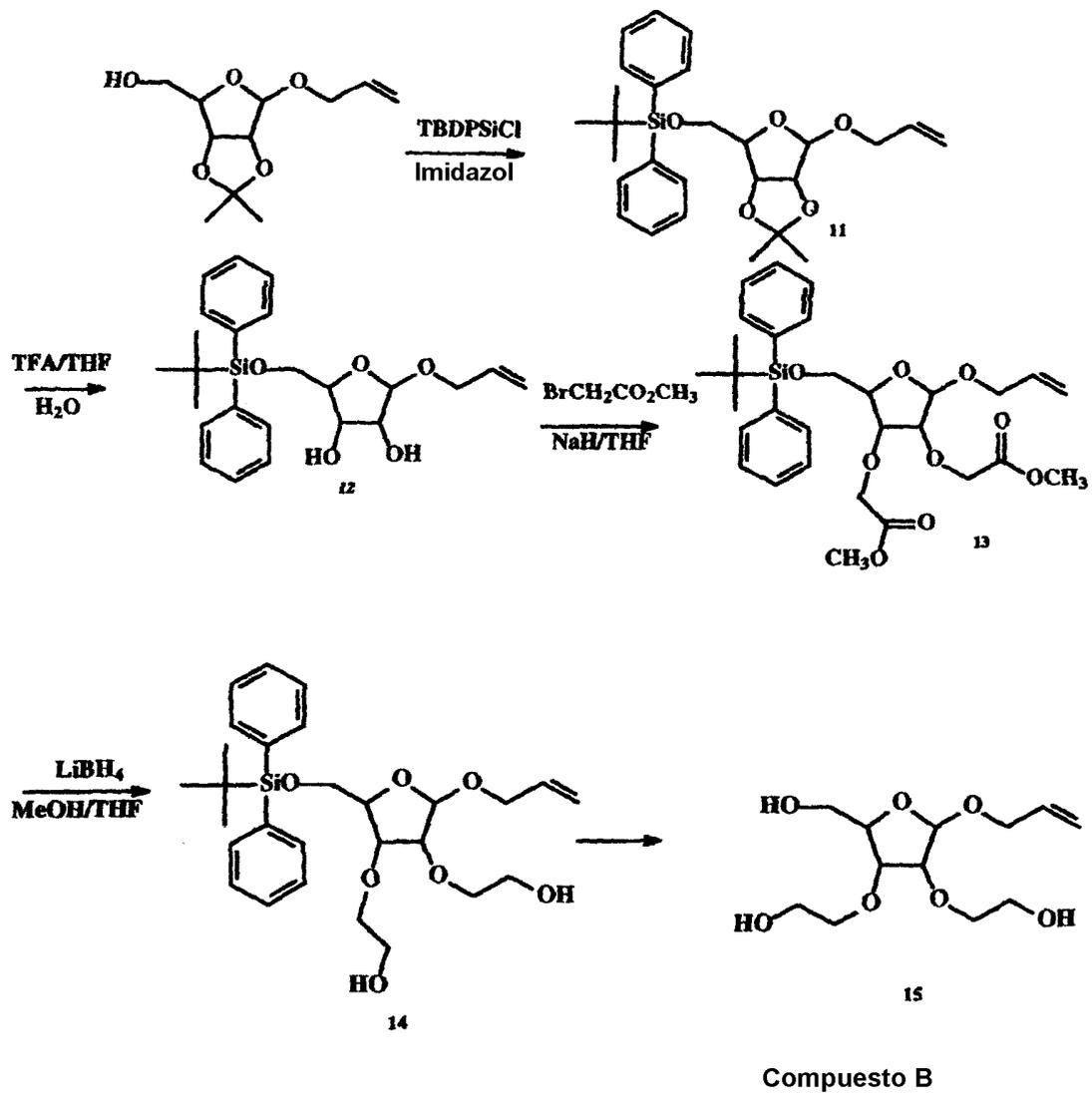


FIGURA 1B

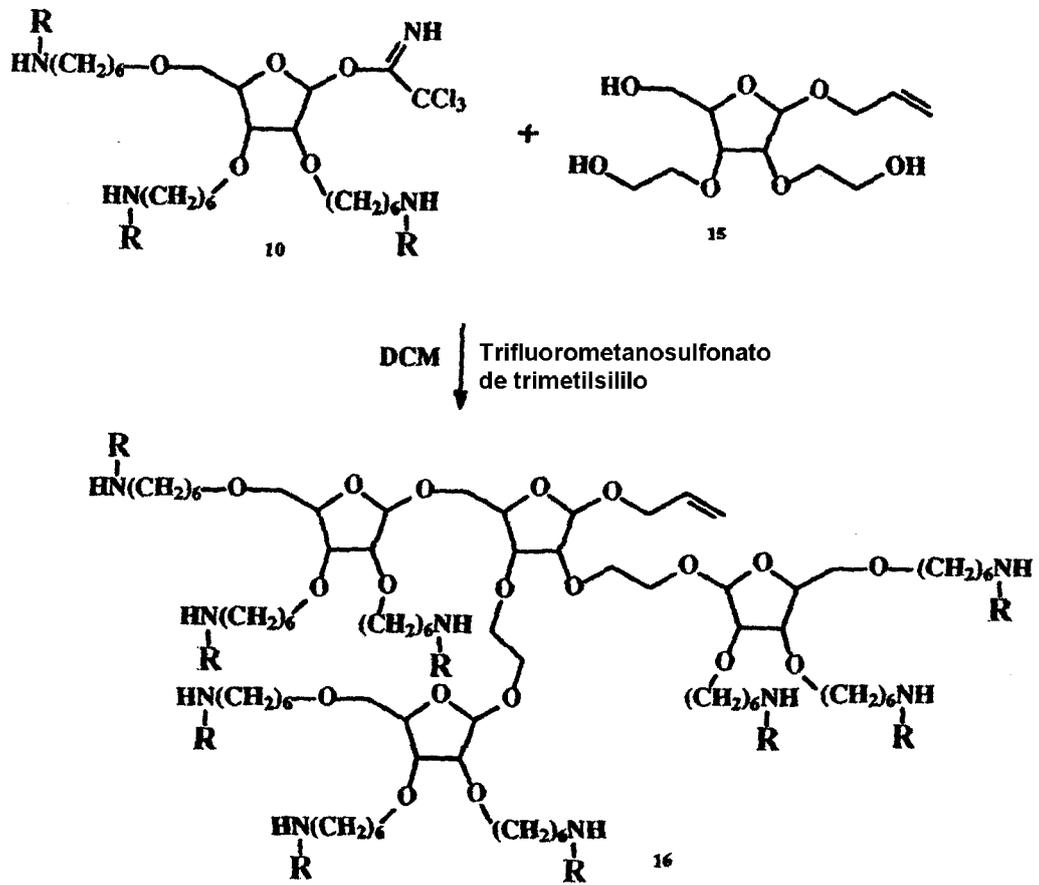
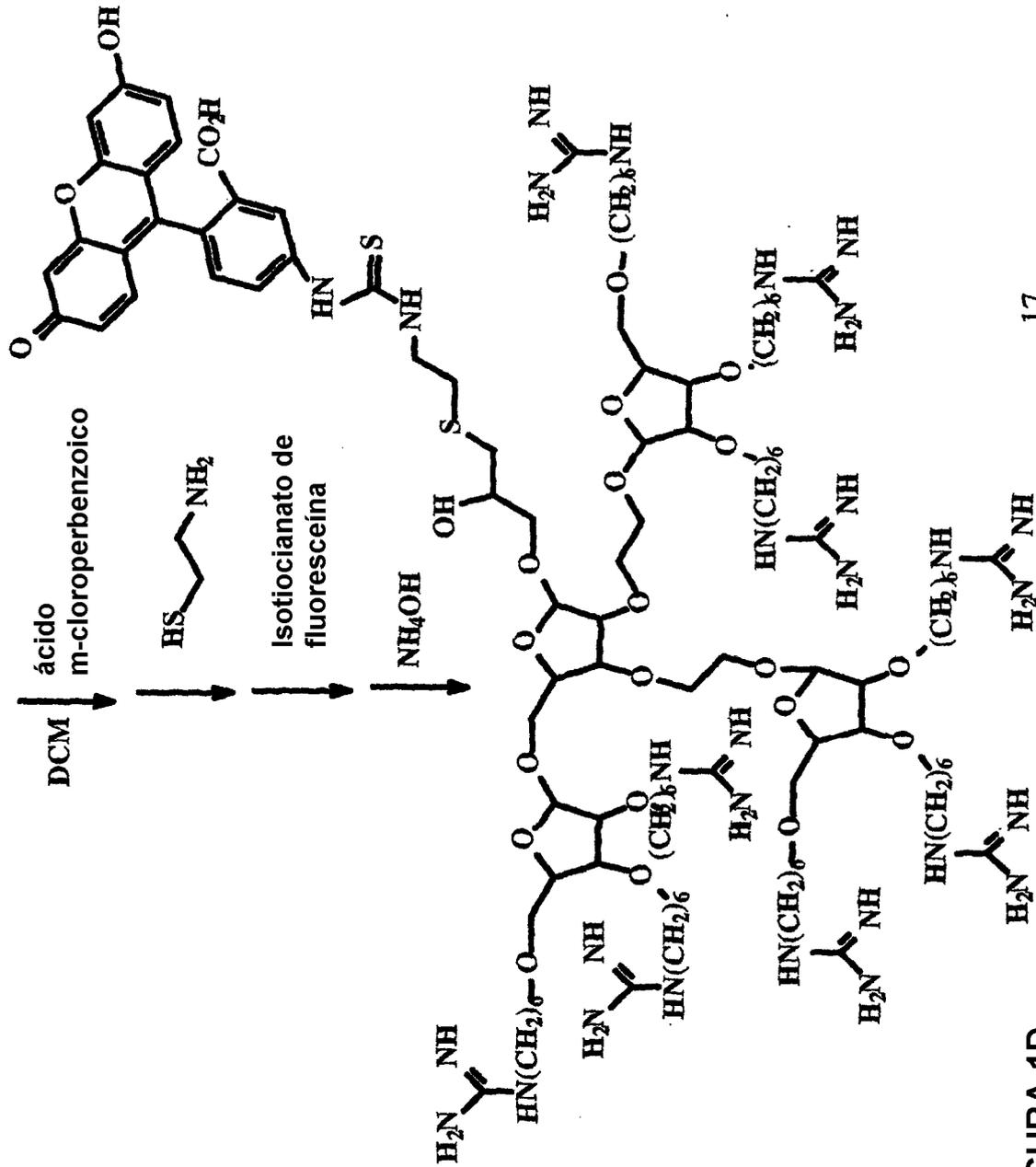


FIGURA 1C



17

FIGURA 1D

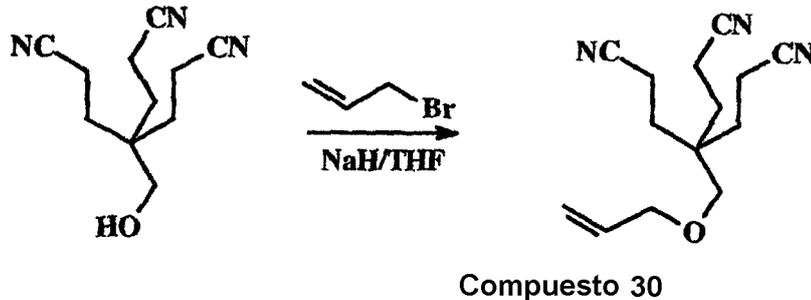
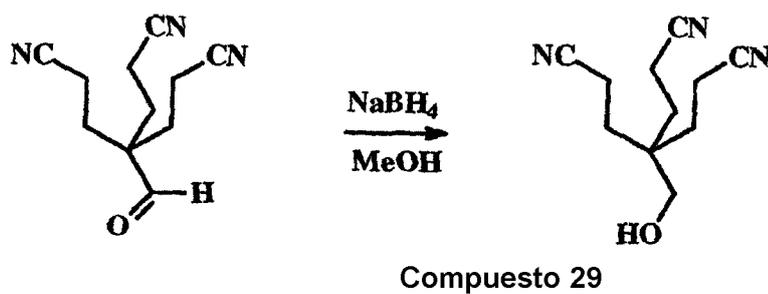
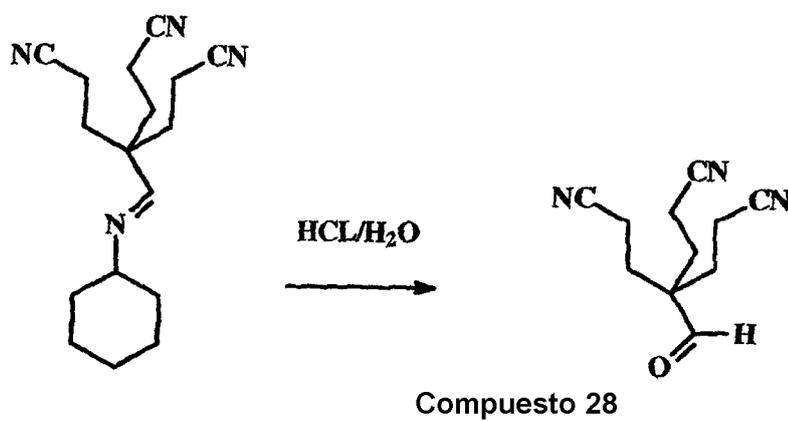
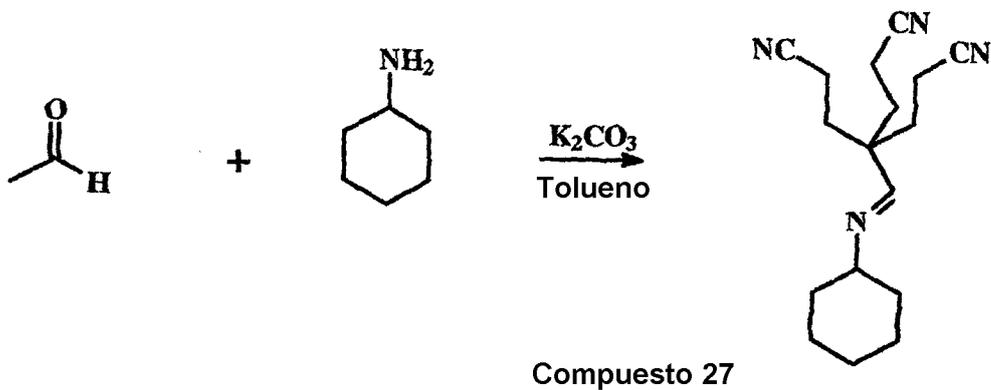


FIGURA 2.1

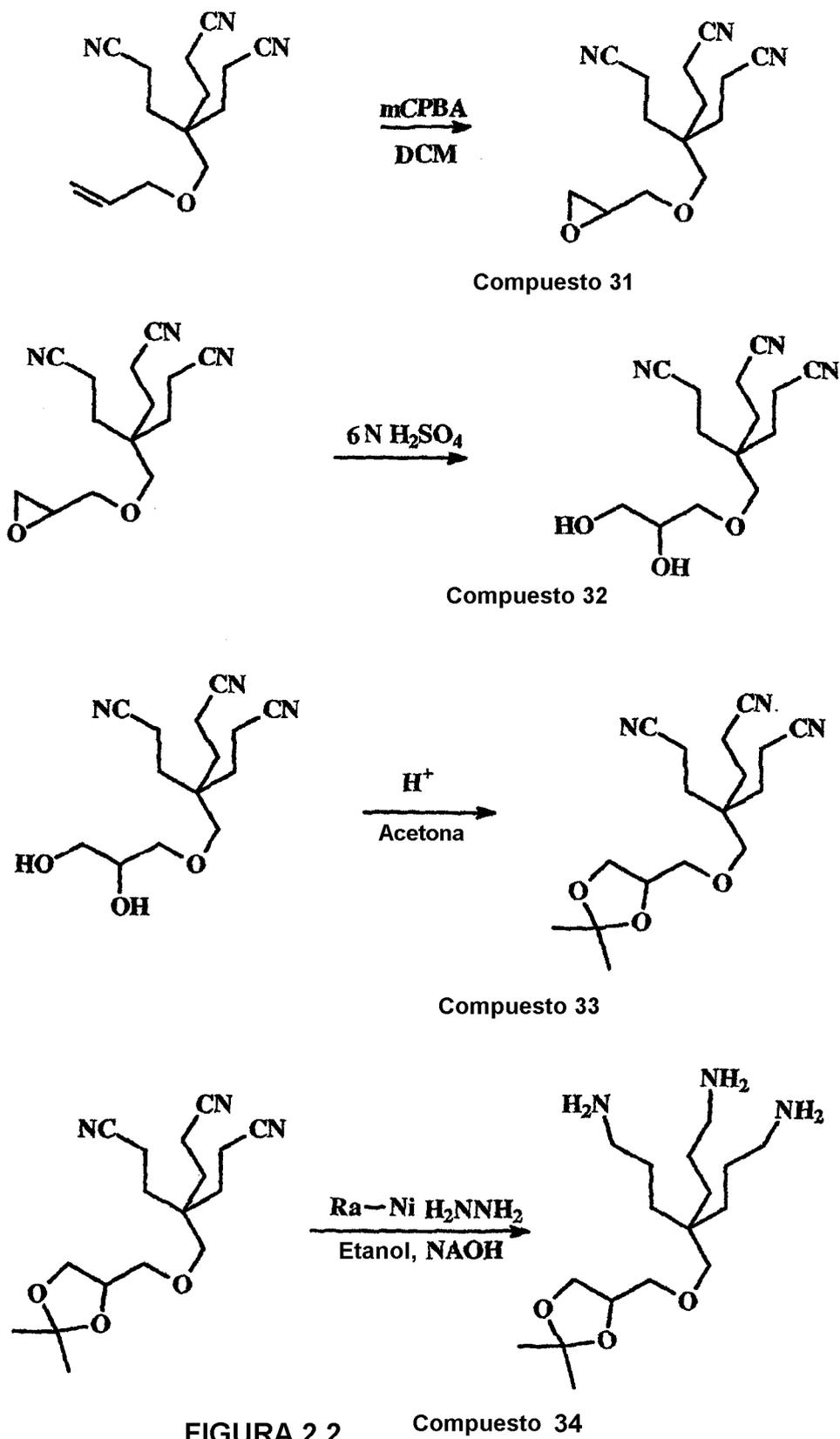


FIGURA 2.2

Compuesto 34

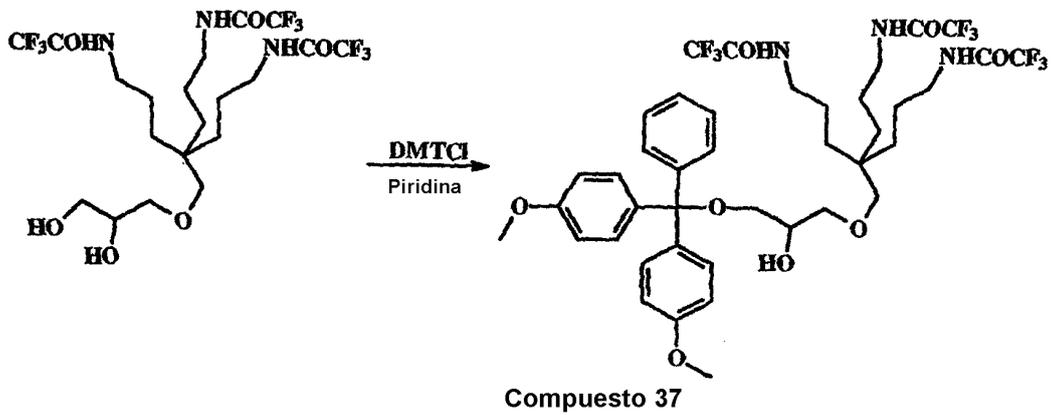
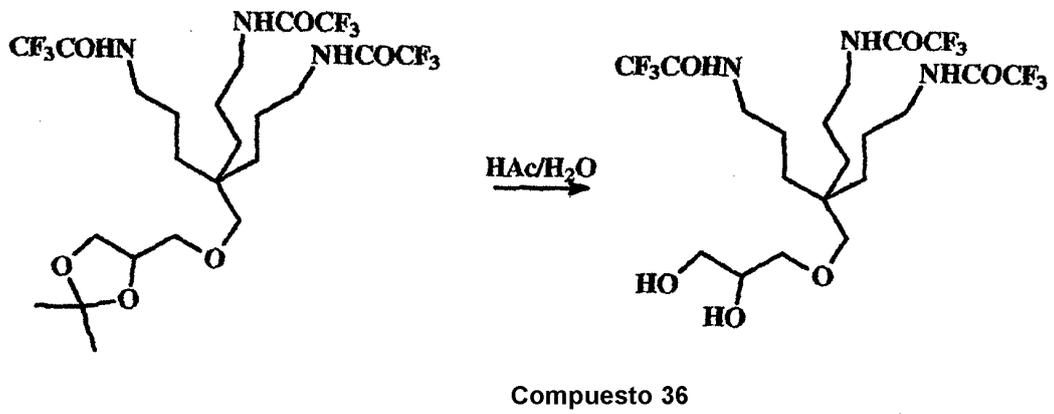
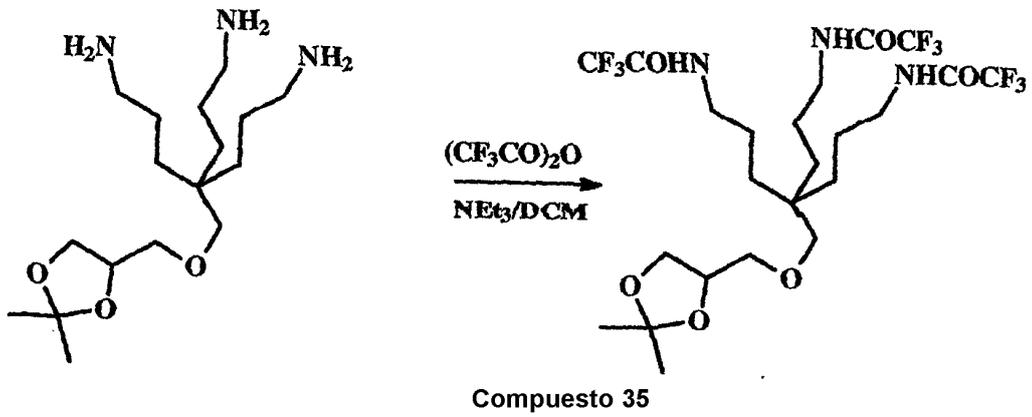


FIGURA 2.3

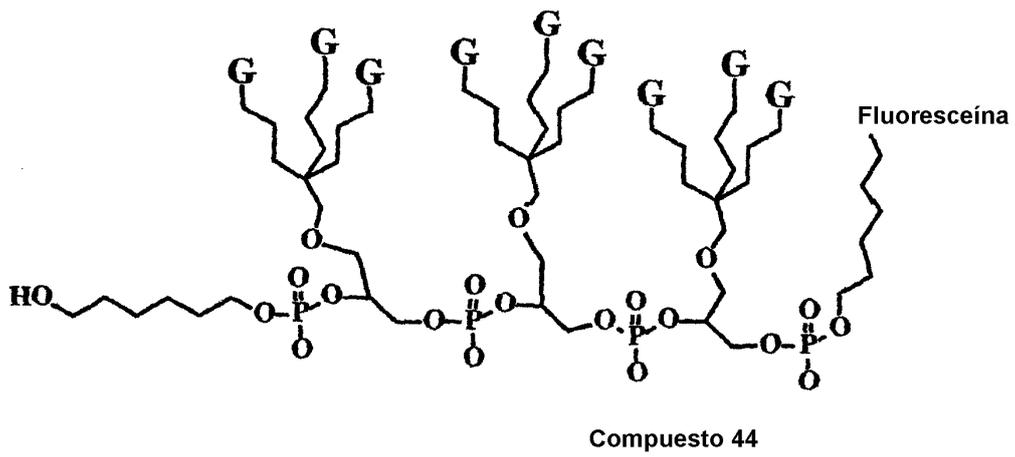
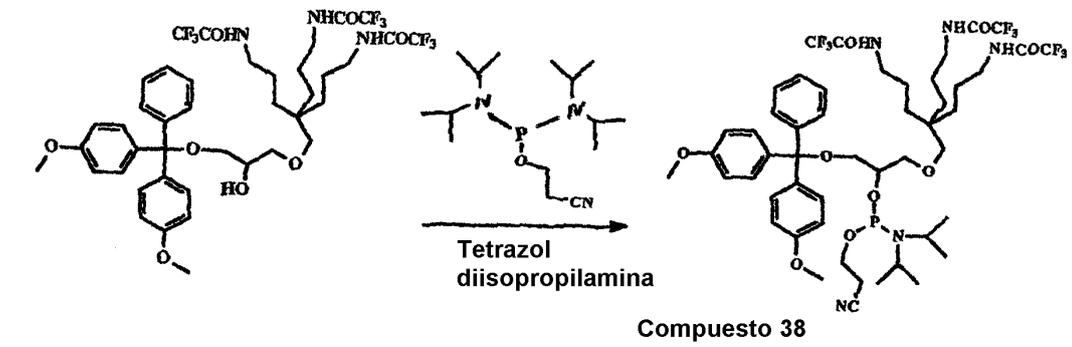


FIGURA 2.4