

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 615**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2002 E 10005431 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2431377**

54 Título: **Ácido L-nucleico modificado**

30 Prioridad:

26.10.2001 EP 01125630

01.08.2002 EP 02017300

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

11.08.2017

73 Titular/es:

NOXXON PHARMA AG (100.0%)

Max-Dohrn-Strasse 8-10

10589 Berlin, DE

72 Inventor/es:

LANGE, CHRISTIAN;

ESCHGFÄLLER, BERND y

KLUSSMANN, SVEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 629 615 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

Ácido L-nucleico modificado

La invención se refiere a ácidos L-nucleicos modificados, a su uso, así como a procedimientos para su preparación.

5 El desarrollo de nuevos conceptos terapéuticos recurre, junto al uso de moléculas orgánicas relativamente pequeñas, de manera creciente también a anticuerpos monoclonales, péptidos y ácidos nucleicos funcionales, es decir, aquellos ácidos nucleicos que se unen específicamente a una estructura diana. Representantes típicos de estos ácidos nucleicos funcionales son los denominados aptámeros que ya fueron desarrollados contra una pluralidad de diferentes biomoléculas. En este caso, partiendo de un banco de ácidos D-nucleicos, en varias etapas y mediante selección in-vitro, se aíslan una o varias moléculas de ácidos nucleicos, los denominados aptámeros, que se distinguen por una afinidad particularmente elevada frente a su estructura diana. Procedimientos para la preparación de aptámeros de este tipo se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 0 533 838.

10 En farmacología, se conoce ya desde hace tiempo el problema de la estabilidad y biodisponibilidad, expresada como la semivida biológica, de los principios farmacéuticamente activos administrados. Estrategias para alcanzar una semivida biológica que permita el efecto óptimo de las sustancias farmacéuticamente activas administradas se concentran, por una parte, en una modificación adecuada de los principios farmacéuticamente activos y, por otra, en el desarrollo de formas de administración adecuadas. En el primer caso, existen considerables limitaciones de manera que se ha de garantizar que el compuesto que presenta una semivida biológica elevada, es decir, un tiempo de permanencia en el organismo a tratar, no pierda sus propiedades farmacológicas, con otras palabras, su actividad, así como la provocación de los efectos secundarios menores posibles.

15 20 Junto a los aptámeros precedentemente mencionados, con los denominados spiegelmeros existe otra forma de ácidos nucleicos funcionales. También los spiegelmeros se unen específicamente a una secuencia diana en donde aquí, sin embargo, se selecciona utilizando un banco de ácidos D-nucleicos frente a la forma enantiomérica de la diana y los ácidos D-nucleicos que se unen a ellos se preparan acto seguido como ácidos L-nucleicos y éstos, como consecuencia de la reciprocidad quiral, se pueden unir a la diana propiamente dicha y no a la forma enantiomérica utilizada para el proceso de selección. Procedimientos para la preparación de spiegelmeros de este tipo se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 98/08856.

25 30 Vistos desde un punto puramente químico, los spiegelmeros son ácidos L-nucleicos, típicamente L-oligonucleótidos, que prácticamente no pueden ser degradados por enzimas naturales como consecuencia de su estructura a base de L-nucleótidos. Junto a la especificidad de la molécula diana, ésta califica esta propiedad para la aplicación en los más diversos sectores tales como, p. ej., análisis de muestra biológica, diagnóstico y terapia.

35 De manera similar a los otros compuestos químicos que encuentran aplicación en diagnóstico así como en terapia, en particular aquellos que se aplican en un organismo, existe, por consiguiente, también para los spiegelmeros una necesidad de transformar a éstos en una forma que permita que los spiegelmeros estén presentes en el organismo a lo largo de un espacio de tiempo prolongado y sean eficaces. En este caso, es otra misión en la que se basa la presente invención el que mediante la modificación no se afecte la especificidad de la molécula diana característica para los spiegelmeros.

El problema en el que se basa la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas. Formas de realización preferidas resultan de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

40 Con más exactitud, el problema se resuelve conforme a la invención en un primer aspecto mediante un ácido L-nucleico modificado que comprende una parte de ácido L-nucleico y una parte de ácido no L-nucleico, estando la parte de ácido L-nucleico conjugada con la parte de ácido no L-nucleico, siendo la parte de ácido L-nucleico un spiegelmero y presentando la parte de ácido no L-nucleico un peso molecular mayor que 300 Da, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, conduciendo la conjugación de la parte de ácido L-nucleico con la parte de ácido no L-nucleico a una secreción ralentizada a partir del organismo, comparada con un ácido L-nucleico que comprende sólo la parte de ácido L-nucleico.

45 50 En un segundo aspecto, el problema en el que se basa la invención se resuelve mediante un ácido L-nucleico modificado que comprende una parte de ácido L-nucleico y una parte de ácido no L-nucleico, estando la parte de ácido L-nucleico conjugada con la parte de ácido no L-nucleico, siendo la parte de ácido L-nucleico un spiegelmero y presentando la parte de ácido no L-nucleico un peso molecular mayor que 300 Da, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, conduciendo la conjugación de la parte de ácido L-nucleico con la parte de ácido no L-nucleico a un tiempo de permanencia prolongado en el organismo, comparado con un ácido L-nucleico que comprende sólo la parte de ácido L-nucleico.

55 En una forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que la parte de ácido L-nucleico esté conjugada con la parte de ácido no L-nucleico y que la parte de ácido no L-nucleico presente un peso molecular mayor que aproximadamente 20.000 Da y preferiblemente mayor que aproximadamente 40.000 Da.

En otra forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención está previsto que el ácido L-nucleico modificado presente un peso molecular de aproximadamente 600 a 500.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 10.000 a 400.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 50.000 a 300.000 Da.

5 Todavía en otra forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención está previsto que la parte de ácido L-nucleico presente un peso molecular de 300 a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 25.000 Da, preferiblemente de 7.000 a 15.000 Da.

10 Finalmente, en una forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención está previsto que la parte de ácido no L-nucleico esté enlazada directa o indirectamente a la parte de ácido L-nucleico a través de un grupo funcional de la parte de ácido L-nucleico, el cual está presente o unido a uno de los siguientes componentes del ácido L-nucleico, eligiéndose el grupo funcional del grupo que comprende fosfatos terminales y no terminales, porciones de azúcares terminales y no terminales y bases de purina naturales y no naturales y bases de pirimidina naturales y no naturales.

15 En una forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que el enlace de la parte de ácido no L-nucleico con la parte de ácido L-nucleico se presente a través del grupo 2'-OH, 3'-OH y/o 5'-OH o de un derivado del mismo de una o varias de las porciones de azúcares de la parte de ácido L-nucleico.

En otra forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que el enlace se presente a través de al menos una de las posiciones 5 o 6 de la base de pirimidina.

20 En otra forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que el enlace se presente a través de al menos una de las bases de purina.

Todavía en otra forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que el enlace se presente a través de al menos una de las posiciones 8 de las bases de purina.

25 Finalmente, en una forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que el enlace se presente en uno o varios de los grupos amina y/o grupos ceto exocíclicos y/o endocíclicos de las bases de purina y/o pirimidina y/o de la o las posiciones abásicas.

En una forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que la parte de ácido no nucleico se elija del grupo que comprende poli(etilen)glicol lineal, poli(etilen)glicol ramificado, hidroxietil-almidón, péptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, polioxipropileno, polioxiamidatos, poli(2-hidroxietil)-L-glutamina, polietilenglicol preciso.

30 En una forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que entre la parte de ácido L-nucleico y la parte de no ácido L-nucleico esté dispuesto un enlazador.

En otra forma de realización de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que la parte de ácido L-nucleico comprenda un ácido nucleico conforme a SEQ ID NO. 1

35 En una forma de realización preferida de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que la parte de ácido L-nucleico en el extremo 5'-OH presente como enlazador 6-aminohexilfosfato.

En una forma de realización particularmente preferida de los ácidos L-nucleicos modificados de acuerdo con la invención, está previsto que a la amina libre del enlazador de aminohexilfosfato esté acoplado un polietilenglicol.

En un tercer aspecto, el problema se resuelve mediante el uso de los ácidos L-nucleicos de acuerdo con la invención como diagnóstico o agente diagnóstico.

40 En un cuarto aspecto, el problema en el que se basa la invención se resuelve mediante el uso de los ácidos L-nucleicos modificados conforme a la invención para la preparación de un medicamento.

Además, se da a conocer un procedimiento para la provisión de un ácido L-nucleico modificado, en particular de los ácidos nucleicos conformes a la invención, que comprende una parte de ácido L-nucleico y una parte de ácido no L-nucleico, estando previstas las siguientes etapas:

- 45 a) proporcionar un ácido L-nucleico que configure la parte de ácido L-nucleico o una parte del mismo del ácido L-nucleico modificado;
- b) proporcionar un ácido no L-nucleico que configure la parte de ácido no L-nucleico o una parte del mismo del ácido L-nucleico modificado; y
- c) hacer reaccionar el ácido L-nucleico de a) y del ácido no L-nucleico de b), y
- 50 d) opcionalmente, aislar el ácido L-nucleico modificado obtenido en la etapa c).

En el caso del procedimiento está previsto que el ácido L-nucleico en la etapa a) comprenda un enlazador.

En el procedimiento está previsto, además, que después de la provisión del ácido L-nucleico en la etapa a), éste sea provisto de un enlazador.

5 Además, está en el marco de la presente divulgación el que la parte de ácido no L-nucleico comprenda un enlazador o bien que después de la provisión del ácido no L-nucleico en la etapa b), éste sea provisto de un enlazador.

10 La presente invención se funda en el reconocimiento sorprendente de que en el caso de utilizar ácidos L-nucleicos en un organismo tal como, p. ej., un organismo de mamífero, y de manera muy particularmente preferida en el caso de un mamífero que preferiblemente se elija del grupo que comprende el hombre, monos, perros, gatos, ovejas, cabras, conejos, cobayas, ratones y ratas, ciertamente no se metabolizan ácidos L-nucleicos, lo cual se justifica debido a que las nucleasas que se presentan por norma general en organismos de este tipo no reconocen como sustrato a ácidos L-nucleicos en virtud de su estereoespecificidad, no obstante, la semivida biológica de los ácidos L-nucleicos en el citado organismo es relativamente baja. Así, se comprobó que en el caso de la administración in vivo de ácidos L-nucleicos no modificados con una secuencia aleatoria en ratas y monos, la semivida oscilaba entre 30 minutos y 6 horas. También en el caso de utilizar un ácido L-nucleico, es decir, un spiegelmero, que está dirigido 15 contra una molécula diana presente en el organismo investigado, se confirmó la observación precedente de una semivida biológica relativamente corta, lo cual confirma que ésta no se basa en un artefacto como consecuencia de la no especificidad del ácido L-nucleico, Además, los autores de la presente invención han comprobado que la semivida de ácidos L-nucleicos no modificados es aproximadamente igual que la semivida de ácidos D-nucleicos no modificados. En este caso, la estabilidad de los ácidos L-nucleicos no modificados está claramente incrementada frente a la estabilidad de ácidos D-nucleicos no modificados. Se pudo entonces demostrar, sorprendentemente, que mediante la modificación aumentó más intensamente la semivida de ácidos L-nucleicos que en el caso de la modificación de ácidos D-nucleicos. Por consiguiente, como consecuencia de la modificación de ácidos nucleicos se produce, de manera totalmente inesperada, una modificación de la semivida de los ácidos L-nucleicos modificados en comparación con la semivida de los ácidos D-nucleicos modificados, cuyas semividas se asemejan, por lo demás, a la forma no modificada. Con otras palabras, sólo como consecuencia de la modificación puede realizarse el efecto deseado de una semivida prolongada de ácidos nucleicos funcionales, lo cual, sin embargo, sólo es posible utilizando ácidos L-nucleicos modificados y no, por ejemplo, utilizando ácidos D-nucleicos modificados. En el caso concreto precedentemente descrito se trata de un spiegelmero para el agonista hormonal hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que fue administrado a ratas machos orquidectomizadas. La GnRH estimula la síntesis y liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) gonadotropina y la hormona luteinizante (LH). En el caso de ratas machos orquidectomizadas, en virtud de la carente señal de retroalimentación de testosterona, se presentan niveles incrementados de FSH y LH. El spiegelmero específico condicionó una disminución clara del nivel de LH en un primer estudio (100 mg/kg, aplicación s. c.), no obstante, ya después de unas pocas horas, pudo observarse una disminución de la efectividad del spiegelmero. En una realización del mismo estudio con el conjugado de spiegelmero para GnRH-PEG correspondiente (150 mg/kg, aplicación i.v.) pudo observarse, por el contrario, una disminución completa del nivel de LH que seguía permaneciendo totalmente disminuido a lo largo de un espacio de tiempo de 24 horas. El conjugado spiegelmero para GnRH-PEG representa un ejemplo de un ácido L-nucleico modificado de acuerdo con la invención. El spiegelmero para GnRH corresponde en este caso a la parte de ácido L-nucleico y el PEG a la parte de ácido no L-nucleico.

40 Estos resultados demuestran que el tiempo de permanencia de ácidos L-nucleicos tales como spiegelmeros en un organismo puede prolongarse mediante una modificación, en particular una modificación de alto peso molecular del ácido L-nucleico. La modificación del ácido L-nucleico tiene lugar mediante el enlace del mismo con un ácido no L-nucleico. Sin desear estar limitado por ello, la sorprendente observación parece estar justificada debido a que, como consecuencia del peso molecular elevado del ácido L-nucleico modificado de este modo y de la carente capacidad de metabolización del ácido L-nucleico se ralentiza la secreción del ácido L-nucleico modificado a partir de un organismo, en particular un organismo mamífero. Dado que la segregación tiene lugar típicamente a través de los riñones, actualmente se parte del hecho de que la tasa de filtración glomerular de los riñones en relación con los ácidos L-nucleicos modificados está significativamente reducida frente a la de los ácidos L-nucleicos no modificados, lo cual conduce a un tiempo de permanencia incrementado, es decir, una semivida biológica del ácido L-nucleico modificado en comparación con el tiempo de permanencia del correspondiente ácido L-nucleico, pero no modificado.

55 Particularmente notable es a este respecto el hecho de que, a pesar de la modificación realizada, aparentemente no pierde nada de su especificidad el ácido L-nucleico modificado, es decir, en particular la parte del ácido L-nucleico responsable de la especificidad para la molécula diana. Con ello, los ácidos L-nucleicos modificados conformes a la invención presentan, de manera totalmente sorprendente, aquellas propiedades que, por lo demás, no pueden realizarse en otros compuestos farmacéuticamente activos de que, a saber, se renuncia a numerosas formulaciones galénicas, p. ej., en forma de preparados de depósito que entregan sucesivamente el principio activo, y más bien puede realizarse una modificación directa del principio activo en cuestión, sin que en este caso se influya negativamente en su actividad biológica, en el caso de los spiegelmeros, en particular expresada como especificidad de la reacción o formación del complejo con su molécula diana respectiva. Con otras palabras, los ácidos L-nucleicos modificados conformes a la invención superan la incompatibilidad existente por lo demás en el caso de principios activos farmacéuticos y, en particular, en moléculas pequeñas de principio activo de la actividad específica del principio activo farmacéutico con un aumento de su tiempo de permanencia en un organismo, en particular con

una reducción de la secreción tal como, por ejemplo, de la tasa de filtración glomerular. En este caso, es notable el hecho de que la afinidad de la parte de ácido L-nucleico permanece esencialmente invariable mediante la conjugación con la parte de ácido no L-nucleico.

5 Lo anteriormente dicho es válido, naturalmente, no sólo para el caso de la aplicación de ácidos L-nucleicos modificados tales como spiegelmeros como agentes terapéuticamente eficaces, sino también para su uso como
agentes de diagnóstico, en particular en el caso de su uso como diagnósticos in vivo. Un ejemplo típico del uso de
spiegelmeros como diagnósticos in vivo lo representa la formación de imágenes in vivo y, en este caso, en particular,
10 el uso de spiegelmeros portadores de radionucleidos para la tomografía por emisión de positrones. En el caso de
esta aplicación, se establece que el radionucleido permanezca en el cuerpo durante un espacio de tiempo definido.
Si el radionucleido y, con ello, la radiactividad permaneciera en el organismo a lo largo de un espacio de tiempo
prolongado, debiéndose entender prolongado como necesario con el fin de llevar a cabo el examen respectivo, esto
iría acompañado para el paciente de una exposición a radiación radiactiva innecesaria, en algunos casos
posiblemente incluso perjudicial para la salud. Por otra parte, para el caso de que la secreción del agente
15 diagnóstico y, con ello, del marcaje radiactivo a partir del cuerpo tenga lugar de manera demasiado rápida, esto
conduciría a que no sería posible un diagnóstico o afirmación diagnóstica adecuado. Con la disponibilidad de los
ácidos L-nucleicos modificados conformes a la invención puede ajustarse de manera optimizada, en función de los
requisitos respectivos, el agente diagnóstico en relación con su tiempo de permanencia, es decir, su semivida
biológica. Esto se justifica de manera determinante con la observación de que la tasa de filtración glomerular se
20 reduce fuertemente a partir de un peso molecular mayor que aproximadamente 45.000 Da. Por lo demás, la
secreción, en particular, la tasa de filtración glomerular se correlaciona de manera inequívoca con el tamaño de la
molécula. Mediante el uso de una parte de ácido no L-nucleico adecuada tal como, por ejemplo, la descrita en esta
memoria, puede adaptarse el tiempo de permanencia del ácido L-nucleico modificado de manera exacta a los
requisitos.

25 La naturaleza química de la parte de ácido no L-nucleico del ácido L-nucleico modificado puede configurarse
prácticamente de forma libre en el marco de determinados límites. Un requisito establecido al ácido nucleico
modificado que se administra a un organismo, que debería darse en la mayoría de los casos de aplicación del ácido
L-nucleico modificado, estriba en que la parte de ácido no L-nucleico se compone de uno o varios compuestos no
inmunógenos. Alternativamente, pero eventualmente de manera complementaria a ello, puede tratarse en este caso
de compuestos lipofílicos, al igual que de compuestos hidrofílicos. Para el experto en la materia es evidente que, en
30 función de las condiciones marco del caso individual puede recurrirse posiblemente también a compuestos
ligeramente inmunógenos, en particular cuando la administración del ácido L-nucleico modificado de acuerdo con la
invención no debe tener lugar a lo largo de un espacio de tiempo prolongado o múltiples veces, sino únicamente una
vez. A la inversa, este aspecto es particularmente importante cuando los ácidos L-nucleicos modificados conforme a
la invención deben ser administrados a lo largo de un espacio de tiempo prolongado o múltiples veces. En este caso,
35 por norma general debe asegurarse que mediante la parte de ácido no L-nucleico del ácido L-nucleico modificado no
se genere respuesta inmunológica alguna en el caso de la aplicación del ácido L-nucleico modificado, la cual
conduciría, en el caso de una administración renovada del mismo, a una reacción inmunológica o alérgica.

40 La configuración de la parte de ácido no L-nucleico del ácido L-nucleico modificado puede tener lugar en este caso
también de manera que más de una parte de ácido no L-nucleico se une o conjuga a una parte de ácido L-nucleico.
Por ejemplo, es posible unir dos o más partes de ácido no L-nucleico a la parte de ácido L-nucleico. La parte de
ácido no L-nucleico individual es preferiblemente un polímero, pudiendo presentar las subunidades del polímero un
peso molecular relativamente bajo. También se encuentra dentro del marco de la presente invención el que más de
una parte de ácido L-nucleico esté unida a una parte de ácido no L-nucleico

45 Otro aspecto que ha de tenerse en cuenta en el caso de la elección de la parte de ácido no L-nucleico del ácido L-
nucleico modificado consiste en la asignación de los spiegelmeros a determinados compuestos, en particular a
determinados órganos o células. Aquí, en función de las relaciones específicas, la parte de ácido no L-nucleico
puede adaptarse de manera que, independientemente de la especificidad de la unión del spiegelmero o del ácido L-
nucleico modificado, condicionada por la parte de ácido L-nucleico, el ácido L-nucleico modificado se acumule
preferiblemente en determinadas células, tejidos u órganos.

50 Típicamente, el peso molecular de la parte de ácido no L-nucleico oscila entre 300 y 500.000 Da. La parte de ácido
L-nucleico puede acoplarse individualmente, múltiples veces o en todas las combinaciones arbitrarias con otras
parte de ácido no L-nucleico en los mismos o distintos lugares de la parte de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico
modificado.

55 Se encuentra dentro del marco de la presente invención el que el peso molecular del ácido L-nucleico modificado
sea fuertemente determinado por la parte de ácido no L-nucleico. Básicamente, el ácido L-nucleico modificado
puede presentar un peso molecular de aproximadamente 600 a 500.000 Da, preferiblemente de aproximadamente
10.000 a 400.000 Da y de manera preferida de aproximadamente 50.000 a 300.000 Da. Intervalos menores del peso
molecular se realizan, por ejemplo, mediante ácidos L-nucleicos modificados de este tipo que son conjugados de
60 colesterol y que presentan típicamente un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a 25 kDa. Intervalos
mayores del peso molecular se realizan, por ejemplo, mediante ácidos L-nucleicos modificados de este tipo que son
conjugados de HES y que, a menudo, presentan un peso molecular de aproximadamente 100 kDa a 500 kDa. Para

el caso de que los ácidos L-nucleicos modificados sean conjugados de PEG, el peso molecular preferido es de aproximadamente 40 a 70 kDa.

Como parte de ácido no L-nucleico se puede utilizar, por ejemplo:

- 5 - Poliéteres y alcoxipoliéteres tales como, p. ej., poli(etilen)glicoles (PEG) lineales o ramificados, metoxipoli(etilen)glicoles, etoxipoli(etilen)glicoles, PEG precisos (en donde PEG preciso es una poliamida de la forma -NH-Y-NH-CO-X-CO-), pudiendo variarse Y y X en cualquier punto como $(-CH_2CH_2O)_p$, con diferentes p en el intervalo de 4-6), poli(2-hidroxietil)-L-glutamina y polioxipropilenos que se distinguen, en particular, porque por su parte no son metabolizables in vivo y en la medida en que el efecto condicionado por el tamaño, es decir, el peso molecular del ácido L-nucleico modificado, de la secreción controlada está marcado de manera particularmente duradera y no se superponen a la parte de ácido no L-nucleico mediante procesos de degradación.
- 10 - Péptidos, polipéptidos y proteínas tales como, p. ej., albúmina, pudiéndose tratar en el caso de estos compuestos tanto de sustancias presentes de forma natural como también añadidas desde fuera.
- 15 - Polisacáridos tales como, p. ej., hidroxietil-almidón, dextranos, son por su parte metabolizables y pueden influir de manera muy específica sobre el tiempo de permanencia como consecuencia de la tasa de degradación controlable con precisión. El peso molecular del hidroxietil-almidón utilizado en una forma de realización oscila entre 10 kDa, preferiblemente en 40 kDa y 400 kDa, preferiblemente entre 100 kDa y 300 kDa. El hidroxietil-almidón tiene un grado de sustitución molar de 0,1 a 0,8 y una relación de $C_2 : C_6$ en el intervalo de 2 a 20. En relación con el acoplamiento de los polisacáridos a la parte de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado se cumple lo dicho en esta memoria en relación con la porción de azúcar de los ácidos L-nucleicos en relación con el uso de los grupos OH y de su derivatización.
- 20 - Esteroles tales como, p. ej., colesterol. Ciertamente, los esteroles se distinguen por un peso molecular relativamente bajo, pero también éste puede conducir ya a un aumento del tiempo de permanencia del ácido L-nucleico modificado con los mismos. De gran importancia a este respecto es, sin embargo, evaluar el comportamiento de los esteroles, en particular de colesterol que in vivo forma un complejo no covalente con lipoproteínas tal como, por ejemplo, HDL, con lo cual se alcanza un aumento de las moléculas y, con ello, una mayor semivida in vivo.
- 25

Básicamente, se encuentra en el marco de la presente invención que la parte de ácido no L-nucleico sea configurada también por uno o varios D-nucleósidos o bien D-nucleótidos, pudiendo presentar éstos individualmente o en conjunto otras modificaciones tales como, por ejemplo, modificaciones para el aumento de la estabilidad en sistemas biológicos. Modificaciones de este tipo lo representan, por ejemplo, la fluoración en la posición 2' del componente azúcar de los nucleótidos o bien nucleósidos. Además, estos D-nucleósidos y D-nucleótidos pueden representar un componente de los distintos ácidos no L-nucleicos, en particular de aquellos de los precedentemente mencionados, pero también parte de un enlazador descrito en esta memoria. En este caso, se encuentra dentro del marco de la presente invención el que distintos o varios de los D-nucleósidos o D-nucleótidos puedan comprender también una o más posiciones abásicas.

El enlace de la parte de ácido L-nucleico con una o varias de las partes de ácido no L-nucleico puede tener lugar básicamente en todos los componentes o agrupaciones de las dos partes que constituyen el ácido L-nucleico modificado, pudiendo estar previsto también que tengan lugar derivatizaciones en uno o varios puntos de una o de ambas partes, es decir, en el ácido L-nucleico al igual que en la o las partes de ácido no L-nucleico. El enlace puede tener lugar, en particular, en el grupo 5'-OH, 3'-OH o 2'-OH del ácido L-nucleico, en particular de la parte de ribosa o desoxirribosa.

En este caso, se encuentra también en el marco de la presente invención el que al menos una parte de los componentes de azúcar de los nucleótidos que constituyen el ácido L-nucleico pueden presentar otro azúcar que no sea ribosa o desoxirribosa. Azúcares de este tipo pueden ser, por ejemplo, otras pentosas tales como, por ejemplo, arabinosa, pero pueden contener también hexosas o tretosas, o también un átomo de nitrógeno tal como, por ejemplo, en un anillo morfolino o un aza- o tio-azúcar u otras modificaciones de azúcares tales como en ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Estos grupos OH pueden presentarse mediante modificación química adecuada en forma de grupos NH_2 , SH, aldehído, ácido carboxi, fosfato, yodo, bromo o cloro. El experto en la materia conoce otros grupos funcionales que permiten un acoplamiento a la parte de ácido L-nucleico. En la medida en que en esta memoria se describa el enlace de una parte de ácido no L-nucleico con un ácido L-nucleico, son válidas las explicaciones análogamente también para el caso de que se una más de una parte de ácido no L-nucleico a la parte de ácido L-nucleico o se presente unida a la misma, en la medida en que no se haga ninguna declaración al contrario.

Se encuentra además en el marco de la presente invención el que al menos una parte de los grupos fosfato de los nucleótidos que constituyen el ácido L-nucleico modificado presenten modificaciones. Modificaciones de este tipo son, por ejemplo, fosfotioatos, fosfoditioatos, fosforoamidatos, fosfonatos y otras modificaciones conocidas por los expertos en la materia.

Junto al enlace la parte de ácido L-nucleico a la parte de ácido no L-nucleico a través de la parte de azúcar de la parte de ácido L-nucleico puede tener lugar el enlace al igual que en la cadena principal del fosfato, pudiendo tener lugar también aquí, en relación con el enlace a través de la porción de ribosa o desoxirribosa del ácido L-nucleico indicado, una correspondiente modificación. Finalmente, son posibles enlaces a través de la posición 5 y/o 6 de la o las bases de pirimidina, la posición 8 de la o las bases de purina así como sus grupos amino y ceto exocíclicos y endocíclicos de la respectivas nucleobases, eventualmente también después de una modificación funcional de las mismas tal como se ha explicado precedentemente. Junto a bases naturales, el ácido L-nucleico puede contener también una o más bases no naturales tales como, p. ej., isoguanidina, isocitidina, xantosina, inosina, 2,4-diaminopirimidina. En este caso, se encuentra dentro del marco de la presente invención el que uno cualquiera de los enlaces descritos en esta memoria entre la parte de ácido L-nucleico y la parte de ácido no nucleico pueda tener lugar directa o indirectamente. Un enlace indirecto se presenta particularmente cuando entre la parte de ácido L-nucleico y la parte de ácido no L-nucleico esté dispuesto un enlazador, por ejemplo un enlazador descrito en esta memoria, y éste proporcione uno o ambos de los grupos funcionales.

Se encuentra también en el marco de la presente invención el que entre la parte de ácido L-nucleico y la o las partes de ácido no L-nucleico puedan incorporarse uno o varios denominados enlazadores. Un enlazador de este tipo se compone típicamente de al menos un grupo funcional, así como un distanciador o espaciador. La función del enlazador puede consistir, por una parte, en facilitar la reacción de acoplamiento. Adicional o alternativamente a ello, puede asociarse al mismo una función de manera que se constituya una distancia en el espacio entre la parte de ácido L-nucleico y la parte de ácido no L-nucleico del ácido L-nucleico modificado. Una distancia de este tipo es ventajosa bajo determinadas circunstancias, p. ej., cuando se hayan de impedir interacciones entre las partes que constituyen el ácido L-nucleico modificado, en particular entre la parte de ácido L-nucleico y la parte de ácido no L-nucleico o entre dos o más partes de ácido no L-nucleico del ácido L-nucleico modificado.

El enlazador propiamente dicho puede comprender de nuevo uno o más grupos funcionales y estar acoplado a éstos en uno de los puntos arriba mencionados de la parte de ácido L-nucleico. Típicamente, el espaciador se compone, entre otros, de cadenas de alquilo de diferente longitud, siendo preferida una longitud de cadena de 1 a 20, en particular de 4 a 15 y de manera muy particular de 6 a 12 átomos de C. La cadena de alquilo propiamente dicha puede estar ramificada o puede portar otros grupos funcionales. Una forma de realización típica del espaciador comprende enlaces éter entre distintos monómeros tal como están presentes p. ej., en el caso de poli(etileno)glicol o polioxiopropileno, estando presentes de 1 a 20 veces en este caso a menudo los distintos monómeros en los polímeros. También en el caso de la configuración del espaciador mediante cadenas de poliaminoalquilo o poliamidoalquilo es habitual una frecuencia de los monómeros que constituyen estos polímeros con un valor de 1 a 20.

El enlazador puede estar acoplado a uno de los L-nucleótidos que configuran la parte de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado. Alternativamente, el enlazador puede ser incorporado en el oligómero resultante también durante la síntesis enzimática o química del ácido L-nucleico. Además de ello, se encuentra dentro del marco de la presente invención el que el ácido L-nucleico sea modificado post-síntesis y, con ello, sea provisto de un enlazador para el acoplamiento de una parte de ácido no L-nucleico.

Está también dentro del marco de la presente invención el que un enlazador se incorpore, por ejemplo, en una posición abásica en un bucle de horquilla o en el extremo 3' o 5' o en otra posición. Si en el caso del ácido L-nucleico se trata de un spiegelmero, la posición abásica puede estar incorporada en una posición del spiegelmero que no es esencialmente importante para la unión de la molécula diana o bien para la estructura del spiegelmero. Por posición abásica se ha de designar en esta memoria un lugar de la parte del ácido L-nucleico que, análogamente a un L-nucleótido normal, posea la misma cadena principal a base de fosfato y azúcar en la que la nucleobase esté sustituida sin embargo mediante un átomo de hidrógeno o un enlazador, tal como se representa esto también la Fig. 24.

Los ácidos L-nucleicos modificados, que en esta memoria se denominan también conjugados de ácido L-nucleico, pueden prepararse, como ya se puede ver por la exposición arriba indicada en relación con los lugares de enlace entre la parte de ácido L-nucleico y la parte de ácido no L-nucleico, por una pluralidad de reacciones que en lo que sigue se expone con detalle

- amidas de ácido pueden prepararse mediante reacción de N-hidroxisuccinimida (NHS) o activaciones similares de ácidos carboxílicos tales como anhídrido, cloruro de ácido, éster, succinimida y maleimida, con una amina primaria o secundaria ^{1,2}.

- Tioéteres pueden prepararse partiendo de un haluro y un tiol ^{3,4} y, a continuación, pueden ser objeto de una oxidación en sulfóxido o sulfona ^{5,6}. Los haluros, en particular haloacetilo (ácido yodoacético, ácido bromoacético) pueden ser acoplados a un grupo funcional arbitrario de una de las dos partes de ácido L-nucleico por cada enlace éster o amida de ácido y, a continuación, el grupo yodo o bromo muy reactivo puede ser acoplado con un tiol libre. Por consiguiente, haloacetilo representa un caso especial del acoplamiento de haluro-tiol ⁷. Tioéteres pueden prepararse, además, partiendo de maleimida y tiol ⁷⁻⁹, la isotiourea a partir de isotiocianato y amina ¹⁰, la isourea partiendo de isocianato y amina ¹¹, el carbamato partiendo de isocianato y alcohol ¹², los enlaces C-C mediante la reacción de Diels-Alder ¹³, los heterociclos mediante cicloadición 1,3-dipolar ¹³, las aminas mediante aminación reductora, a continuación de la reacción de, por ejemplo, aldehído o cetona con una amina bajo subsiguiente

reducción¹⁴, la amida de ácido partiendo de un ácido y una amina^{15,16}, los ésteres partiendo de ácido carboxílico o de los ácidos carboxílicos activados arriba mencionados y alcohol, sulfonamida partiendo de amina y cloruro de sulfonilo¹⁷, aminas secundarias partiendo de un epóxido y una amina^{18,19}, tioéter partiendo de un epóxido y un tiol²⁰, disulfuro partiendo de un tiol y otro tiol o un disulfuro^{21,22}, hidrazonas partiendo de una hidrazina y un aldehído o una cetona, pudiendo reducirse la hidrazona adicionalmente para formar una hidrazina modificada estable²³, fosfotioatos partiendo de un fosfato o de un ácido fosfórico activado tal como, por ejemplo, fosforoimidazolida y un tiol²⁴, fosforoamidato partiendo de un fosfato o de un ácido fosfórico activado tal como, por ejemplo, fosforoimidazolida o fos-N-hidroxi-benzotriazol y una amina²⁴⁻²⁷. En este caso, se encuentra en el marco de la presente invención acoplar primeramente un enlazador a través de un enlace fosforoamidato o fosfotioato a la parte de ácido L-nucleico y, a continuación, a la parte de ácido no L-nucleico. Enlazadores de este tipo pueden ser, en particular, etilendiamina o cisteamina.

Las explicaciones precedentes son válidas básicamente tanto para el caso de que el grupo lábil reactivo mencionado en primer lugar no esté dispuesto en la parte de ácido no L-nucleico, como para el caso de que esté dispuesto en la parte de ácido L-nucleico. La correspondiente modificación del ácido L-nucleico, en el sentido de que se proporcione un correspondiente grupo reactivo, es conocida por los expertos en este sector. Lo mismo es válido para la parte de ácido no L-nucleico.

La expresión ácido L-nucleico se utiliza en esta memoria de manera sinónima a la expresión L-oligonucleótidos o L-polinucleótidos y designa, entre otros, tanto ácido L-desoxirribonucleico como también ácido L-ribonucleico y combinaciones de los mismos, es decir, que grupos individuales o un grupo de nucleótidos se presenta en forma de ARN y los otros nucleótidos que constituyen el ácido nucleico se presentan en forma de ADN, y viceversa. También en este caso está previsto que, en lugar de desoxirribosa o ribosa, otros azúcares configuren el componente azúcar del nucleótido. Está comprendido, además, el uso de nucleótidos con otras modificaciones en la posición 2' tales como NH₂, OMe, OEt, Oalquilo, NHalquilo y el uso de nucleobases naturales o no naturales tales como, por ejemplo, isocitidina, isoguanosina. Se encuentra en este caso también en el marco de la presente invención que el ácido L-nucleico presente las denominadas posiciones abásicas, es decir, nucleótidos a los que les falta la nucleobase. Posiciones abásicas de este tipo pueden estar dispuestas tanto dentro de la secuencia de nucleótidos del ácido L-nucleico como en uno o en los dos extremos, es decir, el extremo 5' y/o el extremo 3'.

Además, se encuentra en el marco de la presente invención que el ácido L-nucleico contenga uno o varios D-nucleósidos o D-nucleótidos. En este caso, el uno o los varios D-nucleósidos o D-nucleótidos pueden estar dispuestos dentro del ácido L-nucleico, al igual que en uno o los dos extremos del ácido L-nucleico. El D-nucleósido o el D-nucleótido individual puede portar en este caso una o varias modificaciones, por ejemplo para aumentar la estabilidad del nucleósido o bien nucleótido o bien su unión al ácido L-nucleico.

El ácido L-nucleico puede presentarse básicamente en forma de cadena doble o cadena sencilla. Típicamente, se trata de un ácido L-nucleico de cadena sencilla, el cual, sin embargo, condicionado por su secuencia primaria, puede configurar estructuras secundarias definidas y, con ello, también estructuras terciarias. En la estructura secundaria se presentan también tramos de doble cadena en el caso de una pluralidad de ácidos L-nucleicos.

Los ácidos L-nucleicos pueden designar, junto a la modificación de elevado peso molecular particularmente descrita en esta memoria, también modificaciones en relación con los distintos nucleótidos del ácido nucleico, pudiendo presentarse aquí, p. ej., el grupo 2'-OH de la porción de azúcar de los nucleótidos en forma de metiléter como ya se ha dado a conocer precedentemente.

En el caso de los ácidos L-nucleicos o bien partes de ácido L-nucleico descritos en esta memoria se trata preferiblemente de ácidos nucleicos funcionales. A los ácidos nucleicos funcionales pertenecen, entre otros, aptámeros, spiegelmeros, ribozimas y aptazimas. De manera preferida, los ácidos L-nucleicos o bien partes de ácido L-nucleico son spiegelmeros. Como ya se mencionó al comienzo, los spiegelmeros son ácidos nucleicos que se unen a una molécula diana o a una parte de la misma y están constituidos por L-nucleótidos, al menos en la parte del ácido nucleico que se une a la molécula diana. Preferiblemente, son el resultado de la puesta en contacto de un banco de ácidos nucleicos, en particular de un banco de ácidos nucleicos estadístico, con la molécula diana.

Para un procedimiento de selección para el desarrollo de ácidos nucleicos funcionales se preparan primeramente bancos de ADN combinatorios. Por norma general, se trata de la síntesis de oligonucleótidos de ADN que contienen en el centro una zona a base de 10-100 nucleótidos aleatorizados que están flanqueados por dos regiones de unión de cebadores en los extremos 5' y 3'. La preparación de bancos combinatorios de este tipo se describe, p. ej., en Conrad, R.C., Giver, L., Tian, Y. y Ellington, A.D., 1996, *Methods Enzymol.*, Vol 267, 336-367. Un banco de ADN de cadena sencilla sintetizado por vía química de este tipo se puede transformar, a través de la reacción en cadena de la polimerasa, en un banco de doble cadena que, tomado por sí solo puede ser empleado ya para una selección. Por norma general, una separación de las cadenas individuales tiene lugar, sin embargo, con métodos adecuados, de modo que se accede de nuevo a un banco de cadena sencilla que se emplea para el proceso de selección in vitro cuando se trata de una selección de ADN (Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. y Toole, J.J., 1992, *Nature*, Vol. 355, 564-566). Asimismo, sin embargo, es también posible emplear el banco de ADN sintetizado por vía química directamente en la selección in vitro. Además de ello, en principio, a partir de ADN de doble cadena, cuando previamente se ha introducido un promotor T7, es posible también, a través una polimerasa dependiente de ADN

adecuada, p. ej., la ARN polimerasa T7, generar un banco de ARN. Con ayuda de los procedimientos descritos es posible generar bancos de 10^{15} y más moléculas de ADN o ARN. Cada una de las moléculas de este banco tiene una secuencia diferente y, por consiguiente, una estructura tridimensional diferente. A través del proceso de selección *in vitro* es entonces posible aislar, a partir del banco mencionado, mediante varios ciclos de selección y
 5 amplificación, así como eventualmente mutación, una o varias moléculas de ADN que presentan una propiedad de unión significativa frente a una diana dada. Las dianas pueden ser, p. ej., virus, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, pequeñas moléculas tales como metabolitos del metabolismo, principios activos farmacéuticos o sus metabolitos u otros componentes químicos, bioquímicos o biológicos, por ejemplo los descritos en Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. y Yarus, 1995, Annu. Rev. Biochem. Vol. 64, 763-797 y Lorsch, J.R. y Szostak, J.W., 1996, Combinatorial Libraries, Synthesis, Screening and application potential, ed. Riccardo Cortese, Walter de Gruyter, Berlin. El procedimiento se lleva a cabo de modo que se aíslan moléculas de ADN o ARN de unión a partir del banco originalmente empleado y se amplifican después de la etapa de selección mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En el caso de selecciones de ARN se ha de anteponer, delante de la etapa de amplificación mediante
 10 reacción en cadena de la polimerasa, una transcripción inversa. Un banco enriquecido después de una primera ronda de selección puede emplearse entonces en una ronda de selección renovada, de modo que las moléculas enriquecidas en la primera ronda de selección tienen la posibilidad de recuperarse de nuevo mediante selección y amplificación y de pasar con todavía más moléculas hijas a otra ronda de selección. Al mismo tiempo, la etapa de la reacción en cadena de la polimerasa abre la posibilidad de incorporar nuevas mutaciones en el caso de la amplificación, p. ej., mediante la variación de la concentración salina. Después de muchas rondas de selección y amplificación suficientes se han establecido las moléculas de unión. De esta forma, se ha formado una agrupación enriquecida, cuyos representantes pueden ser individualizados mediante clonación y a continuación ser
 15 determinados con los métodos habituales de la determinación de la secuencia de ADN en su estructura primaria. Las secuencias obtenidas se examinan entonces en cuanto a sus propiedades de unión en relación con la diana. El procedimiento para la generación de aptámeros de este tipo se designa también como procedimiento SELEX y se describe, p. ej., en el documento EP 0 533 838, a cuya divulgación se hace referencia en esta memoria.

Las mejores moléculas de unión pueden acortarse mediante el acortamiento de las secuencias primarias a sus dominios de unión esenciales y prepararse mediante síntesis química o enzimática.

Una forma particular de aptámeros producibles de esta manera los denominados spiegelmeros que se distinguen esencialmente porque al menos en parte, de preferencia por completo están constituidos por los L-nucleótidos no
 30 naturales. Procedimientos para la preparación de spiegelmeros de este tipo se describen en el documento PCT/EP97/04726, cuya divulgación se recoge con ello como referencia. La particularidad del procedimiento descrito en dicho documento estriba en la generación de moléculas de ácido nucleico enantioméricas, es decir, de moléculas de ácido L-nucleico que se unen a una diana nativa, es decir, en la forma o configuración natural, o una estructura diana de este tipo. El proceso de selección *in vitro* arriba descrito se emplea para seleccionar ácidos nucleicos o secuencias de unión primeramente frente a los enantiómeros, es decir, la estructura que no se presenta de forma
 35 natural de una diana que se presenta de forma natural, por ejemplo en el caso de que la molécula diana sea una proteína, frente a una proteína D. Las moléculas de unión (D-ADN, D-ARN o bien correspondientes derivados D) así obtenidas se determinan en su secuencia, y la secuencia idéntica se sintetiza entonces con componentes nucleótidos especulares (L-nucleótidos o bien derivados de L-nucleótidos). Los ácidos nucleicos especulares y enantioméricos (L-ADN, L-ARN o bien correspondientes derivados L), así obtenidos, los denominados spiegelmeros, tienen por motivos de simetría una estructura terciaria especular y, por consiguiente, una propiedad de unión para la diana presente en forma o configuración natural.

Las moléculas diana precedentemente descritas, designadas también como diana, pueden ser moléculas o estructuras, así, p. ej., virus, viroides, bacterias, superficies de células, organelas celulares, proteínas, péptidos,
 45 ácidos nucleicos, pequeñas moléculas tales como metabolitos del metabolismo, principios activos farmacéuticos o sus metabolitos u otros componentes químicos, bioquímicos o biológicos.

La invención se explica adicionalmente en lo que sigue con ayuda de las figuras y ejemplos de los cuales resultan otras ventajas, formas de ejecución y características de la invención.

La Fig. 1 muestra un enlazador de hexilamina que dispone de un distanciador ("espaciador") lineal
 50 consistente en seis átomos de carbono, así como un grupo amino terminal y un radical fosfato terminal. La sustitución indicada con R puede representar en este caso también un ácido nucleico o bien la parte de ácido L-nucleico de un ácido L-nucleico modificado. A través del grupo amino, la parte de ácido no L-nucleico puede ser acoplada a la parte de ácido L-nucleico y, con ello, configurar el ácido L-nucleico modificado conforme a la invención.

La Fig. 2 muestra otros enlazadores, correspondiendo las estructuras designadas con (2), (4) y (6) a los enlazadores conformes a (1), (3) y (5), en donde en el caso de los últimos, sin embargo, la parte fosfato provista del radical R representa preferiblemente la parte de ácido L-nucleico y a través del grupo funcional designado con X, la parte de ácido no L-nucleico del ácido L-nucleico modificado es acoplada al ácido L-nucleico. La denominación "oligo" representa en este caso a modo de
 60 ejemplo un oligonucleótido, pudiendo tratarse también en el alcance de protección de la presente invención que en este caso o bien en el caso de los ácidos L-nucleicos o partes de ácido L-

nucleico se trata en esta memoria, en general, de L-polinucleótidos. Los distintos sustituyentes designan en este caso los siguientes grupos reactivos que individualmente y en cada caso independientemente uno de otro, son:

X = OH, NH₂, HS, Hal, CHO, COOH

5 Y = O, NH, NMe, S, CH₂

Z₁, Z₂, Z₃, Z₄, Z₅ y Z₆ = H, Me, alquilo, HO(CH₂)_n, HO, H₂N (CH₂)_n, H₂N, F, designando n un número entero entre 1 y 20 y designando alquilo cadenas hidrocarbonadas lineales y ramificadas con preferiblemente 1-20 átomos de C, de manera preferida 1 a 4 átomos de C, y/o -(CH₂)_nH, -CH[(CH₂)_nH][(CH₂)_mH], -C[(CH₂)_nH][(CH₂)_mH][(CH₂)_kH], -(CH₂)_n(CH)_m[(CH₂)_kH][(CH₂)_lH], -CH₂[(CH₂)_n(C)_m[(CH₂)_kH][(CH₂)_lH], en donde n, m, l, k y j, independientemente uno de otro, son números enteros ente 1 y 8, preferiblemente 1 a 4 átomos de C.

10

La Fig. 3

muestra una perspectiva de diferentes enlazadores que están acoplados a diversas posiciones de las nucleobases. En este caso, es notable que la porción de azúcar del nucleósido representado en cada caso pueda ser una ribosa, una desoxirribosa o una ribosa modificada o bien desoxirribosa modificada, y el radical X puede ser H, HO, H₂N, MeO, EtOH o alcoxi. Alcoxi designa en este caso, en particular, cadenas oxihidrocarbonadas lineales y ramificadas con 1-20 átomos de C, preferiblemente 1 a 4 átomos de C y/o -O(CH₂)_nH, -OCH[(CH₂)_nH][(CH₂)_mH], -OC[(CH₂)_nH][(CH₂)_mH][(CH₂)_kH], -O(CH₂)_n(CH)_m[(CH₂)_kH][(CH₂)_lH], -O(CH₂)_n(C)_m[(CH₂)_kH][(CH₂)_lH], siendo n, m, l, k y j, independientemente uno de otro, números enteros entre 1 y 20, preferiblemente 1 a 4 átomos de C. La estructura del enlazador propiamente dicha es en el caso de los cuatro nucleósidos (1), (2), (3) y (4) representados X₁-[Y]_n, en donde n es un número entero entre 0 y 20, X₁ representa un grupo funcional que se elige del grupo que comprende HO, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR y COHal. En el caso de los enlazadores indicados en las fórmulas estructurales (5-12), n es asimismo un número entero entre 0 y 20 y Z significa, independientemente de los otros sustituyentes, O, NH, NR o S, representando R alquilo tal como se define en esta memoria.

15

20

25

La Fig. 4

muestra posibles enlazadores en la posición 5 de nucleósidos o bien nucleótidos de pirimidina. En relación con los radicales R', R'' y R''' se cumple análogamente lo indicado en relación con la Fig. 5. El enlazador R presenta la estructura -[Y]_n-X₁ y puede adoptar preferiblemente las formas mostradas en las estructuras (2) a (9), pudiendo significar también aquí Z, independientemente de la elección de los otros sustituyentes, O, NH, NHR o S y n puede ser un número entero entre 1 y 20. El grupo funcional X₁ se elige preferiblemente del grupo que presenta HO, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR y COHal.

30

La Fig. 5

muestra en 1 la estructura básica de citosina, la cual puede presentar en su amina exocíclica diferentes estructuras de enlazador. En este caso, R' designa un ácido L-nucleico o un L-polinucleótido, OH o fosfato, R'' un ácido L-nucleico o un L-polinucleótido, OH o fosfato y R''' H, OH, OMe, OEt, NH₂. El radical R designa en este caso el enlazador que presenta la estructura base -[Y]_n-X₁ y puede presentar las fórmulas estructurales mostradas en (2) a (9), pudiendo ser Z O, NH, NR, S y n un número entero entre 1 y 20. El grupo funcional X₁ se elige preferiblemente del grupo que presenta HO, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR y COHal.

35

40

La Fig. 6

muestra la configuración de un ácido L-nucleico modificado conforme a la invención mediante reacción de PEG-NHS con un ácido L-nucleico provisto de un enlazador. Después de un acoplamiento con éxito se presenta el ácido L-nucleico modificado que en el presente caso comprende PEG como parte de ácido no L-nucleico y como ácido L-nucleico en este caso concreto un oligonucleótido, estando intercalado entre ambos un enlazador o bien espaciador portador de un grupo amino, y entre el enlazador y PEG se produce un enlace de amida de ácido. Junto al ácido L-nucleico modificado, como producto de reacción adicional se obtiene la N-hidroxisuccinimida disociada de PEG. Como posibles radicales R se prefieren H, CH₃ y, en general, cadenas de alquilo con una longitud de 1-20. El grupo funcional puede ser, en principio, el producto de uno de cada una de las reacciones recogidas precedentemente en esta memoria. A este respecto sirven también las configuraciones del enlazador allí descritas y en unión con las otras figuras, en particular las Figs. 2 y 3. Lo mismo es válido también para los sustituyentes representados en la fórmula y las variables control tales como n.

45

50

La Fig. 7

muestra la reacción de diferentes derivados de PEG con diferentes enlazadores. En este caso, las dos reacciones (1) y (2) se diferencian únicamente en que en el caso de la reacción (1) el grupo carboxilo está presente en PEG y en la reacción (2) el grupo carboxilo está presente en un L-oligonucleótido provisto de un enlazador. En el caso del grupo funcional del participante en la reacción en cada caso correspondiente, es decir, en el caso de la reacción (1) el ácido L-nucleico provisto de un enlazador, en el caso de la reacción (2) el PEG provisto de un grupo amino. Con

55

- ello, en relación con las distintas reacciones arriba expuestas que son posibles entre la parte de ácido L-nucleico y la parte de ácido no L-nucleico, eventualmente bajo participación de uno o varios enlazadores intercalados, se confirma la afirmación hecha de que básicamente los grupos reactivos mencionados pueden estar presentes en el caso de todos los participantes en la reacción implicados. Las estructuras obtenidas en última instancia se diferencian de manera correspondiente, así en el caso de la reacción (1), en donde está presente un grupo amida de ácido en el PEG y en el caso de la reacción (2), en donde el enlace amida de ácido está presente en la construcción a base de enlazador y oligonucleótido, es decir, ácido L-nucleico. En relación con los sustituyentes R se cumple correspondientemente lo dicho en relación con la Fig. 6.
- 5
- 10 La Fig. 8 muestra la reacción de un haluro con un tioéster que están incorporados en la parte de ácido no L-nucleico o bien en la parte de ácido L-nucleico. En el caso de las reacciones (1) a (3) está previsto en este caso que el ácido L-nucleico, aquí como en todas las figuras, abreviado como oligo, está provisto de un enlazador y el enlazador porta un haluro tal como, por ejemplo, I, Br, Cl. Este ácido L-nucleico derivatizado se hace reaccionar acto seguido con un PEG provisto de un grupo tiol, preferiblemente de un grupo tiol terminal. En el caso de la reacción (1) se produce en este caso un enlace tioéster entre el enlazador y PEG. Mediante oxidación puede producirse, tal como se representa en la reacción (2), la formación de un sulfóxido o bien de una sulfona. En el caso de las reacciones conforme a (4) a (6) tiene lugar asimismo una reacción entre un tiol y un haluro, en donde en estos casos el ácido L-nucleico está provisto del grupo tiol y el enlazador porta el haluro. De manera correspondiente, se produce la configuración de compuestos en los que el azufre está dispuesto entre el ácido L-nucleico y el enlazador y éste, como se representa en las reacciones (5) y (6) se puede oxidar de nuevo en los correspondientes derivados.
- 15
- 20
- La Fig. 9 muestra la reacción del PEG provisto de un grupo maleimida con un ácido L-nucleico, allí designado como oligo, que presenta un enlazador que porta un grupo tiol. En el caso del producto de reacción se trata de un tioéster.
- 25
- La Fig. 10 muestra la reacción de un ácido L-nucleico portador de fosfato con un PEG que está provisto de un enlazador portador de un grupo tiol. El producto de reacción es un fosfotioato.
- La Fig. 11 muestra la reacción de un ácido L-nucleico provisto de un radical fosfato, eventualmente terminal, con un PEG que está provisto de un enlazador que presenta una amina. En el caso del producto de la reacción se trata de un fosforoamidato. En relación con el radical R se cumple lo dicho en relación con la Fig. 6.
- 30
- La Fig. 12 muestra la incorporación de un grupo amino o bien tiol reactivo en un ácido L-nucleico utilizando un grupo fosfato activado, preferiblemente un grupo fosfato terminal del ácido L-nucleico. En este caso, en una primera etapa se prepara una fosforoimidazolida (I) que, con el empleo de una etilendiamina en el caso de la reacción (2), conduce a la formación de un 2-aminoetilen-1-fosforoamidato (II) o bien, en el caso de la reacción (3) utilizando cisteamina, conduce a 2-tioetilen-1-fosforoamidato (III). Los compuestos conformes a (II) y (III) pueden hacerse reaccionar acto seguido con ácidos no L-nucleicos, en particular los compuestos dados a conocer en esta memoria.
- 35
- 40 La Fig. 13 muestra la reacción de un PEG provisto de un grupo cloruro de sulfonilo con un ácido L-nucleico que presenta un enlazador que porta un grupo amino. El producto de reacción es una sulfonamida. En relación con el radical R se cumple lo expuesto en relación con la Fig. 6.
- La Fig. 14 muestra la reacción de un PEG provisto de un grupo epóxido con un ácido L-nucleico que presenta un enlazador provisto de un grupo amino, bajo formación de una amina. En relación con el radical R se cumple lo expuesto en relación con la Fig. 6.
- 45
- La Fig. 15 muestra la reacción de un PEG provisto de un grupo epóxido con un ácido L-nucleico que porta un enlazador que presenta un grupo tiol. En el caso del producto de reacción se trata de un tioéster.
- La Fig. 16 muestra la reacción de un PEG que presenta un grupo isotiocianato con un ácido L-nucleico que porta un enlazador que presenta un grupo amino. El producto de reacción es una isotiourea. En relación con el radical R se cumple lo expuesto en relación con la Fig. 6.
- 50
- La Fig. 17 muestra la reacción de un PEG provisto de un grupo isocianato con un ácido L-nucleico que presenta un enlazador portador de un grupo amino, bajo la formación de una isourea. En relación con el radical R se cumple lo expuesto en relación con la Fig. 6.
- La Fig. 18 muestra la reacción de un PEG provisto de un grupo isocianato con un ácido L-nucleico que porta un grupo OH libre, que puede proceder directamente del ácido L-nucleico tal como, por ejemplo, un grupo fosfato o la parte de azúcar del nucleósido, es decir, las posiciones 2'-OH, 3'-OH o 5'-OH. Alternativamente, el grupo OH puede estar enlazado al ácido L-nucleico a través de un enlazador
- 55

adecuado. En el caso del producto de reacción se trata de un carbamato.

- La Fig. 19 muestra la reacción de un grupo aldehído o ceto con un grupo amino que en cada caso está presente en la parte ácido no L-nucleico (reacción (1)), en el caso representado en PEG, o en la parte de ácido L-nucleico (reacción (2)). La parte de ácido L-nucleico presenta en este caso preferiblemente un enlazador que porta el grupo reactivo respectivo, es decir, el grupo amino o el grupo carbonilo. En el caso de la reacción (1), el PEG porta el grupo amino, mientras que, por el contrario, el ácido L-nucleico presenta un enlazador que porta un grupo carbonilo. El producto de reacción imina obtenido directamente se transforma acto seguido mediante reducción en una amina. En el caso de la reacción (2), el PEG portador de un grupo carbonilo se hace reaccionar con un ácido L-nucleico que porta un enlazador que presenta un grupo amino. El producto de reacción imina se reduce y conduce a una amina. En relación con el radical R se cumple lo expuesto para la Fig. 6.
- La Fig. 20 muestra la reacción de un PEG provisto de un grupo tiol con un ácido L-nucleico que asimismo porta un enlazador provisto de un grupo tiol. En el caso del producto de reacción se trata de un ácido L-nucleico modificado que dispone de un grupo disulfuro entre el PEG y el ácido L-nucleico, dicho más exactamente el enlazador unido al mismo.
- La Fig. 21 muestra la reacción de un PEG provisto de un grupo hidrazina con un ácido L-nucleico que porta un enlazador que comprende un grupo carbonilo. En una primera etapa de reacción se obtiene una hidrazona que acto seguido es transformada por reducción en una hidrazina sustituida. En relación con el radical R es válido lo expuesto en relación con la Fig. 6.
- La Fig. 22 muestra en la reacción (1) la reacción de un PEG provisto de un dieno conjugado con un ácido L-nucleico que porta un enlazador con un denominado grupo dienófilo. El dienófilo se compone de un doble enlace C-C que de nuevo presenta un sustituyente Z que comprende un grupo sustractor de electrones. En este caso se puede tratar preferiblemente de NO₂, CH₂Cl, COOR, CN o maleimida. En relación con el radical R es válido lo expuesto para la Fig. 6. Como consecuencia de estas reacciones, se produce la configuración de un ácido L-nucleico modificado que entre el PEG y el ácido L-nucleico provisto de un enlazador porta un grupo hexenilo. La reacción de Diels-Alder mostrada en la reacción (2) parte de un PEG que presenta un dienófilo con el sustituyente Z que reacciona con un ácido L-nucleico que comprende un enlazador que porta un dieno conjugado. En relación con el sustituyente Z es válido lo dicho en relación con la reacción (1). El producto de reacción es en el caso de esta reacción (2) asimismo un conjugado de ácido L-nucleico unido a través de un grupo hexenilo.
- La Fig. 23 muestra la estructura de los ésteres de mPEG-NHS ramificados y lineales utilizados.
- La Fig. 24 muestra en (1) la estructura básica de un L-nucleósido abásico que, en lugar de la nucleobase, puede presentar un átomo de hidrógeno o una o varias estructuras de enlazador opcionalmente distintas. En este caso, R' designa un ácido L-nucleico o un L-polinucleótido, OH o fosfato, R" designa un ácido L-nucleico o un L-polinucleótido, OH o fosfato y X = H, OH, OMe, OEt, NH₂. El radical R designa el átomo de hidrógeno en lugar de la nucleobase o el enlazador que puede presentar las fórmulas estructurales mostradas en (2) a (8) en donde Z = CH₂, O, NH, NR, S y n puede ser un número entero entre 1 y 20. El grupo funcional X₁ se elige preferiblemente del grupo que presenta HO, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR y COHal.
- La Fig. 25 muestra un test de actividad de un spiegelmero de ADN que une GnRH, PEGilado, en ratas machos orquidectomizadas.
- La Fig. 26a muestra un ensayo de actividad de un spiegelmero de ADN que une GnRH, PEGilado, in vitro.
- La Fig. 26b muestra un ensayo de actividad de un spiegelmero de ADN que une GnRH, no PEGilado y PEGilado, in vitro.
- La Fig. 27 muestra una farmacocinética de un spiegelmero de ADN que une GnRH, PEGilado, en ratas.
- La Fig. 28a muestra un perfil farmacocinético de un L-ARN PEGilado después de la administración intravenosa a ratas.
- La Fig. 28b muestra un perfil farmacocinético de un L-ARN no PEGilado después de la administración intravenosa a ratas.
- La Fig. 28c muestra un perfil farmacocinético de un L-ARN PEGilado después de la administración subcutánea a ratas.
- La Fig. 28d muestra un perfil farmacocinético de un L-ARN no PEGilado después de la administración

subcutánea a ratas.

La Fig. 29 muestra un ensayo de actividad de un spiegelmero de ADN que une GnRH in vivo en ratas machos orquidectomizadas.

Ejemplo 1: Síntesis de conjugados de ácido L-nucleico-PEG

5 Se examinaron las condiciones para la síntesis de conjugados de ácido L-nucleico-PEG partiendo de ácido L-nucleico representado en SEQ ID NO:2 y PEG, en donde el PEG estaba modificado de manera que se presentaba en forma de éster de NHS o en forma de amina primaria para el acoplamiento a una amina o bien a un fosfato. En este caso, se procedió de manera que el ácido nucleico se disolvió en un sistema acuoso. El pH se ajustó a pH 6,5-9,0 mediante diferentes tampones o bases tales como, por ejemplo, NaHCO₃, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, HEPES, MOPS, NH₄OAc, trietilamina. Se sometió a ensayo la influencia de una adición de diferentes disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, DMF, DMSO, acetonitrilo y otros, variándose la proporción del disolvente orgánico entre 0-100%.
10 A continuación, tuvo lugar la adición de diferentes derivados de PEG tales como, por ejemplo, éster de mPEG₂-NHS ramificado, éster de mPEG-NHS lineal o mPEG-NH₂ (Shearwater Corporations) de diferentes pesos moleculares entre 10.000 Da y 40.000 Da. La adición de éster de PEG-NHS puede tener lugar de diferentes maneras. Así, por ejemplo, éster de PEG-NHS se disuelve en un ácido poco concentrado tal como, por ejemplo, HCl 0,01 N y se añade lentamente gota a gota disuelto en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, DMF o se añade en forma de un sólido. La forma preferida de adición de PEG-NHS es en porciones en forma de un sólido. Además, se sometió a ensayo la influencia de la temperatura de reacción entre 4°C-65°C. Como ácidos nucleicos se utilizaron ácidos nucleicos con las siguientes secuencias 5'-NH₂-TAT TAG AGA C -3' (SEQ ID NO:2) y 5'-PO₄-TAT TAG AGA C -3' (SEQ. ID. No 3), así como el ácido nucleico conforme a SEQ ID No 1. Los rendimientos en las reacciones arriba recopiladas oscilaban entre 5-78%.

La variante de reacción preferida era la adición durante seis veces en total de en cada caso dos equivalentes de éster de PEG-NHS sólido a un intervalo de aproximadamente 30 minutos a un ácido nucleico disuelto en un disolvente consistente en 60 partes de H₂O y 40 partes de DMF bajo la adición de NaHCO₃ (0,2 M), un pH de 8,0 y 37°. Estas condiciones de reacción condujeron a un rendimiento de 78%.
25

Ejemplo 2: Síntesis de un conjugado de ácido L-nucleico-fosforoamidato-PEG

Partiendo de un ácido L-nucleico con la secuencia 5'-PO₄-TAT TAG AGA C -3' (SEQ. ID. NO: 3) se preparó un conjugado de fosforoamidato-PEG correspondiente. El ácido L-nucleico (10 OD) se hizo reaccionar con PEG-NH₂ (20.000 Da, lineal, 1 - 10 equivalentes) en disolución acuosa con EDCl a 50°C para formar un conjugado de ácido L-nucleico-fosforoamidato-PEG. El análisis y la purificación discurrieron análogamente a la PEGilación de ácidos L-nucleicos con PEG-NHS tal como se describe en el Ejemplo 1. Las condiciones de reacción no fueron optimizadas y condujeron a un rendimiento de < 8%.
30

Ejemplo 3: PEGilación de un ligando de spiegelmero para GnRH

La hormona peptídica GnRH I (hormona liberadora de gonadotropina, gonadoliberina) que en general se designa también como GnRH, es un deca-péptido que se forma en el hipotálamo y estimula la secreción de la hormona luteinizante de la hormona gonadotropina (LH) y la hormona estimulante de folículos (FSH) a través de la hipófisis. GnRH se segrega a partir de las neuronas del hipotálamo en forma pulsada y se une entonces a su receptor en la superficie celular de la hipófisis. El complejo ligando-receptor se internaliza, con lo que se produce una secreción de FSH y LH que de nuevo estimula la formación de hormonas sexuales tales como estrógeno, progesterona o testosterona. Se pudo generar un spiegelmero, es decir, un ácido L-nucleico que se une específicamente a GnRH y que presenta la siguiente secuencia:
40

**5' - CCA AGC TTG CGT AAG CAG TCT CCT CTC AGG GGA GGT TGG GCG GTG CGT
AAG CAC CGG TTT GCA GGG G - 3' (SEQ ID NO:1)**

La síntesis del spiegelmero con la secuencia precedentemente mostrada se llevó a cabo en un sintetizador de ADN Oligopilot II de Amersham Pharmacia Biotech a escala de 780-µmol en una fase sólida de CPG (vidrio de poro controlado) de 1000 Å según la química de 2-cianoetil-fosforoamidato (Sinha et al. NAR, 12, 1984, págs. 4539 y siguientes). A continuación, se acopló 6-(monometoxitritilamino)-hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforoamidato al extremo 5' del spiegelmero (5'-MMT-aminohexilo-spiegelmero) con el fin de posibilitar la conjugación post-sintética con PEG.
45

Después de finalizada la síntesis, el 5'-MMT-aminohexilo-spiegelmero se disoció de la fase sólida mediante incubación durante 8 horas en disolución de amoníaco al 33% a 65°C y se desprotegió por completo, después se concentró a sequedad, se recogió en NaOH 10 mM y se purificó mediante RP-HPLC. La disociación del grupo protector monometoxitritililo tuvo lugar con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,4% en 30 min a TA. El TFA se separó mediante co-evaporación durante dos veces con etanol y el 5'-aminohexilo-spiegelmero conforme a SEQ ID NO 1 se purificó mediante precipitación en etanol (rendimiento: 5,000 OD, 7,5 µmol). El pico del producto se recogió y se desaló mediante cromatografía de exclusión por tamaño a través de una columna Sephadex G10 o mediante
55

ultrafiltración (sistema Labscale TFF, Millipore).

El spiegelmero para GnRH 5'-amino-modificado de este tipo (5,000 OD, 7,5 μ mol) se dispuso en NaHCO_3 0,2 M, pH 8,5 / DMF 60:40 (v/v) (125 mL), se calentó hasta 37°C y se mezcló en porciones con éster activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS) en forma de polvo de polietilenglicol 40.000 Da ramificado (añadir 2 eq (equivalentes) cada 30 min, en total 12 eq. 6 x 600 mg, 180 μ mol). El transcurso de la reacción se vigiló mediante electroforesis en gel analítica (poliacrilamida al 8%, urea 8,3 M). El producto bruto se purificó primeramente mediante HPLC de intercambio de iones de PEG en exceso (Source Q 30; agente eluyente A: H_2O , agente eluyente B: NaCl 2M, caudal 20 mL/min; carga de la columna y elución de PEG libre con 10% de B; elución del conjugado PEG-GnRH-spiegelmero con 50% de B), a continuación, mediante RP-HPLC, se separó spiegelmero para GnRH PEGilado de spiegelmero para GnRH no PEGilado (Source RPC 15; agente eluyente A: acetato de trietilamonio (TEAA), 100 mM, agente eluyente B: TEAA 100 mM en H_2O /acetonitrilo 5:95; caudal 40 mL/min; carga de la columna con 10% de B; gradiente de 10% a 70% de B en 10 volúmenes de la columna, elución de PEG-GnRH-spiegelmero a 45-50% de B); se intercambió con éster (Source Q 30; agente eluyente A: H_2O , agente eluyente B: NaCl 2 M; caudal 20 mL/min; carga de la columna y elución de PEG libre con 10% de B; elución de PEG-GnRH-spiegelmero con 50% de B y a continuación mediante filtración en gel (Sephadex G10; agente eluyente H_2O ; caudal 5 mL/min) o se desaló mediante ultrafiltración (sistema Labscale TFF, Millipore). Mediante liofilización se obtuvo el producto deseado en forma de un polvo blanco (3,900 OD, 375 mg, 78%).

De manera análoga se enlazaron y purificaron otros ácidos L-nucleicos, incluida la secuencia conforme a SEQ ID No 1 con diferentes PEG (lineal 10.000 Dalton, lineal 20.000 Dalton, ramificado 20.000 Dalton, lineal 35.000 Dalton).

Ejemplo 4: Síntesis de conjugados de ácido L-nucleico-FITC: acoplamiento de isotiocianato de fluoresceína a spiegelmero para GnRH con un enlazador 5'- $\text{NH}_2\text{-C}_6$

El spiegelmero para GnRH 5'-amino-modificado, preparado conforme al Ejemplo 3, se dispuso en NaHCO_3 0,5 M, pH 8,5, se calentó hasta 65°C y a la mezcla de reacción se añadió un exceso de isotiocianato de fluoresceína (FITC, 10 eq.). La reacción se vigiló mediante RP-HPLC analítica. Se agitó durante 48 h a 65°C, FITC en exceso se separó mediante Centri-Spin 10 (Princeton Separations) y el ácido L-nucleico marcado con fluoresceína se purificó con RP-HPLC. La liofilización proporcionó el producto deseado en forma de un polvo amarillento en un rendimiento cuantitativo.

Ejemplo 5: Ensayo de actividad de un spiegelmero de ADN que une GnRH, PEGilado, in vivo en ratas machos orquidectomizadas

Ratas machos fueron orquidectomizadas, con lo cual el nivel de LH de las ratas aumentó continuamente como consecuencia de la carencia de retroalimentación de testosterona a lo largo de los siguientes ocho días. El día 8 se administró por vía intravenosa el spiegelmero para PEG-GnRH-ADN, es decir, el conjugado a base de PEG y spiegelmero para GnRH, a siete ratas (150 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre el día 0 (antes de la orquidectomía), el día 8 (0 horas antes de la administración i. v. del spiegelmero para PEG-GnRH), tanto 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 6 h como 24 h después de la administración i. v., y el nivel de LH respectivo se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA). Paralelamente a ello, a siete ratas machos orquidectomizadas se les administró solo el vehículo (tampón PBS, pH 7,4) i. v. en forma de control negativo y a siete ratas machos orquidectomizadas se les administró el antagonista estándar Cetorelix (100 μ g/kg) como control positivo s. c. El resultado está representado en la Fig. 25.

Con excepción del control negativo (designado en la Fig. 25 con triángulos) bajo la acción del spiegelmero para PEG-GnRH se produce, también después de 24 horas, además un nivel de LH que es equiparable al de ratas no orquidectomizadas o bien de aquellas ratas a las que se había administrado el antagonista estándar Cetorelix. Esto confirma la idoneidad del spiegelmero para PEG-GnRH-ADN, de influir de manera duradera sobre el efecto de PEG-GnRH a lo largo de un espacio de tiempo prolongado. El que el efecto precedentemente descrito del spiegelmero para PEG-GnRH-ADN se remonta a la PEGilación del spiegelmero para GnRH resulta del hecho de que en el caso de la aplicación del spiegelmero para GnRH sin una correspondiente modificación en el caso de la aplicación subcutánea de 100 mg/kg ya se pudo observar después de unas pocas horas una disminución de la actividad del spiegelmero para GnRH. El resultado está representado asimismo en la Fig. 29.

Ejemplo 6: Ensayo de actividad de spiegelmeros de ADN que unen GnRH, PEGilados y no PEGilados in vitro en células de CHO

El estudio del cultivo celular descrito aquí se llevó a cabo en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan el receptor humano para GnRH. En este caso, se midió la liberación intracelular de iones Ca^{2+} , dado que esta liberación importante para la transducción de señales tiene lugar después de la formación del complejo agonista-receptor. El nivel de Ca^{2+} se determinó entonces mediante un colorante de fluorescencia sensible a Ca^{2+} . El spiegelmero para PEG-GnRH-ADN o bien el spiegelmero para GnRH debería captar el agonista GnRH y, con ello, inhibir su unión al receptor sobre la membrana celular. En este caso, se procedió experimentalmente de manera que el agonista GnRH (2 mM) se pre-incubó durante 20 min con el spiegelmero para GnRH o bien con el spiegelmero para PEG-GnRH-ADN en un intervalo de concentraciones de 100 pM a 1 μ M. Acto seguido, esta disolución se

añadió en cada caso a las células de CHO cargadas con colorante de fluorescencia y la concentración de Ca^{2+} respectiva se determinó en un lector de placas de formación de imágenes por fluorescencia (FLIPR). El resultado del spiegelmero para PEG-GnRH-ADN (triángulos en negro) y un antagonista estándar (cuadrados en negro) que aquí se utilizó como control positivo, se representa en la Fig. 26a.

5 La determinación dependiente de la concentración proporcionó una curva de actividad sigmoideal que apunta a que tanto el spiegelmero para GnRH nativo, es decir, no modificado (cuadrados en negro) como el spiegelmero para GnRH-ADN modificado con PEG (triángulos en negro) podía inhibir en un 100% la formación del complejo GnRH-receptor. La CI_{50} ascendió a 20 nM para el spiegelmero para GnRH y 30 nM para el spiegelmero para PEG-GnRH-ADN (Fig. 26b).

10 **Ejemplo 7:** Farmacocinética de un spiegelmero de ADN que une GnRH, PEGilado en ratas

Siete ratas Wistar machos (cría Schönwalde GmbH, Alemania, peso: 250-300 g), se utilizaron para la determinación de las propiedades farmacocinéticas del spiegelmero de ADN de unión a GnRH, PEGilado. El grupo se trató paralelamente a los grupos para los ensayos de actividad (véase el Ejemplo 6), es decir, se castró después de una fase de adaptación y después de otra semana (día 8) los animales recibieron una administración única, administrada por vía intravenosa de 800 nmol/kg de spiegelmero para PEG-GnRH-ADN. La sustancia se disolvió en 1 x PBS, pH 7,4 (disolución patrón: 1 mM).

Para el análisis se tomaron muestras de sangre antes de la administración de la sustancia (0 h), así como 1 h, 6 h y 8 h después de la adición de la sustancia y se analizaron como EDTA plasma.

20 A partir del plasma, el spiegelmero de ADN que une GnRH, PEGilado, se extrajo mediante extracción de fase sólida con ayuda de débiles intercambiadores de aniones. Para ello, en cada caso 50 μl de EDTA plasma en tampón A (NaH_2PO_4 50 mM, pH 5,5; NaClO_4 0,2 M; 20% (v/v) de formamida y 5% (v/v) de acetonitrilo) se disolvieron en un volumen total de 1 ml y se almacenaron hasta la extracción a 4°C durante la noche o bien a -20°C durante como máximo 4 días. Las muestras congeladas se descongelaron a temperatura ambiente durante al menos dos horas, se mezclaron y a continuación se centrifugaron.

25 Para la extracción de la fase sólida se utilizaron columnas de intercambiadores de iones de dimetilaminopropilo (DMA 3 ml/200 mg de material de columna, Macherey & Nagel, Düren) en un sistema de aparatos de vacío Baker spe-12G (Mallinckrodt Baker, Griseheim). Los tampones utilizados consistían en: tampón A (NaH_2PO_4 50 mM, pH 5,5; NaClO_4 0,2 M; 20% (v/v) de formamida y 5% (v/v) de acetonitrilo) y tampón B (NaH_2PO_4 80 mM, pH 6,0; Na_2HPO_4 50 mM; NaClO_4 2 M; 20%; formamida al 20% (v/v) y acetonitrilo al 5% (v/v)), mezclándose los dos tampones A y B para la preparación del tampón de lavado y de elución en una relación determinada, de manera que se alcanzó la concentración salina deseada. Los intercambiadores de aniones se lavaron con 2 ml de tampón A. Las muestras se añadieron bajo la aplicación de -100 mbar y se lavaron con 2 ml de tampón A, así como con 2 ml de tampón de lavado (NaClO_4 0,4 M). Después de haber secado el material de la columna mediante la aplicación de -200 mbar durante 5 minutos, el spiegelmero de ADN PEGilado, que une GnRH, se eluyó con 3 x 0,5 ml de tampón de elución (NaClO_4 0,9 M), calentándose el tampón antes de la elución hasta 70°C. Los productos eluidos se almacenaron a 4°C hasta la filtración en gel.

40 Como patrón interno se añadió a las muestras antes de la extracción un spiegelmero de ADN 30mero al que estaba unido en el extremo 5' una molécula de polietilenglicol (PEG) de 40 kD. El patrón interno se llevó con tampón a un volumen de 360 μl en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y en cada caso se añadieron 10 μl del mismo a cada una de las muestras.

Con el fin de desalar las muestras antes del análisis por HPLC, se utilizaron columnas NAP-25 (Amersham Pharmacia Biotech). Los productos eluidos obtenidos se secaron en vacío y se disolvieron en 100 ml de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

45 La identificación y cuantificación del spiegelmero PEGilado tuvo lugar mediante cromatografía por intercambio de aniones utilizando un sistema de HPLC Waters Alliance 2695 y la detección a 254 nm. Las condiciones eran como sigue:

Precolumna: DNAPac PA-100 (504 mm, Dionex)

Columna principal: DNAPac PA-100 (2504 mm, Dionex)

Eluyente A: NaOH 10 mM, EDTA 1 mM, acetonitrilo al 10% (v/v) en agua

50 Eluyente B: NaCl_4 375 mM en eluyente A

Temperatura: 25°C

Volumen de inyección: 20 μl

Gradiente y caudales: 0 - 1 min 10% de eluyente B con 0,5 ml/min; 1 - 2 min 10% de eluyente B con 2

ml/min; 2 - 3 min 30% de eluyente B con 2 ml/min; 3- 13 min 60% de eluyente B con 2 ml/min; 13 - 19 min 10% de eluyente B con 2 ml/min.

La concentración de spiegelmero de ADN PEGilado que se une a GnRH a los distintos momentos de la toma de muestras se representa en la Fig. 27. La semivida del spiegelmero de ADN PEGilado, que se une a GnRH, en el caso de inyección intravenosa asciende en ratas a aproximadamente 4 horas.

Ejemplo 8: Perfil farmacocinético de L-ARN no modificado y PEGilado en ratas

Secuencias de nucleótidos:

L-ARN, 40mero (NOX_M039)

5' uaa gga aac ucg guc uga ugc ggu agc gcu gug cag agc u 3' (SEQ. ID. No. 4)

PEG-L-ARN de 40kDalton, 40 mero (NOX_M041)

PEG 5' uaa gga aac ucg guc uga ugc ggu agc gcu gug cag agc u 3' (SEQ. ID. No.5)

El perfil farmacocinético del L-ARN no PEGilado (NOX_M039) y L-ARN PEGilado (NOX_041) se examinó en ratas machos (CD[®], Charles River Deutschland GmbH; peso: 280-318 g). Después de un tiempo de adaptación de 7 días, 3 animales recibieron por sustancia una administración única aplicada por vía intravenosa de 150 nmo/kg. En cada caso 4 ratas por sustancia recibieron en cada caso 150 nmol/kg como dosis subcutánea única. Las sustancias se disolvieron en 1 x PBS, pH 7,4 (disolución patrón: 383 µM). Después de la administración intravenosa, se tomaron muestras de sangre para el L-ARN no modificado antes de la adición de la sustancia (0 min) y 5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h después de la administración de la sustancia y se trasladaron para el análisis a recipientes Eppendorf de EDTA. Después de la administración intravenosa se tomaron muestras de sangre para el L-ARN PEGilado antes de la adición de sustancia (0 min) y 5 min, 30 min, 1 h, 3 h, 8 h, 16 h, 24 h, 36 h así como 48 h después de la adición de la sustancia y se transfirieron a recipientes Eppendorf de EDTA para el análisis. En el caso de los animales tratados por vía subcutánea, para el L-ARN no modificado se tomaron muestras de sangre antes de la adición de sustancia (0 min), y 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h después de la adición de la sustancia y se transfirieron a recipientes Eppendorf de EDTA para el análisis. En el caso de los animales tratados por vía subcutánea, para el L- ARN PEGilado se tomaron muestras de sangre antes de la adición de la sustancia (0 min) y 1 h, 3 h, 8 h, 16 h, 24 h, 36 h y 48 h después de la administración de la sustancia y se transfirieron a recipientes Eppendorf de EDTA para el análisis.

La cantidad de L-ARN o bien L-ARN PEGilado en las muestras de sangre se examinó mediante un ensayo de hibridación (véase Drolet, D.W. et al. (2000) Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. Pharmaceutical Res 17 (12): 1503-1510). El ensayo de hibridación se basa en el siguiente principio: la molécula de L-ARN a detectar se hibrida a una sonda de oligonucleótido de L-ADN inmovilizada (= sonda de captura; aquí: 5'- CCG CAT CAG ACC GAG TTT CCT TA T TTT TTT TT -(C7) NH2 -3' (SEQ. ID. No. 6)) y se detecta con una sonda de L-ADN de detección de ADN biotinilada (= sonda de detector; aquí: 5'-(BB)TTT TTT TT A GCT CTG CAC AGC GCT -3' (SEQ. ID. No. 7)). Para ello, al complejo se une en una etapa adicional un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina. Después de la adición de un sustrato de quimioluminiscencia, se genera luz y se mide en un luminómetro.

Inmovilización de la sonda de oligonucleótidos: 100 µl de la sonda de captura (0,75 pmol/µl en tampón de acoplamiento: Na₂HPO₄ 500 mM pH 8,5, EDTA 0,5 mM) se transfirieron por pocillo (pocillo o cavidad en una placa) en placas de DNA BIND (COSTAR) y se incubaron durante una noche a 4°C. A continuación, se lavó tres veces en cada caso con 200 µl de tampón de acoplamiento y se incubó durante 1 h a 37°C con sendos 200 µl de tampón de bloqueo (BSA al 0,5% (p/v) en tampón de acoplamiento). Después de un lavado renovado con 200 µl de tampón de acoplamiento y 3 x 200 µl de tampón de hibridación 1 (0,5 x SSC pH 7,0; SDS al 0,5% (p/v)) se pueden utilizar las placas para la detección.

Hibridación y detección: se preparó una disolución de 20 pmol/µl de la sonda de L-ADN de detección (= sonda de detector) en Tris-Cl 10 mM pH 8,0. 10 µl de EDTA plasma (o agua bidestilada) se mezclaron con 90 µl de tampón de hibridación 1 (0,5 x SSC pH 7,0, SDS al 5% (p/v)) y se centrifugaron. A continuación, se añadieron a ello 2 µl de la disolución de la sonda de detección (20 pmol/µl), se mezclaron y centrifugaron. Siguió una etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 min en el termociclador (MJ Research). Las tandas se transfirieron a los pocillos de DNA-BIND correspondientemente preparados (véase arriba) y se incubaron durante 2 h a 50°C. Siguió después etapas de lavado: 2 x 200 µl de tampón de hibridación 1 (0,5 x SSC pH 7,0, SDS al 0,5 (p/v)) y 3 x 200 µl de 1 x THS/Tween 20 (Tris-Cl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, Tween 20 al 0,1% (v/v)). 1 µl de conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Promega) se diluyeron con 5 ml de 1 x TBS/Tween 20. Por pocillo se añadieron 100 µl del conjugado diluido y se incubaron durante 30 min a la temperatura ambiente. Siguió etapas de lavado: 1 x 200 µl 1 x TBS/Tween 20 y 3 x 200 µl 1 x tampón de ensayo (Tris-Cl 20 mM pH 9,8 MgCl₂ 1 mM). A continuación, se incubaron 100 µl de "Ready-To-Use Substrate" CSPD (Applied Biosystems), se incubaron durante 30 min a la temperatura ambiente y la quimioluminiscencia se midió en un aparato de lectura de placas de multidetección POLARstar Galaxy (BMG Labtechnologies).

Las curvas de concentración-tiempo del L-ARN PEGilado en el caso de administración intravenosa y subcutánea se representan en la Fig. 28a y la Fig. 28c. Los perfiles de concentración del L-ARN no modificado en el caso de administración intravenosa y subcutánea se representan en la Fig. 28b y la Fig. 28d. En el caso de la administración intravenosa, la semivida terminal para el L-ARN no modificado asciende a 50 minutos, para la sustancia PEGilada resulta, por el contrario, una semivida de aprox. 18 horas. En el caso de la administración subcutánea, la semivida terminal asciende para el L-ARN no modificado a 84 minutos, para la sustancia PEGilada resulta, por el contrario, una fase de eliminación muy larga.

Con ello se demuestra que el ácido L-nucleico modificado conforme a la invención es ventajoso frente a ácidos L-nucleicos no modificados. Esta ventaja resulta también en relación con el estado de la técnica, así, por ejemplo, descrita por Watson, S. R. et al., *Antisense nucleic acid drug dev.* 10, 63 - 75 (2000). En esta publicación se examina un aptámero 2'-F-modificado que se une a L-selectina. La semivida farmacocinética del aptámero 2'-F PEGilado (PEG 40 kDa) administrado por vía intravenosa in vivo en ratas Sprague-Dawley asciende a 228 min y, por consiguiente, es claramente más breve que los ácidos L-nucleicos modificados conforme a la invención.

Ejemplo 9: Método general para la PEGilación de ácidos L-ribonucleicos

Se generó un ácido L-ribonucleico para examinar el perfil farmacológico de L-ARN no modificado y pegilado en ratas. El L-ARN presenta la siguiente secuencia:

5' - UAA GGA AAC UCG GUC UGA UGC GGU AGC GCU GUG CAG AGC U - 3' (SEQ ID NO:4)

La síntesis del L-ARN con la secuencia precedentemente indicada se llevó a cabo en un sintetizador ÅKTA Pilot 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) a escala de 20 µmol en una fase sólida de CPG de 1000 Å según la química de 2-cianoetil-fosforoamidita. A continuación, al extremo 5' del L-ARN (5'-MMT-aminohehexil-L-ARN) se acopló 6-(monometoxitritilamino)-hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforoamidita con el fin de posibilitar la conjugación post-sintética con PEG.

Después de finalizada la síntesis, el 5'-MMT-aminohehexil-L-ARN se disoció de la fase sólida mediante incubación durante 30 minutos en disolución al 41% de metilamina a 65°C, y las nucleobases se desprotegeron por completo. La desprotección de la posición 2' tuvo lugar mediante incubación en 1,5 ml de DMSO, 0,75 ml de trietilamina (TEA) y 1 ml de TEA 3 HF durante 2 h a 60°C. Tuvo lugar una primera purificación mediante RP-HPLC. La separación del grupo protector de monometoxitritilo tuvo lugar con ácido acético al 80% en 70 min a TA. El ácido acético se separó mediante co-evaporación durante dos veces con etanol, y el 5'-aminohehexil-L-ARN se purificó conforme a SEQ. ID No 4 mediante precipitación en etanol (rendimiento: 220 OD, 60% puro). El producto se recogió en acetato de sodio 1 M, pH 8,0 y se desaló mediante cromatografía por exclusión de tamaño a través de una columna Sephadex G10 o bien mediante Vivaspin 3000 (Vivascience, Hannover, Alemania).

El L-ARN 5'-amino-modificado de este manera (530 OD, 60% puro) se dispuso en tampón universal según Theorell y Stenhagen (citrate de sodio 33 mM, fosfato de sodio 33 mM, borato de sodio 57 mM, pH 7,5) (7,5 mL), se calentó a 37°C, se añadió DMF (5 ml) y se mezcló en porciones con éster activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS) en forma de polvo de poli(etilenglicol) de 40.000 Da (añadir 2 eq. cada 45 min, en total 18 eq.). El transcurso de la reacción se vigiló mediante electroforesis en gel analítica (8% de poli(acrilamida), urea 8,3 M) o HPLC por intercambio de iones analítica. El producto bruto se purificó primeramente de PEG en exceso mediante HPLC por intercambio de iones (Source Q; agente eluyente A: hidrógeno-carbonato de sodio 10 mM, pH 7,5, agente eluyente B: hidrógeno-carbonato de sodio 10 mM, pH 7,5, cloruro sódico 2 M; carga de la columna y elución de PEG libre con 5% de B; caudal 20 mL/min; separación y elución del conjugado de PEG-L-ARN de L-ARN que no ha reaccionado con gradiente hasta 35% de B sobre 20 volúmenes de columna; caudal 50 mL/min), a continuación se desaló mediante ultrafiltración (sistema Labscale TFF, Millipore). Mediante liofilización se obtuvo el producto deseado en forma de un polvo blanco (254 OD, 48% (80% referido a la pureza del producto de partida)).

De manera análoga se enlazaron y purificaron otros ácidos L-nucleicos, incluyendo la secuencia conforme a SEQ ID No 1 con diferentes PEG (lineal 10.000 Dalton, lineal 20.000 Dalton, ramificado 20.000 Dalton, lineal 35.000 Dalton).

Ejemplo 10: Test de actividad de un spiegelmero de ADN que une GnRH in vivo en ratas machos orquidectomizadas

Ratas machos fueron orquidectomizadas, con lo cual el nivel de LH de las ratas aumentó continuamente como consecuencia de la carencia de retroalimentación de testosterona a lo largo de los siguientes ocho días. El día 8 el spiegelmero para GnRH-ADN (NOX 1255) se administró por vía subcutánea a cinco ratas (100 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre el día 0 (antes de la orquidectomía), el día 8 (0 horas antes de la aplicación s.c. del spiegelmero para GnRH), así como 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 6 h, como también 24 h después de la aplicación s.c. y se determinó el nivel de LH respectivo mediante radioinmunoensayo (RIA). Paralelamente a ello, a cinco ratas machos orquidectomizadas se les administró sólo el vehículo (tampón PBS, pH 7,4) s.c. como control negativo y a cinco ratas machos orquidectomizadas se les administró s.c. el antagonista estándar Cetorelix (100 µg/kg) como control positivo. El resultado se representa en la Fig. 29.

Los niveles de LH se reducen en el caso del spiegelmero para GnRH-ADN (designados en la Fig 29 con un círculo)

y alcanzan su punto bajo después de 1,5 h y se mantiene durante aprox. 3 h. Esta reducción es equiparable a ratas no castradas o bien tratadas con Cetrorelix (antagonista estándar). Seis horas después de la administración del spiegelmero para GnRH-ADN, los niveles de LH aumentan lentamente y alcanzan el nivel del grupo control no tratado en el espacio de 24 h.

- 5 Por consiguiente, a lo largo de un espacio de tiempo de 3 horas se puede observar el efecto biológico del spiegelmero para GnRH-ADN, mientras que el spiegelmero para GnRH-ADN PEGilado es activo a lo largo de un espacio de tiempo de 24 horas (véase el Ej. 5).

Las citas bibliográficas indicadas en lo que sigue corresponden a las indicaciones bibliográficas indicadas en esta memoria y provistas de los números en superíndice.

10 Bibliografía

1. Bragg, P. D. y Hou, C. Subunit composition, function, and spatial arrangement in the Ca²⁺-and Mg²⁺-activated adenosine triphosphatases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Arch Biochem Biophys* 167, 311 (1975).
2. Lomant, A. J. y Fairbanks, G. Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *J Mol Biol* 104, 243-261 (1976).
- 15 3. Buter, J. y Kellogg, R. M. Synthesis of macrocyclic and medium ring dithia compounds using cesium thiolates. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 466-468 (1980).
4. Buter, J. y Kellogg, R. M. Synthesis of sulfur-containing macrocycles using cesium thiolates. *J. Org. Chem.* 46, 4481-4485 (1981).
5. Kennedy, R. J. y Stock, A. M. The oxidation of organic substances by potassium peroxymonosulfates. *J. Org. Chem.* 25, 1901-1906 (1960).
- 20 6. Huang, Z., Schneider, K. C. y Benner, S. A. Oligonucleotide analogs with dimethylenesulfide, -sulfoxide, and -sulfone groups replacing phosphodiester linkages. *Methods Mol Biol* 20, 315-353 (1993).
7. Connolly, B. A. y Rider, P. Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphhydryl group and subsequent attachment of thiol specific probes. *Nucleic Acids Res* 13, 4485-4502 (1985).
- 25 8. Smyth, D. G., Blumenfeld, O. O. y Konigsberg, W. Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem J* 91, 589-595 (1964).
9. Heitz, J. R., Anderson, C. D. y Anderson, B. M. Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides. *Arch Biochem Biophys* 127, 627-636 (1968).
10. Podhradsky, D., Drobnic, L. y Kristian, P. Reactions of cysteine, its derivatives, glutathione coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates. *Experientia* 35, 154-155 (1979).
- 30 11. Vishnyakova, Golubeva y Glebova. *Russ. Chem. Rev.* 54, 249-261 (1985).
12. Hazzard, Lammiman, Poon, Satchell y Satchell. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1029 (1985).
13. Pieken, W. *et al.* (Patente Internacional, 1998).
14. Mokhir, A. A., Tetzlaff, C. N., Herzberger, S., Mosbacher, A. y Richert, C. Monitored selection of dna-hybrids forming duplexes with capped terminal c:g base pairs. *J Comb Chem* 3, 374-386 (2001).
- 35 15. Bischoff, R., Coull, J. M. y Regnier, F. E. Introduction of 5'-terminal functional groups into synthetic oligonucleotides for selective immobilization. *Anal Biochem* 164, 336-344 (1987).
16. Ghosh, S. S. y Musso, G. F. Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. *Nucleic Acids Res* 15, 5353-5372 (1987).
- 40 17. Allen, D. J., Darke, P. L. y Benkovic, S. J. Fluorescent oligonucleotides and deoxynucleotide triphosphates:

preparation and their interaction with the large (Klenow) fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. *Biochemistry* 28, 4601-4607 (1989).

18. Pitha, J., Kociolek, K. y Caron, M. G. Detergents linked to polysaccharides: preparation and effects on membranes and cells. *Eur J Biochem* 94, 11-18 (1979).

5 19. Elling, L. y Kula, M. R. Immunoaffinity partitioning: synthesis and use of polyethylene glycol-oxirane for coupling to bovine serum albumin and monoclonal antibodies. *Biotechnol Appl Biochem* 13, 354-362 (1991).

20. Wardell. in *The chemistry of the thiol group* (ed. Patai) 246-251 (Wiley, Nueva York, 1974).

21. Zuckermann, R., Corey, D. y Schultz, P. Efficient methods for attachment of thiol specific probes to the 3'-ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res* 15, 5305-5321 (1987).

10 22. Teare, J. y Wollenzien, P. Specificity of site directed psoralen addition to RNA. *Nucleic Acids Res* 17, 3359-3372 (1989).

23. Ghosh, S. S., Kao, P. M. y Kwok, D. Y. Synthesis of 5'-oligonucleotide hydrazide derivatives and their use in preparation of enzyme-nucleic acid hybridization probes. *Anal Biochem* 178, 43-51 (1989).

15 24. Ivanovskaya, M. G., Gottikh, M. B. y Shabarova, Z. A. Modification of oligo(poly)nucleotide phosphomonoester groups in aqueous solution. *Nucleosides Nucleotides* 6, 913-934 (1987).

25. Ralph, R. K., Young, R. J. y Khorana, H. G. The labelling of phosphomonoester end groups in amino acid acceptor ribonucleic acids and its use in the determination of nucleotide sequences. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 1490-1491 (1962).

20 26. Chu, B. C., Wahl, G. M. y Orgel, L. E. Derivatization of unprotected polynucleotides. *Nucleic Acids Res* 11, 6513-6529 (1983).

27. Shabarova, Z. A. Chemical development in the design of oligonucleotide probes for binding to DNA and RNA. *Biochimie* 70, 1323-34 (1988).

Listado de secuencias

25 <110> NOXXON Pharma AG

<120> Ácido L-nucleico modificado

30 <130> N 10032 PCT-EP/D-I

<140> EP 10 005 431.1

<141> 25-10-2002

35 <150> EP 01 125 630.2

<151> 26-10-2001

<150> EP 02 017 300.1

<151> 01-08-2002

40 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

45 <211> 67

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

50 <223> sintético

ES 2 629 615 T3

<220>
 <221> característica miscelánea

5 <222> (1)..(67)
 <223> descripción de la secuencia artificial: ácido L-nucleico que se une específicamente a GnRH

<400> 1
 ccaagcttgc gtaagcagtc tcctctcagg ggaggttggg cggtgcgtaa gcaccggttt 60
 10 gcagggg 67

<210> 2
 <211> 10
 <212> ADN
 15 <213> secuencias artificiales

<220>
 <223> sintético

20 <220>
 <221> característica miscelánea

<222> (1)..(10)
 <223> descripción de la secuencia artificial: ácido L-nucleico modificado

25 <220>
 <221> característica miscelánea

<222> (1)..(1)
 30 <223> grupo NH2 en el extremo 5'

<400> 2
 tattagagac 10

35 <210> 3
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

40 <220>
 <223> sintético

<220>
 <221> característica miscelánea

45 <222> (1)..(10)
 <223> descripción de la secuencia artificial: ácido L-nucleico modificado

<220>
 50 <221> característica miscelánea

<222> (1)..(1)
 <223> grupo PO4 en el extremo 5'

55 <400> 3
 tattagagac 10

<210> 4
 <211> 40
 60 <212> ARN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <223> sintético

<220>
 <221> característica miscelánea
 5 <222> (1)..(40)
 <223> L-ARN
 <400> 4
 uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcu gugcagagcu 40
 10 <210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales
 15 <220>
 <223> sintético
 <220>
 20 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(40)
 <223> PEG-L-ARN de 40kDalton
 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> modificación de PEG en el extremo 5'
 30 <400> 5
 uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcu gugcagagcu 40
 <210> 6
 35 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales
 <220>
 40 <223> sintético
 <220>
 <221> característica miscelánea
 45 <222> (1)..(32)
 <223> sonda de captura de L-ADN
 <220>
 <221> característica miscelánea
 50 <222> (32)..(32)
 <223> NH2 en el extremo 3'
 <400> 6
 55 ccgcatcaga ccgagtttcc ttatTTTTT tt 32
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> secuencias artificiales
 <220>
 <223> sintético
 65 <220>
 <221> característica miscelánea

<222> (1)..(24)

<223> ácido nucleico artificial: sonda de detector de L-ADN

5

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)..(1)

<223> ácido nucleico artificial: biotinilados en el extreme 5'

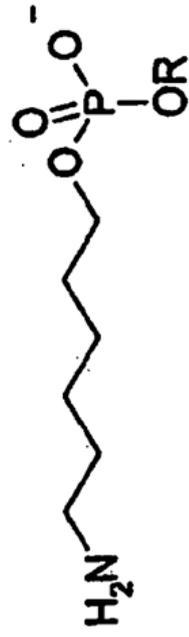
10

<400> 7

tttttttag ctctgcacag cgct 24

REIVINDICACIONES

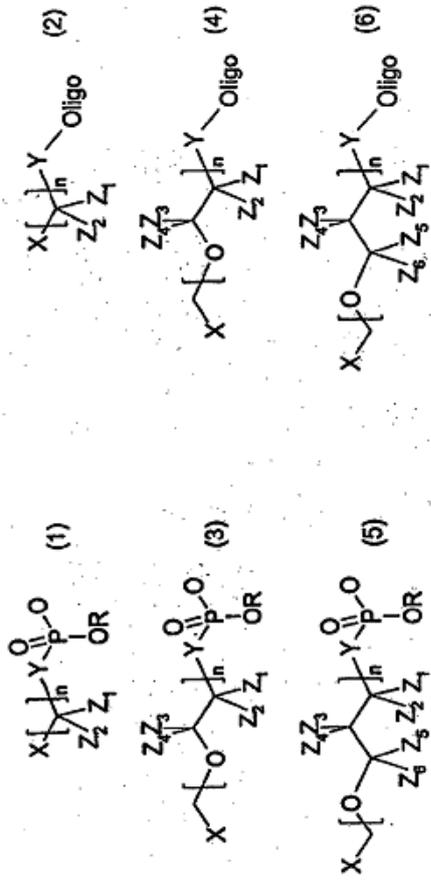
- 5 1. Ácido L-nucleico modificado que comprende una parte de ácido L-nucleico y una parte de ácido no L-nucleico, en donde la parte de ácido L-nucleico está conjugada con la parte de ácido no L-nucleico, en donde la parte de ácido L-nucleico es un spiegelmero y la parte de ácido no L-nucleico presenta un peso molecular mayor que 300 Da, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, conduciendo la conjugación de la parte de ácido L-nucleico con la parte de ácido no L-nucleico a una segregación ralentizada del organismo, en comparación con un ácido L-nucleico que comprende sólo la parte de ácido L-nucleico.
- 10 2. Ácido L-nucleico modificado que comprende una parte de ácido L-nucleico y una parte de ácido no L-nucleico, en donde la parte de ácido L-nucleico está conjugada con la parte de ácido no L-nucleico, en donde la parte de ácido L-nucleico es un spiegelmero y la parte de ácido no L-nucleico presenta un peso molecular mayor que 300 Da, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, conduciendo la conjugación de la parte de ácido L-nucleico con la parte de ácido no L-nucleico a un tiempo de permanencia incrementado en el organismo, en comparación con un ácido L-nucleico que comprende sólo la parte de ácido L-nucleico.
- 15 3. Ácido L-nucleico modificado según la reivindicación 1 y la reivindicación 2, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, en donde la parte de ácido no L-nucleico presenta un peso molecular mayor que 20.000 Da y preferiblemente mayor que 40.000 Da.
- 20 4. Ácido L-nucleico modificado según una de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que el ácido L-nucleico modificado presenta un peso molecular de 600 a 500.000 Da, preferiblemente de 10.000 a 400.000 Da, preferiblemente de 50.000 a 300.000 Da.
- 25 5. Ácido L-nucleico modificado según una de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que la parte de ácido no L-nucleico está enlazada directa o indirectamente a la parte de ácido L-nucleico a través de un grupo funcional de la parte de ácido L-nucleico, que está presente o unida a uno de los siguientes componentes del ácido L-nucleico, eligiéndose el grupo funcional del grupo de fosfatos terminales y no terminales, porciones de azúcar terminales y no terminales y bases de purina naturales y no naturales y bases de pirimidina naturales y no naturales.
- 30 6. Ácido L-nucleico modificado según la reivindicación 5, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que el enlace de la parte de ácido no L-nucleico con la parte de ácido L-nucleico se presenta a través del grupo 2'-OH, 3'-OH y/o 5'-OH o de un derivado del mismo o de una o varias de las porciones de azúcar de la parte de ácido L-nucleico.
- 35 7. Ácido L-nucleico modificado según la reivindicación 5 o 6, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que el enlace se presenta a través de al menos una posiciones 5 o 6 de la base de pirimidina.
- 40 8. Ácido L-nucleico modificado según una de las reivindicaciones 5 a 7, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que el enlace se presenta a través de al menos una de las bases de purina, presentándose el enlace preferiblemente en la posición 8.
- 45 9. Ácido L-nucleico modificado según una de las reivindicaciones 5 a 8, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que el enlace se presenta en uno o varios de los grupos amino exocíclicos y/o endocíclicos y/o grupos ceto de las bases de purina y/o pirimidina y/o la posición o posiciones abásicas.
- 50 10. Ácido L-nucleico modificado según una de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que la parte de ácido no nucleico es del grupo que comprende poli(etilenglicol) lineal, poli(etilenglicol) ramificado, hidroxietil-almidón, péptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, polioxipropileno, polioxiamidatos, poli(2-hidroxietil)-L-glutamina, polietilenglicol preciso.
11. Ácido L-nucleico modificado según una de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que entre la parte de ácido L-nucleico y la parte de ácido no L-nucleico está dispuesto un enlazador.
12. Ácido L-nucleico modificado según una de las reivindicaciones 1 a 11, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico o diagnóstico de un organismo, caracterizado por que la parte de ácido L-nucleico comprende un ácido nucleico conforme a SEQ ID NO. 1.
13. Uso de un ácido L-nucleico modificado como se define en una de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de un agente de diagnóstico.
14. Uso del ácido L-nucleico modificado como se define en una de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de un medicamento.



Enlazador de hexilamina

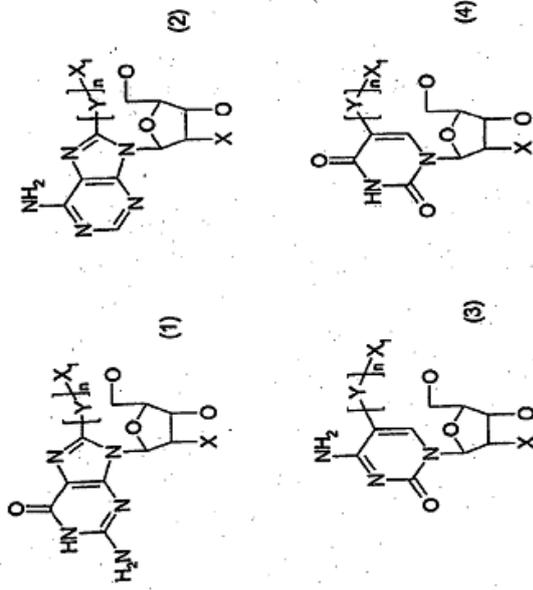
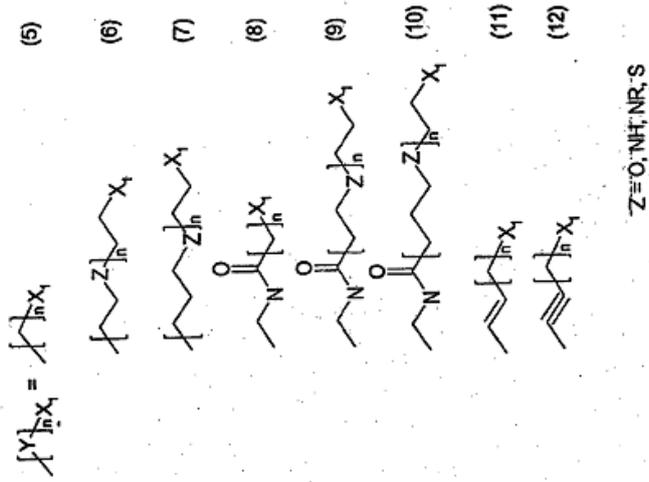
Fig. 1

Otros enlazadores



X = HO, H₂N, HS, Hal, CHO, COOH
 Y = O, NH, NMe, S, CH₂
 Z₁₋₆ = H, Me, Alquilo, HO(CH₂)_m, HO, H₂N(CH₂)_m, H₂N, F
 n = 1-20

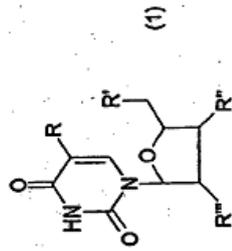
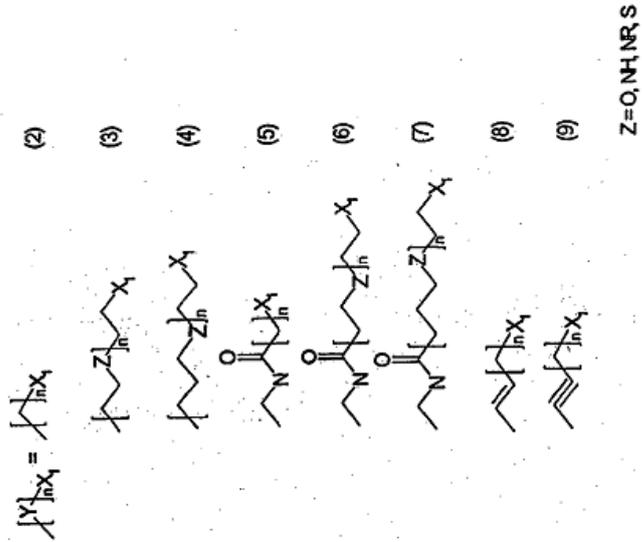
Fig. 2



X = H, HO, H₂N, MeO, EtO, Alcoxi
 X₁ = HO, H₂N, HRN, HS, SSR,
 Hal, CHO, COOH, COOR, COHal
 n = 0-20

Fig. 3

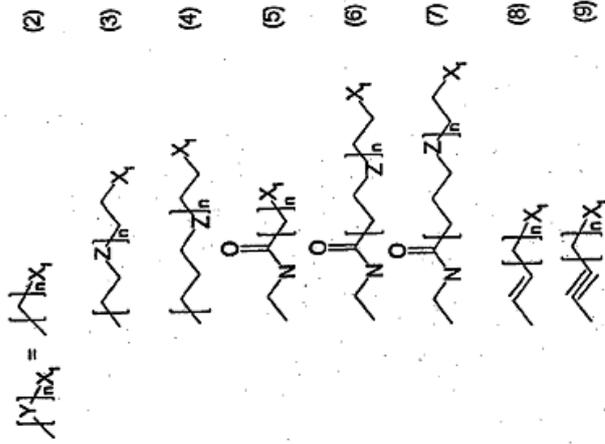
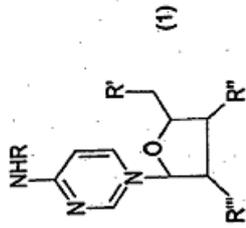
Posibles enlazadores en la posición 5 de pirimidinas



R = Oligo, OH, Fosfato
 R' = Oligo, OH, Fosfato
 R'' = H, OH, OMe, OEt, NH₂
 ...X = HO, H₂N, H₂N, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR, COHal
 n = 1-20

Fig. 4

Posibles enlazadores en amina exocíclica de citosina

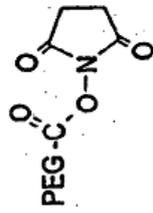


Z = O, NH, NR, S

R' = Oligo, OH, Fosfato
 R'' = Oligo, OH, Fosfato
 R''' = H, OH, OMe, OEt, NH₂
 X = HO, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR, COHal
 n = 1-20

Fig. 5

PEG-NHS + HRN - Espaciador - FG - Oligo

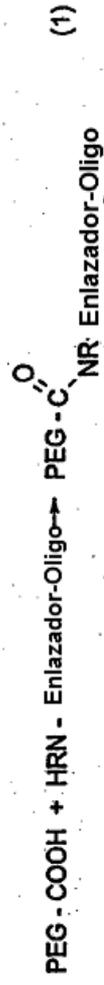


+ HRN - Espaciador - FG - Oligo

R = H, CH₃, Alquilo

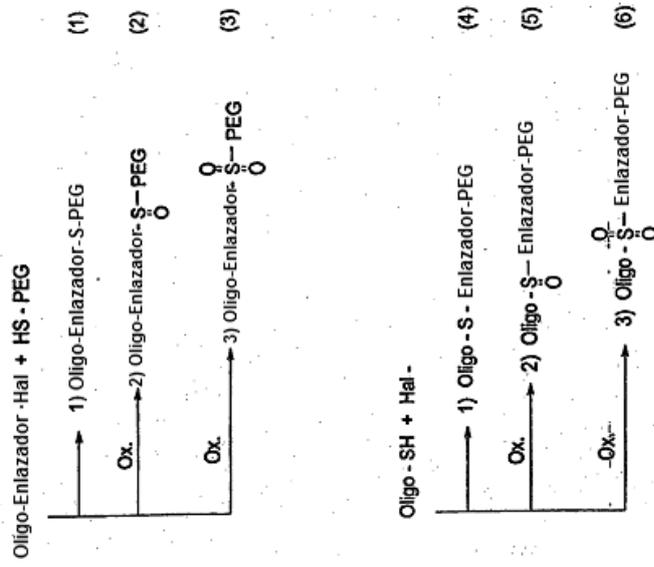


Fig. 6



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 7



Hal: I, Br, Cl

Fig. 8

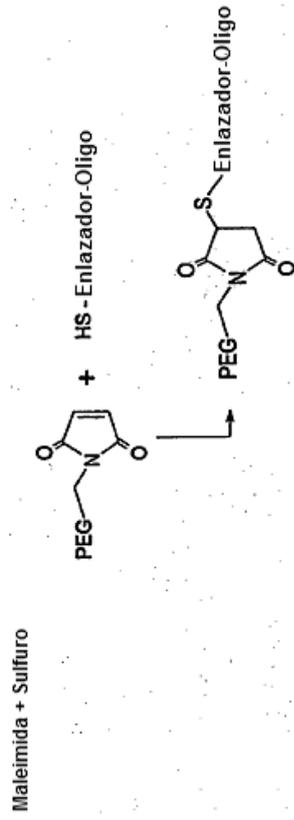


Fig. 9

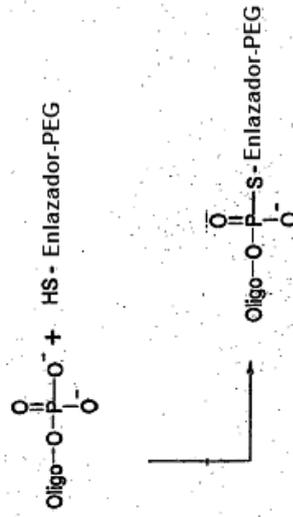


Fig. 10

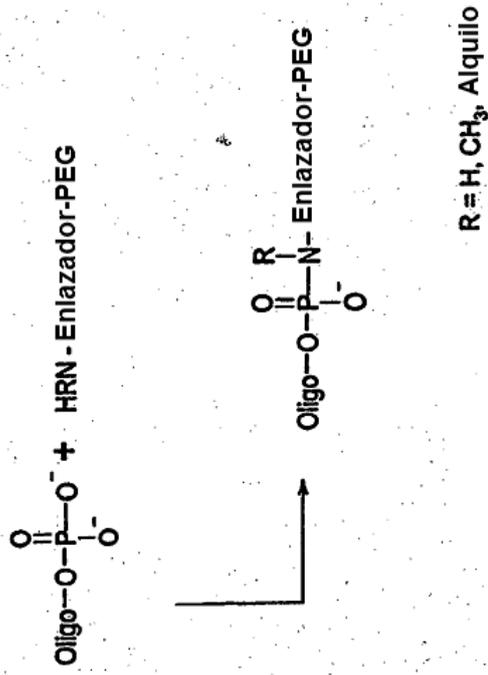


Fig. 11

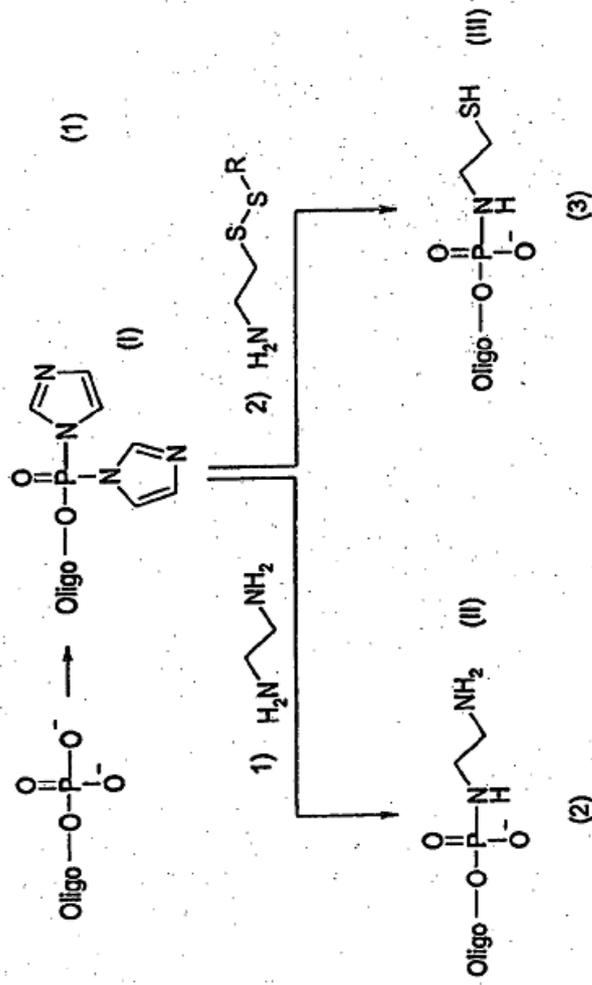
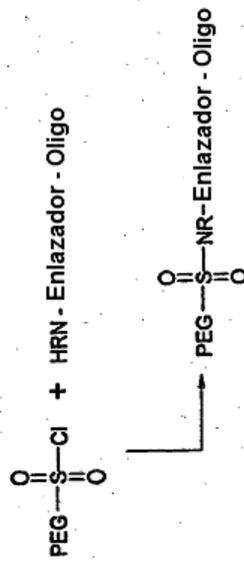


Fig. 12

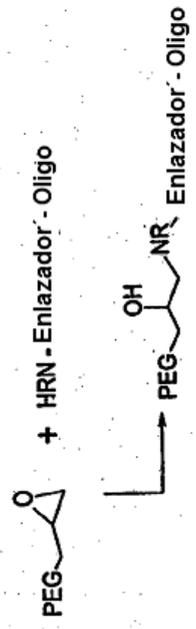
Cloruro de sulfonilo + Amina



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 13

Epóxido + Amina



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 14

Epóxido + Tíol

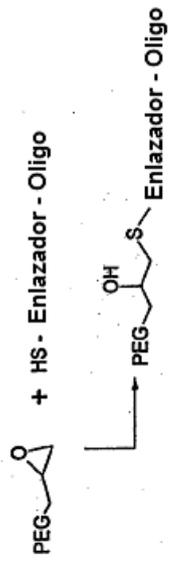


Fig. 15

Isotiocinato + Amina

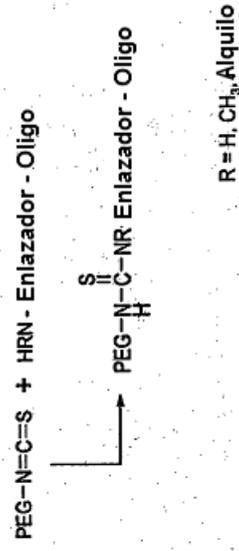
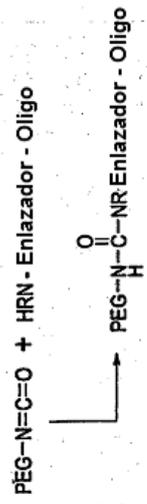


Fig. 16

Isocianato + Amina



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 17

Isocianato + Alcohol

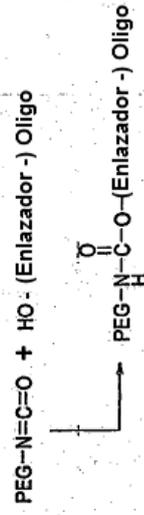
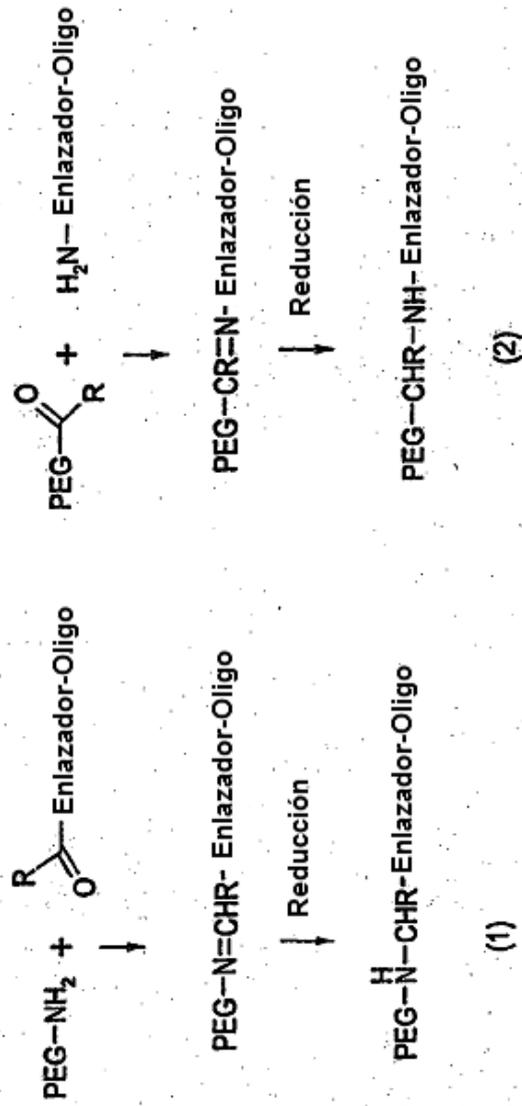


Fig. 18

Aminación reductora



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 19

Disulfuro



Fig. 20

Hidrazina

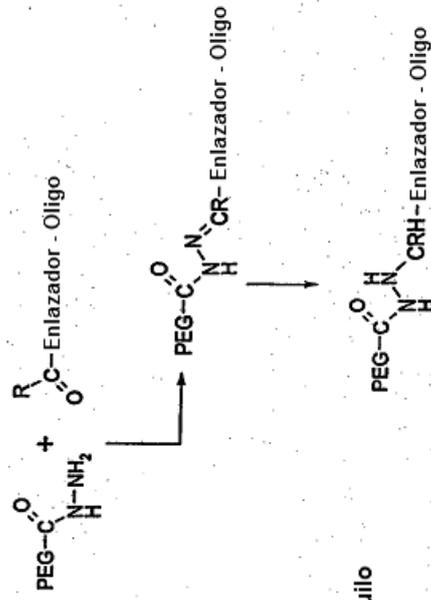
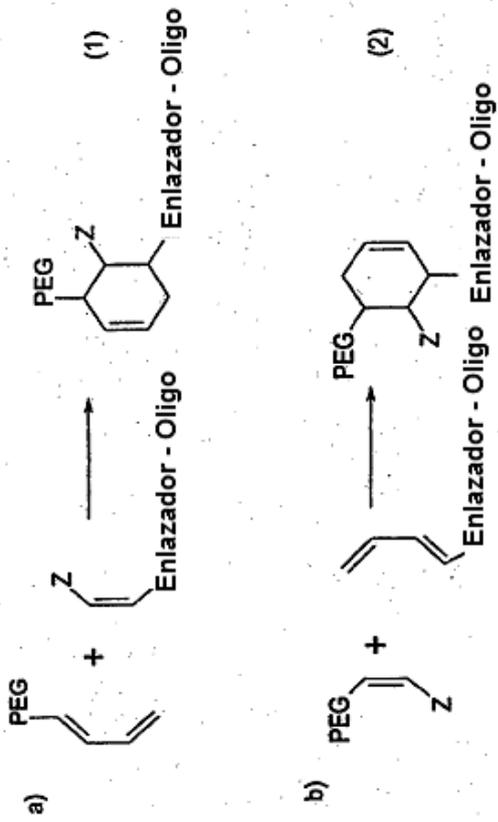


Fig. 21

R = H, CH₃, Alquilo

Reacción de Diels-Alder



Z = Grupo sustractor de electrones tal como, p. ej.,
 NO₂, CH₂Cl, COOR, CN, y otros más
 - o maleimida

Fig. 22

Estructura de metoxi-polietilenglicol lineal y ramificado

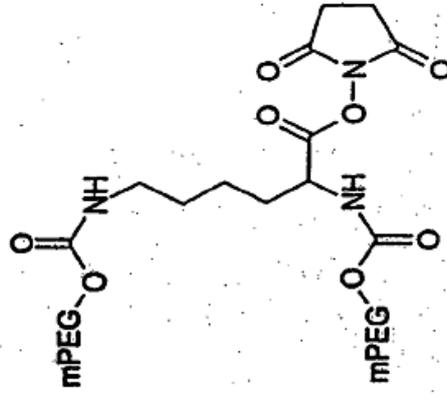
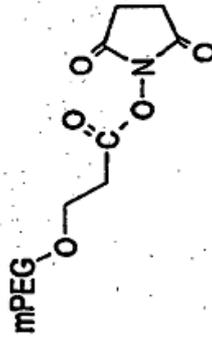
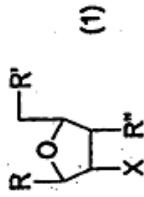


Fig. 23

L-nucleósidos abásicos



R' = HO, Fosfato, Oligo
 R'' = HO, Fosfato, Oligo
 X = H, OH, OMe, OEt, NH₂
 X₁ = HO, H₂N, HRN, HS, SSR,
 Hal, CHO, COOH, COOR, COHal
 Z = CH₂, O, NH, Nalquilo, S
 n = 1-20

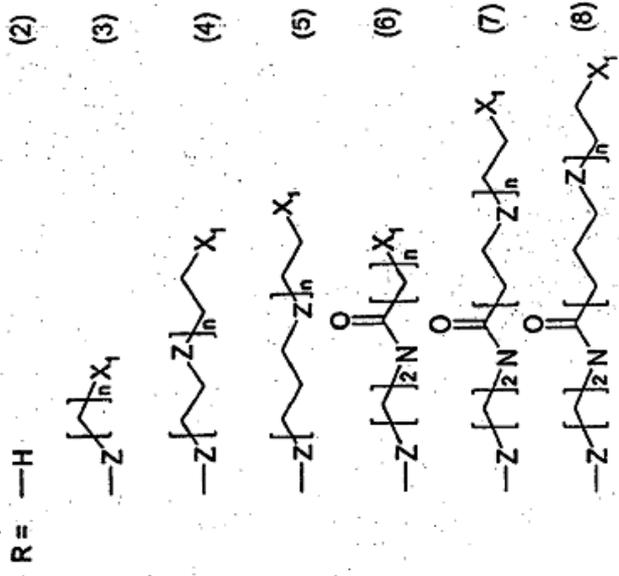


Fig. 24

Test de actividad de un Spiegelmero de ADN PEGilado que se une a GnRH in vivo

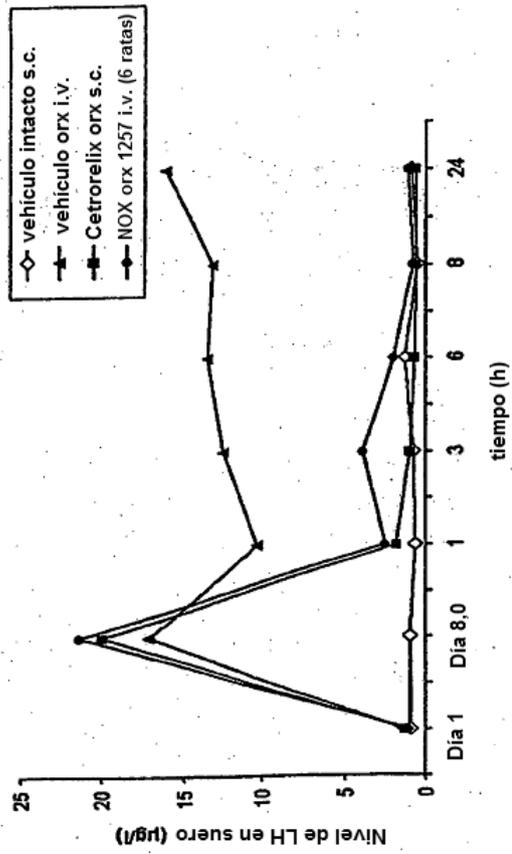


Fig. 25

Test de actividad de un Spiegelmero de ADN PEGilado que se une a GnRH in vitro

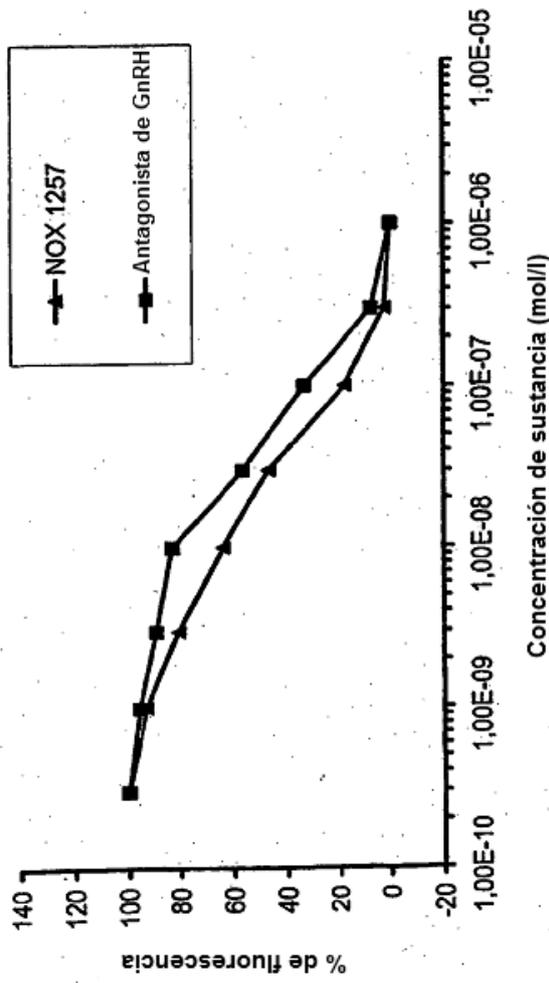


Fig. 26a

Test de actividad de un Spiegelmero de ADN no PEGilado y PEGilado que se une a GnRH in vitro

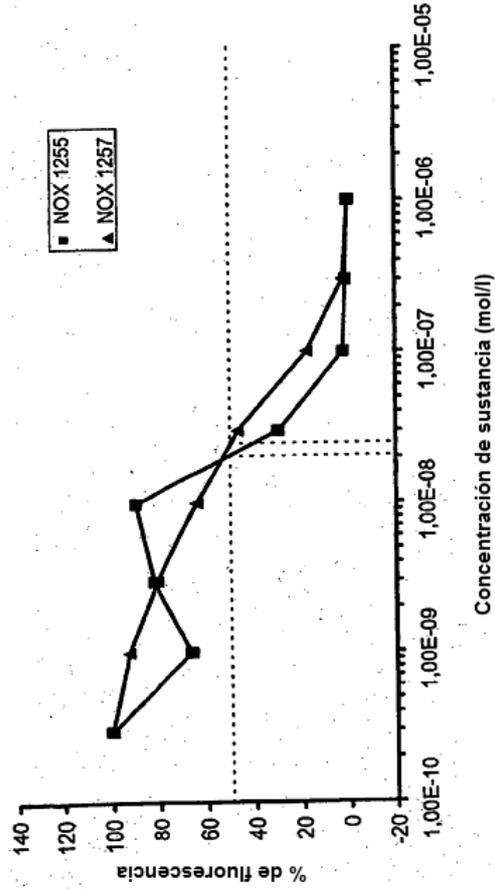


Fig. 26b

Farmacocinética de un spiegelmero de ADN PEGilado que se une a GnRH en ratas

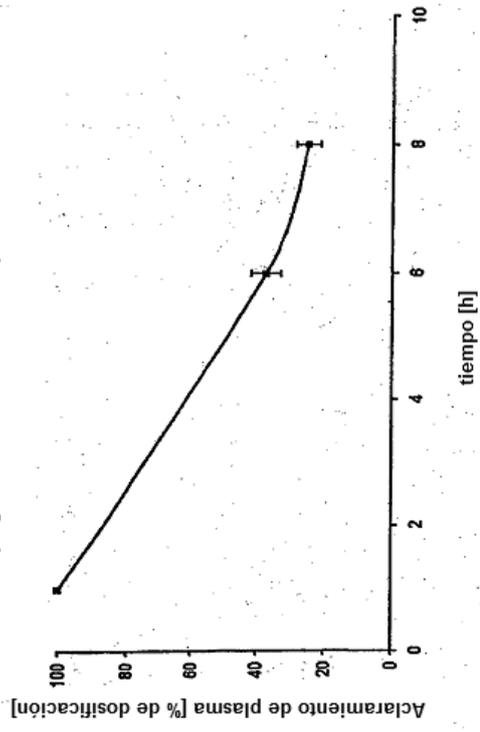


Fig. 27

Perfil farmacocinético de L-ARN PEGilado, administración intravenosa

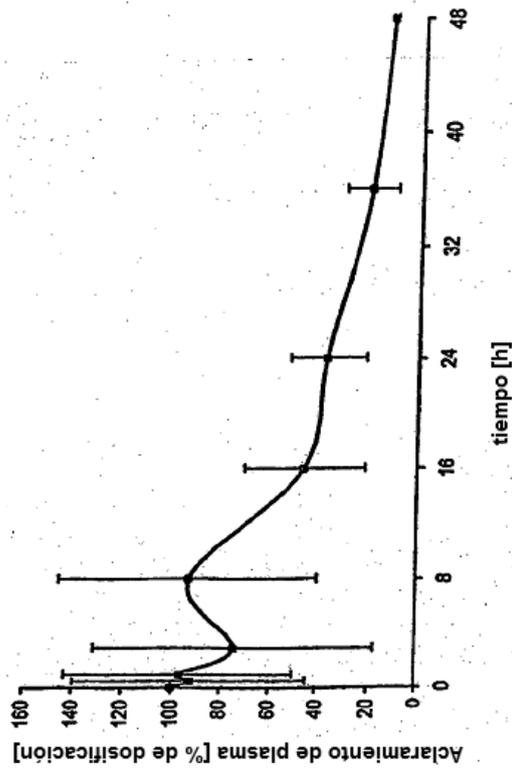


Fig. 28a

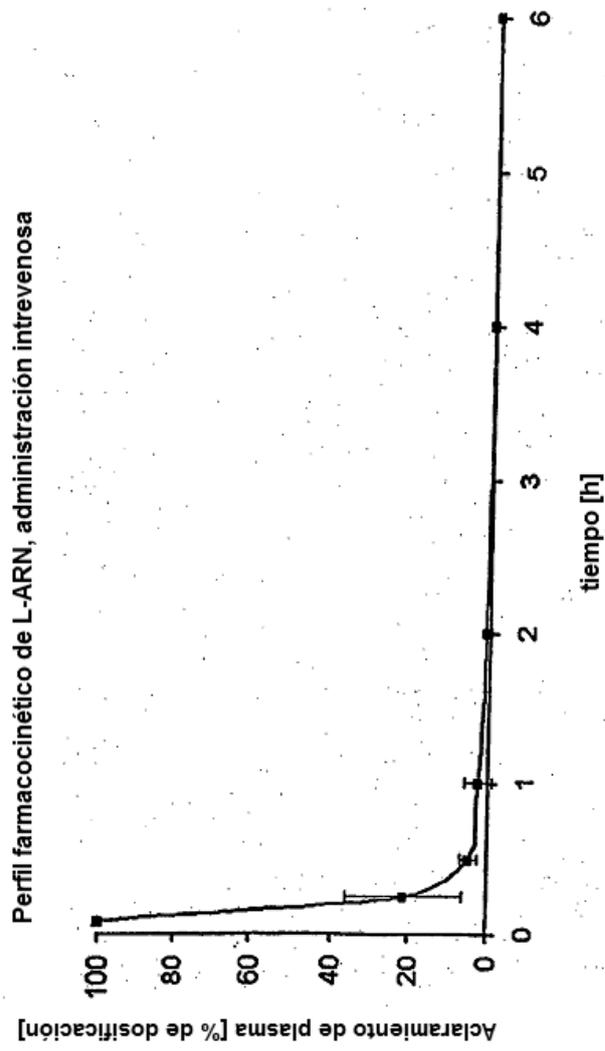


Fig. 28b

Perfil farmacocinético de L-ARN PEGilado, administración subcutánea

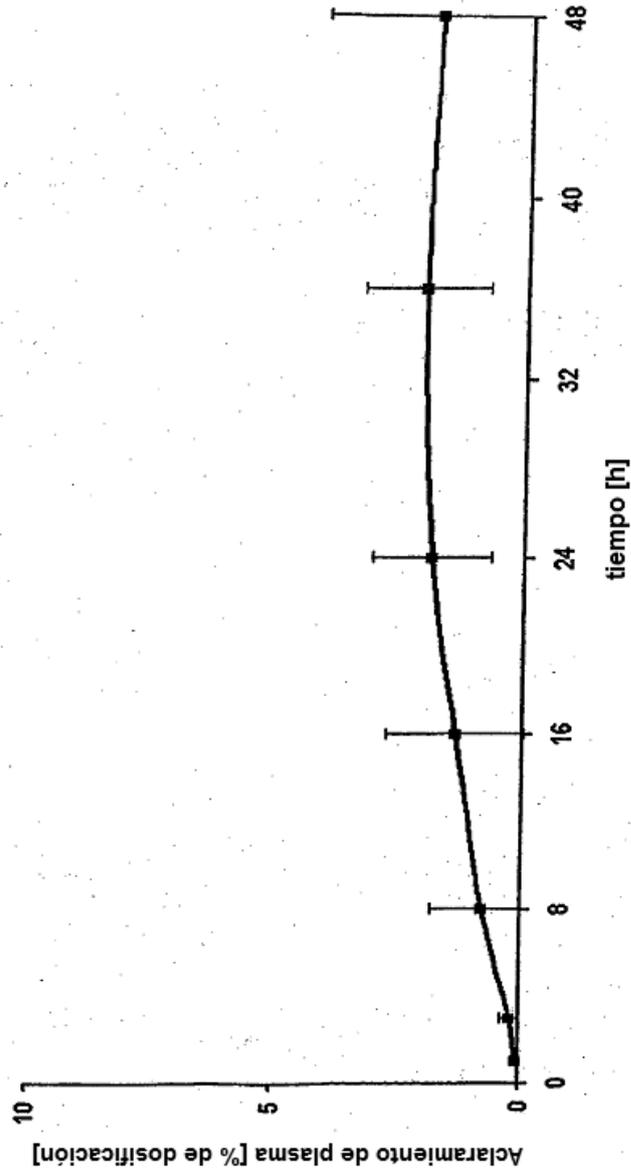


Fig. 28c

Perfil farmacocinético de L-ARN, administración subcutánea

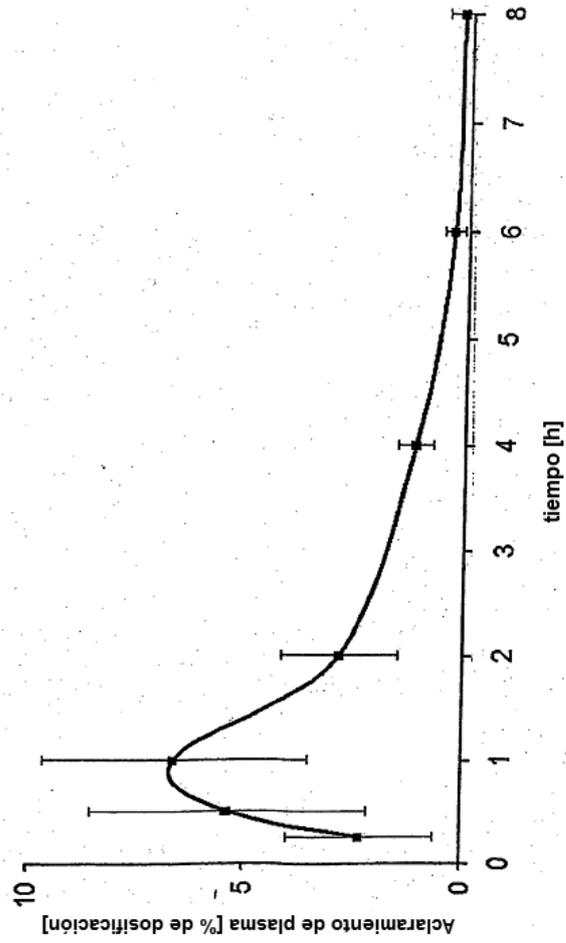


Fig. 28d

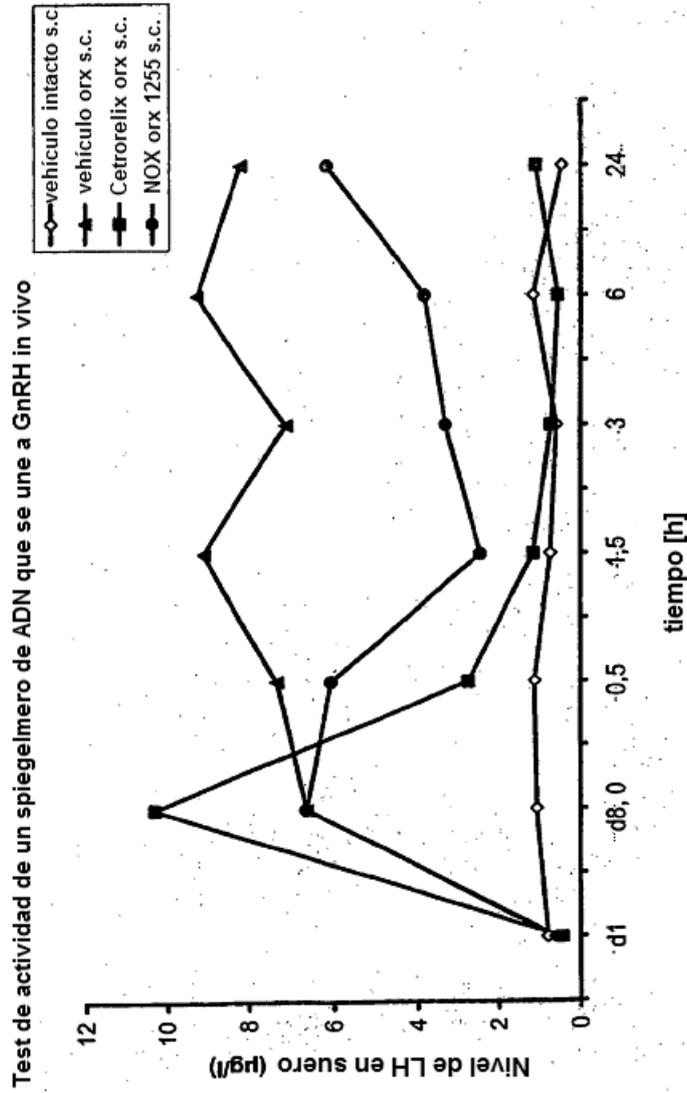


Fig. 29