



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 640**

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 REVISADA

T4

96 Número de solicitud europea: **02783007 .4**

96 Fecha de presentación : **25.10.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1438321**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2004**

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

30 Prioridad: **26.10.2001 EP 01125630**
01.08.2002 EP 02017300

45 Fecha de publicación de la mención y de la
traducción de patente europea: **19.10.2010**

45 Fecha de la publicación de la mención de la
traducción revisada BOPI: **26.04.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción revisada de
patente europea: **26.04.2011**

73 Titular/es: **NOXXON PHARMA AG.**
Max-Dohrn-Strasse 8-10
10589 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Eschgfaller, Bernd;**
Klussmann, Sven y
Lange, Christian

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 346 640 T4

DESCRIPCIÓN

Ácido L-nucleico modificado.

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

Además del uso de moléculas orgánicas comparativamente pequeñas, el desarrollo de nuevos conceptos terapéuticos se basa de manera creciente en anticuerpos monoclonales, péptidos y ácidos nucleicos funcionales, es decir, tal como ácidos nucleicos, que se unen específicamente a una estructura diana. Los exponentes típicos de estos ácidos nucleicos funcionales son los denominados aptámeros, que ya se han desarrollado frente a una multitud de biomoléculas diferentes. Por lo tanto, partiendo de una biblioteca de ácidos D-nucleicos, se aíslan una o más moléculas de ácido nucleico, los denominados aptámeros, que se distinguen por una afinidad particularmente alta frente a su estructura diana, en varias etapas por selección *in vitro*. Los métodos para la preparación de dichos aptámeros se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente Europea EP 0 533 838.

En farmacología, el problema de estabilidad y disponibilidad biológica, expresado como el tiempo medio biológico de los agentes farmacéuticamente activos administrados se conoce suficientemente. Las estrategias para lograr un tiempo medio biológico que permita el efecto óptimo de las sustancias farmacéuticamente activas administradas se concentran por una parte en una modificación apropiada de los agentes farmacéuticamente activos y por otra parte en el desarrollo de formas apropiadas de administración. En el primer caso, existen limitaciones considerables, de manera que debe asegurarse que el compuesto que tiene un tiempo medio biológico incrementado, es decir, tiempo de retención en el organismo que se va a tratar, no pierda sus propiedades farmacológicas, en otras palabras su eficacia así como causar los menores efectos secundarios posibles.

Además de los aptámeros mencionados anteriormente, existe una forma adicional de ácidos nucleicos funcionales en los denominados spiegelmer. Los spiegelmer se unen también específicamente a una secuencia diana, por la que se selecciona frente a la forma enantiomérica de la diana usando una biblioteca de ácidos D-nucleicos, y después los ácidos D-nucleicos que se unen a él se preparan como ácidos L-nucleicos, y como resultado de la reciprocidad quiral éstos son capaces de unirse a la diana verdadera y no a la forma enantiomérica de ésta usada para el proceso de selección. Los métodos para la preparación de dichos spiegelmer se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 98/08856.

Desde un punto de vista puramente químico, los spiegelmer son ácidos L-nucleicos, típicamente L-oligonucleótidos, que virtualmente no pueden ser degradados por las enzimas naturales como resultado de su ensamblaje a partir de L-nucleótidos. Además de la especificidad de diana, esta característica los cualifica para usarlos en áreas muy diferentes, tales como p. ej. análisis de muestras biológicas, diagnóstico y terapia.

De manera similar a otros compuestos químicos, que tienen aplicaciones en diagnóstico así como en terapia, particularmente aquellos que se aplican en un organismo, existe por lo tanto una necesidad de spiegelmer que conviertan estos en una forma que permita que los spiegelmer estén presentes y sean eficaces en un organismo durante un periodo de tiempo largo. Por esto, es un objeto adicional subyacente a la presente invención que la característica de especificidad de la molécula diana para los spiegelmer no se vea influida por la modificación.

Según la invención, el objeto se resuelve en un primer aspecto por un ácido L-nucleico que comprende un resto de ácido L-nucleico y un resto diferente de ácido L-nucleico, y la conjugación del resto de ácido L-nucleico con el resto diferente de ácido L-nucleico da lugar a una excreción del organismo y aclaramiento renal retardados, respectivamente, comparado con un ácido L-nucleico que comprende sólo el resto de ácido L-nucleico, en el que dicho resto de ácido L-nucleico es un spiegelmer y el resto diferente de ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende poli(etilen)glicol lineal, poli(etilen)glicol ramificado, hidroxietil almidón, péptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, polioxipropileno, polioxiamidato, poli(2-hidroxietil)-L-glutamina y polietilen glicol preciso.

En un segundo aspecto, el objeto que subyace a la invención se resuelve por un ácido L-nucleico modificado, que comprende un resto de ácido L-nucleico y un resto diferente de ácido L-nucleico, en el que la conjugación con el resto diferente de ácido L-nucleico da lugar a un tiempo de retención incrementado en un organismo comparado con un ácido L-nucleico que comprende sólo el resto de ácido L-nucleico, en el que dicho resto de ácido L-nucleico es un spiegelmer y el resto diferente de ácido L-nucleico se selecciona del grupo que comprende poli(etilen)glicol lineal, poli(etilen)glicol ramificado, hidroxietil almidón, péptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, polioxipropileno, polioxiamidato, poli(2-hidroxietil)-L-glutamina y polietilen glicol preciso.

En una realización del primer y segundo aspecto se pretende que el resto de ácido L-nucleico se conjugue con el resto diferente de ácido L-nucleico, en el que el resto distinto de ácido L-nucleico tiene un peso molecular de más de aproximadamente 300 Da, preferiblemente más de aproximadamente 20.000 Da, y más preferiblemente más de aproximadamente 40.000 Da.

En una realización adicional de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que el ácido L-nucleico modificado tenga un peso molecular de aproximadamente 600 a 500.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 10.000 a 400.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 50.000 a 300.000 Da.

En una realización adicional más de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que el resto de ácido L-nucleico tenga un peso molecular de 300 a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 25.000 Da, más preferiblemente de 7.000 a 15.000 Da.

Finalmente, en una realización de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que el resto diferente de ácido L-nucleico esté unido directamente o indirectamente al resto de ácido L-nucleico mediante un grupo funcional del resto de ácido L-nucleico, que está presente en o unido a uno de los componentes siguientes del ácido L-nucleico, en el que el grupo funcional se selecciona del grupo que comprende 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.

En una realización de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que la unión del resto diferente de ácido L-nucleico con el resto de ácido L-nucleico ocurra a través del grupo 2'-OH, 3'-OH y/o 5'-OH o un derivado de estos de una o más de las porciones de azúcar del resto de ácido L-nucleico.

En una realización más de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que la unión ocurra a través de al menos una de las posiciones 5 ó 6 de la base de pirimidina.

En una realización adicional más de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que la unión ocurra a través de al menos una de la posición 8 de las bases de purina.

Finalmente, en una realización de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que la unión ocurra en uno o más de los grupos amino exocíclicos y/o endocíclicos y/o grupos ceto de las bases de purina y/o pirimidina y/o posición o posiciones abásicas.

En una realización de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que se disponga un conector entre el resto de ácido L-nucleico y el resto diferente de ácido L-nucleico.

En una realización más de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que el resto de ácido L-nucleico comprenda un ácido nucleico según la SEQ ID NO. 1.

En una realización preferida de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que el resto de ácido L-nucleico tenga un 6-aminohexilfosfato en el extremo 5'-OH como conector.

En una realización particularmente preferida de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención, se pretende que se acople polietilenglicol al amino libre del conector aminohexilfosfato.

En un tercer aspecto el objeto se resuelve usando los ácidos L-nucleicos según la invención para la fabricación de un diagnóstico o medio de diagnóstico.

En un cuarto aspecto el objeto subyacente a la invención se resuelve mediante el uso de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención para la preparación de un medicamento.

En un quinto aspecto el objeto se resuelve por un método para la provisión de un ácido L-nucleico modificado según la invención, que comprende un resto de ácido L-nucleico y un resto diferente de ácido L-nucleico, en el que se pretenden las etapas siguientes:

a) proporcionar un ácido L-nucleico, que forma el resto de ácido L-nucleico o una parte de éste, del ácido L-nucleico modificado;

b) proporcionar uno diferente de ácido L-nucleico, que forma el resto diferente de ácido L-nucleico o una parte de éste, del diferente de ácido L-nucleico modificado;

c) hacer reaccionar el ácido L-nucleico de a) y el diferente de ácido L-nucleico de b); y

d) opcionalmente aislar el ácido L-nucleico modificado obtenido en la etapa c).

En una realización del método según la invención, se pretende que el ácido L-nucleico de la etapa a) comprenda un conector.

En una realización adicional del método según la invención, se pretende que después de proporcionar el ácido L-nucleico en la etapa a), éste se proporcione con un conector.

Además está en el alcance de la presente invención, que el resto diferente de ácido L-nucleico comprenda un conector y que después de proporcionar el diferente de ácido L-nucleico en la etapa b), éste se proporcione con un conector, respectivamente.

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que después del uso de los ácidos L-nucleicos en un organismo como por ejemplo un organismo mamífero y en particular en un mamífero que se selecciona preferiblemente del grupo que comprende seres humanos, monos, perros, gatos, ovejas, cabras, conejos, cobayas, ratones y ratas, aunque los ácidos L-nucleicos no se metabolizan, lo que vuelve a que las nucleasas que se encuentran en dichos organismos como norma, no reconocen los ácidos L-nucleicos como sustrato debido a su estereoespecificidad, el tiempo medio biológico de los ácidos L-nucleicos en dichos organismos es sin embargo comparativamente bajo. Por lo tanto se observó, que después de la administración *in vivo* de los ácidos L-nucleicos no modificados de secuencia aleatoria a ratas y monos el tiempo medio era de entre 30 minutos y 6 horas. También, usando un ácido L-nucleico, es decir un spiegelmer, que está dirigido frente a una molécula diana presente en el organismo ensayado, se confirmó la observación anterior de un tiempo medio biológico comparativamente bajo, lo que confirma que esto no es debido a un artefacto como resultado de la no especificidad del ácido L-nucleico. Además, los presentes inventores observaron que el tiempo medio de los ácidos L-nucleicos no modificados es aproximadamente tan alto como el tiempo medio de los ácidos D-nucleicos no modificados. Al mismo tiempo, la estabilidad de los ácidos L-nucleicos no modificados es claramente superior comparada con la estabilidad de los ácidos D-nucleicos no modificados. Sorprendentemente, pudo mostrarse, que debido a la modificación, el tiempo medio de los ácidos L-nucleicos se incrementaba más que después de la modificación de los ácidos D-nucleicos. Así, va a haber un cambio, de manera completamente inesperada, en el tiempo medio de los ácidos L-nucleicos modificados como resultado de la modificación comparado con el tiempo medio de los ácidos D-nucleicos modificados, cuyos tiempos medios son de otra manera similares entre sí en la forma no modificada. En otras palabras, sólo como resultado de la modificación puede conseguirse el efecto deseado de un tiempo medio prolongado de los ácidos nucleicos funcionales, lo que es sólo posible usando ácidos L-nucleicos modificados, y no usando ácidos D-nucleicos modificados. En el caso específico descrito anteriormente, es un spiegelmer para el agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), el que se administró a ratas macho orquidectomizadas. GnRH estimula la síntesis y liberación de la gonadotropina hormona estimuladora del folículo (FSH) y de la hormona luteinizante (LH). Existen niveles incrementados de FSH y LH en ratas macho orquidectomizadas debido a la ausencia de señal de retroalimentación de la testosterona. El spiegelmer específico causó una disminución clara del nivel de LH en un primer estudio (100 mg/kg, aplicación s.c.), sin embargo después de unas pocas horas, pudo observarse una reducción de la eficacia del spiegelmer. En un resultado del mismo estudio con el conjugado GnRH spiegelmer correspondiente y PEG (150 mg/kg, aplicación i.v.) pudo observarse una disminución completa del nivel de LH, sin embargo, que permaneció completamente disminuido durante un periodo de tiempo de 24 horas. El conjugado GnRH spiegelmer y PEG representa un ejemplo de un ácido L-nucleico modificado según la invención. El GnRH spiegelmer corresponde aquí a la parte del ácido L-nucleico, y el PEG a la parte diferente de ácido L-nucleico.

Estos resultados muestran que el tiempo de retención de los ácidos L-nucleicos como spiegelmers en un organismo puede extenderse por una modificación, particularmente por una modificación de alto peso molecular del ácido L-nucleico. La modificación del ácido L-nucleico tiene lugar mediante la unión del mismo con uno diferente de ácido L-nucleico. Sin pretender ajustarse a ninguna teoría, esta sorprendente observación parece volver a que la eliminación del ácido L-nucleico modificado de un organismo, particularmente de un organismo mamífero, se ralentiza como resultado del peso molecular incrementado de un ácido L-nucleico modificado de dicha manera. Como la eliminación se realiza típicamente a través de los riñones, se asume que ahora la velocidad de filtración glomerular de los riñones respecto a los ácidos L-nucleicos modificados está significativamente reducida comparada con la de los ácidos L-nucleicos no modificados, lo que da lugar a un tiempo de retención incrementado, es decir, tiempo medio biológico del ácido L-nucleico modificado comparado con el tiempo de retención del ácido L-nucleico correspondiente pero no modificado.

Es particularmente interesante en este contexto el hecho de que a pesar de la modificación realizada, el ácido L-nucleico modificado, es decir, en particular la parte de ácido L-nucleico de éste, que es responsable de la especificidad para la molécula diana, obviamente no pierde nada de su especificidad. Así, los ácidos L-nucleicos modificados según la invención tienen de manera completamente sorprendente las características que de otra forma no pueden conseguirse normalmente en otros compuestos farmacéuticamente activos, concretamente los que pueden hacerse sin formulaciones galénicas importantes, por ejemplo en la forma de preparaciones de liberación sostenida, que liberan el agente sucesivamente, y en su lugar puede realizarse una modificación directa del agente en cuestión sin que su actividad biológica se vea influida negativamente, en el caso de los spiegelmer expresados particularmente como especificidad de la reacción o la formación de un complejo con su molécula diana respectiva. En otras palabras, los ácidos L-nucleicos modificados según la invención superan la incompatibilidad del agente farmacéuticamente activo con un incremento de su tiempo de retención en un organismo, en particular con una reducción de la eliminación como por ejemplo en la velocidad de filtración glomerular que existe de otra manera en los agentes farmacéuticamente activos y particularmente en moléculas de agente pequeñas de actividad específica. Aquí, es importante que la afinidad del resto de ácido L-nucleico permanezca esencialmente invariable por la conjugación con la parte diferente de ácido L-nucleico.

Lo dicho anteriormente se aplica por supuesto no sólo en el caso del uso de los ácidos L-nucleicos modificados como spiegelmer como agentes terapéuticamente activos, sino también para su uso como medios de diagnóstico, particularmente en su uso como diagnósticos *in vivo*. Un ejemplo típico del uso de spiegelmer como diagnósticos *in vivo* es la formación de imágenes *in vivo*, y en la presente memoria el uso de radionucleótidos que portan spiegelmer para la tomografía de emisión de positrones, en particular. En esta aplicación, está dirigido frente al radionucleótido que sobrevive durante un periodo de tiempo definido exactamente. Si el radionucleótido y así la radiactividad permanecen en el organismo durante un periodo de tiempo más largo, en el que más largo debe tomarse como necesario para realizar el examen respectivo, esto se vería acompañado de una exposición a la radiación radiactiva innecesaria para el paciente y en algunos casos posiblemente incluso que presenta un riesgo para la salud. Por otra parte, en el caso en el que la

eliminación del marcador del medio de diagnóstico y así el marcaje radiactivo del cuerpo ocurra demasiado deprisa, esto daría lugar a que no sea posible un diagnóstico o una declaración de diagnóstico apropiado. Con la disponibilidad de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención los medios de diagnóstico pueden ajustarse de una manera optimizada dependiendo de sus requerimientos respectivos respecto a su tiempo de retención, es decir, su tiempo medio biológico. Esto también se basa en gran medida en la observación de que la velocidad de filtración glomerular se ve limitada de manera importante por un peso molecular de más de aproximadamente 45.000 Da en adelante. De otra manera la eliminación, en particular la velocidad de filtración glomerular, se correlaciona claramente con el tamaño de la molécula. Usando una parte diferente de ácido L-nucleico adecuada, como por ejemplo las descritas en la presente memoria, el tiempo de retención del ácido L-nucleico modificado puede ajustarse exactamente a los requerimientos.

La naturaleza química del resto diferente de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado puede diseñarse virtualmente de manera libre en el alcance de determinados límites. Un requerimiento para el ácido nucleico modificado administrado a un organismo, que debería cumplirse en la multitud de casos de aplicación del ácido L-nucleico modificado, es que el resto diferente de ácido L-nucleico consista en uno o más compuestos no inmunogénicos. Alternativamente, pero si aplicable también adicionalmente a esto, estos pueden ser compuestos lipófilos así como compuestos hidrófilos. Para el experto en la técnica es obvio que dependiendo de las condiciones generales del caso aislado, también pueden reclutarse compuestos ligeramente inmunogénicos, en particular si no se pretende que la administración del ácido L-nucleico modificado según la invención ocurra durante un periodo de tiempo más largo o de manera repetida, sino simplemente una vez. A su vez, este aspecto es particularmente importante si los ácidos L-nucleicos modificados según la invención tienen que administrarse durante un periodo de tiempo más largo o de manera repetida. Como norma, tiene que asegurarse que no se genere ninguna respuesta inmune por el resto diferente de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado según la invención después de la aplicación del ácido L-nucleico modificado, que después de una nueva administración del mismo, daría lugar a una reacción inmunológica o alérgica.

El resto diferente de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado puede diseñarse de manera que más de un resto diferente de ácido L-nucleico se una a o se conjugue con un resto de ácido L-nucleico. Por ejemplo, es posible que dos o más restos diferentes de ácido L-nucleico se unan al resto de ácido L-nucleico. El resto diferente de ácido L-nucleico individual es preferiblemente un polímero, en el que las subunidades del polímero pueden tener un peso molecular comparativamente bajo. También está en el alcance de la presente invención que más de un resto de ácido L-nucleico se una a un resto diferente de ácido L-nucleico.

Un aspecto adicional, que tiene que tenerse en cuenta cuando se selecciona la parte diferente de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado, es el direccionamiento de los spiegelmer hacia determinados compuestos, particularmente hacia determinados órganos o células. Aquí, dependiendo de las circunstancias específicas, el resto diferente de ácido L-nucleico puede ajustarse de manera que el ácido L-nucleico modificado se acumule preferiblemente en determinadas células, tejidos u órganos, independientemente de la especificidad de unión del spiegelmer o el ácido L-nucleico modificado, causada por el resto de ácido L-nucleico.

Típicamente, el peso molecular del resto diferente de ácido L-nucleico es entre 300 y 500.000 Da. El resto de ácido L-nucleico puede acoplarse bien individualmente, de manera múltiple o en cualquier combinación con otros restos diferentes de ácido L-nucleico en la misma o diferente localización del resto de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado.

Está en el alcance de la presente invención que el peso molecular del ácido L-nucleico modificado esté determinado firmemente por la parte diferente de ácido L-nucleico. Básicamente, el ácido L-nucleico modificado puede tener un peso molecular de aproximadamente 600 a 500.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 10.000 a 400.000 Da y más preferiblemente de aproximadamente 50.000 a 300.000 Da. Los pesos moleculares más bajos se consiguen por ejemplo con ácidos L-nucleicos modificados de una clase, que son conjugados con colesterol y típicamente tienen un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a 25 kDa. Los intervalos de pesos moleculares mayores se consiguen por ejemplo con ácidos L-nucleicos modificados de una clase, que son conjugados con HES y a menudo tienen un peso molecular de aproximadamente 100 kDa a 500 kDa. En el caso de que los ácidos L-nucleicos modificados sean conjugados con PEG, el peso molecular preferido es aproximadamente 40 a 70 kDa.

Como resto de la parte diferente de ácido L-nucleico se puede usar por ejemplo:

- poliéter, alcoxioliéter, como por ejemplo poli(etilen) glicoles (PEG) lineales o ramificados, metoxipoli(etilen) glicoles, etoxipoli(etilen) glicoles, PEG precisos (en el que el PEG preciso es una poliamida de la forma $(-\text{NH}-\text{Y}-\text{NH}-\text{CO}-\text{X}-\text{CO}-)$, en el que Y y Z pueden variarse en cada localización como $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_p$ con p diferente en el intervalo de 4-6), poli(2-hidroxietil)-L-glutaminas, polioxiopropilenos, que se distinguen en particular por no ser metabolizables *in vivo* y por esto el efecto de la eliminación controlada causado por el tamaño, es decir, el peso molecular del ácido L-nucleico modificado se refleja de manera particularmente duradera y no se ve afectada por los procesos de degradación de la parte diferente de ácido L-nucleico.

- péptidos, polipéptidos y proteínas, tales como p. ej. albúmina, en el que estos compuestos pueden existir de manera natural así como ser sustancias añadidas desde el exterior.

- polisacáridos, como p. ej. hidroxietil almidón, dextranos, son hasta que son metabolizables y son capaces de afectar el tiempo de retención muy específicamente, como resultado de la velocidad de degradación controlable de manera exacta. El peso molecular del hidroxietil almidón, usado en una realización es entre 10 kDa, preferiblemente entre 40 kDa y 400 kDa, preferiblemente entre 100 kDa y 300 kDa. El hidroxietil almidón tiene un grado molar de sustitución de 0,1 a 0,8 y una proporción de $C_2 : C_6$ en el intervalo de 2 a 20. Respecto al acoplamiento de los polisacáridos al resto de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado se aplica lo que se ha dicho en la presente memoria en el contexto de la parte de azúcar de los ácidos L-nucleicos respecto al uso de los grupos OH y su derivatización.

- esteroides, como p. ej. colesterol. Aunque los esteroides se distinguen por un peso molecular relativamente bajo, sin embargo, esto puede dar lugar ya a un incremento del tiempo de retención del ácido L-nucleico modificado de esta manera. Tiene aún mayor importancia a este respecto el comportamiento de los esteroides que se van a juzgar, en particular del colesterol, que forma un complejo no covalente con lipoproteínas *in vivo*, tal como por ejemplo HDL, por lo cual se consigue un alargamiento de la molécula y así un tiempo medio más largo.

Básicamente, está en el alcance de la presente invención que el resto diferente de ácido L-nucleico se forme también a partir de uno o más D-nucleósidos y D-nucleótidos, respectivamente, en el que estos pueden tener modificaciones adicionales, individualmente o como un todo, como por ejemplo modificaciones para una estabilidad incrementada en sistemas biológicos. Dichas modificaciones son por ejemplo la fluoridación en la posición 2' de la parte de azúcar de los nucleótidos y nucleósidos, respectivamente. Además, estos D-nucleósidos y D-nucleótidos pueden ser un componente de las diferentes partes diferentes de ácidos L-nucleicos, particularmente de los mencionados anteriormente, pero también una parte de uno de los conectores descritos en la presente memoria. Aquí, está en el alcance de la presente invención que uno o varios de los D-nucleósidos o D-nucleótidos pueden comprender también una o más posiciones abásicas.

La unión del resto de ácido L-nucleico con uno o más de los restos diferentes de ácidos L-nucleicos puede ocurrir en principio en todos los componentes o grupos de las dos partes que constituyen el ácido L-nucleico modificado, en el que puede pretenderse que las derivatizaciones ocurran en una o más localizaciones de una o ambas partes, es decir, en el ácido L-nucleico así como en la parte o partes diferente(s) de ácido L-nucleico. La unión puede ocurrir en particular en el grupo 5'-OH, 3'-OH ó 2'-OH del ácido L-nucleico, en particular en la parte ribosa o desoxirribosa de éste.

Al mismo tiempo, también está en el alcance de la presente invención que al menos una parte de los componentes de azúcar de los nucleótidos que constituyen el ácido L-nucleico pueda tener un azúcar distinto de ribosa o desoxirribosa. Dichos azúcares pueden ser por ejemplo pentosas adicionales, tales como por ejemplo arabinosa, pero también hexosas o tetrasas o pueden contener también un átomo de nitrógeno, como por ejemplo en un anillo morfolino o aza o tio azúcar, o modificaciones de azúcar adicionales tales como en ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Estos grupos OH pueden estar presentes por una modificación química apropiada como grupos NH_2 , SH, aldehído, ácido carboxílico, fosfato, yodo, bromo, o cloro. Los grupos funcionales adicionales que permiten una unión en la parte de ácido L-nucleico son conocidos para el experto en la técnica. Hasta donde la unión del resto diferente de ácido L-nucleico con un resto de ácido L-nucleico se describe en la presente memoria, los comentarios se aplican básicamente también para el caso de que más de un resto diferente de ácido L-nucleico se una a la parte de ácido L-nucleico o se conecte a éste, siempre que no se proporcionen declaraciones contrarias.

Adicionalmente, está en el alcance de la presente invención que al menos una parte de los grupos fosfato de los nucleótidos que constituyen el ácido L-nucleico modificado tenga modificación. Dichas modificaciones son por ejemplo fosfotioatos, fosfoditioatos, fosfoamidatos, fosfonatos y modificaciones adicionales conocidas para los expertos en la técnica.

Aparte de la unión del resto de ácido L-nucleico al resto diferente de ácido L-nucleico a través de la porción de azúcar del resto de ácido L-nucleico, la unión también puede ocurrir en el núcleo fosfato, en el que aquí también, como se ha indicado en el contexto de la unión a través de la parte ribosa o desoxirribosa del ácido L-nucleico, puede ocurrir una modificación correspondiente. Eventualmente, son posibles las uniones a través de la posición 5 y/o 6 de la o las bases de pirimidina, posición 8 de la o las bases de purina, así como los grupos amino y ceto exo y endocíclicos de las nucleobases respectivas, si es aplicable también después de la modificación funcional de los mismos, como se ha discutido anteriormente. Aparte de las bases naturales el ácido L-nucleico puede contener una o más bases no naturales, como p. ej. isoguanidina, isocitidina, xantosina, inosina, 2,4-diaminopirimidina. Aquí está en el alcance de la presente invención que cualquiera de las uniones descritas en la presente memoria entre el resto de ácido L-nucleico y el resto diferente de ácido L-nucleico puede ocurrir directamente o indirectamente. Una unión indirecta está presente en particular si un conector se dispone entre el resto de ácido L-nucleico y el resto diferente de ácido L-nucleico, por ejemplo un conector descrito en la presente memoria, y proporciona uno o ambos de los grupos funcionales.

También está en el alcance de la presente invención que entre el resto de ácido L-nucleico y el resto diferente de ácido L-nucleico pueden incluirse uno o más de los denominados conectores. Dicho conector consiste típicamente en al menos un grupo funcional así como un medio para mantener la distancia o un espaciador. Por una parte, la función de este conector puede consistir en facilitar la reacción de acoplamiento. Además o alternativamente puede impartir una función tal como el establecimiento de una distancia espacial entre el resto de ácido L-nucleico y el resto diferente

de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado. Dicha distancia es ventajosa en determinadas circunstancias, por ejemplo si se quieren evitar las interacciones entre las partes que constituyen el ácido L-nucleico modificado, en particular entre el resto de ácido L-nucleico y el resto diferente de ácido L-nucleico o entre dos o más de los restos diferentes de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado.

A su vez, el conector en sí mismo puede comprender uno o más grupos funcionales y puede estar unido a uno de los sitios del resto de ácido L-nucleico mencionado anteriormente al último. Típicamente, el espaciador consiste en cadenas alquilo de diferente longitud, en el que se prefiere una longitud de cadena de 1 a 20, en particular de 4 a 15 y más en particular 6 a 12 átomos de carbono. La cadena alquilo en sí misma puede ser ramificada o portar grupos funcionales adicionales. Una realización típica del espaciador comprende uniones éter entre monómeros individuales, tales como están presentes en p. ej. poli(etilenglicol) o polipropileno, en el que aquí los monómeros están presentes habitualmente 1 a 20 veces en los polímeros. También, en la formación del espaciador a partir de cadenas poliaminoalquilo o poliamidoalquilo es común una frecuencia de un valor de 1 a 20 para los monómeros que constituyen estos polímeros.

El conector puede estar acoplado a uno de los L-nucleótidos, que forman el resto de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado. Alternativamente, el conector puede estar incluido en el oligómero emergente durante la síntesis enzimática o química del ácido L-nucleico. Además, está en el alcance de la presente invención que el ácido L-nucleico se modifique después de la síntesis y se proporcione de ese modo con un conector para el acoplamiento de una parte diferente de ácido L-nucleico.

También está en el alcance de la presente invención que se incluya un conector, por ejemplo, en una posición abásica en un bucle en horquilla o en el extremo 3' - ó 5' - o en otra posición. Si el ácido L-nucleico es un spiegelmer la posición abásica puede estar incluida en una posición del spiegelmer que no es esencial para la unión de la molécula diana, y para la estructura del spiegelmer, respectivamente. Posición abásica se refiere aquí a un sitio de la parte de ácido L-nucleico, que posee de manera análoga a un nucleótido normal el mismo núcleo de fosfato y azúcar, pero en el que la nucleobase está sustituida con un átomo de hidrógeno o un conector, como también se muestra en la Fig. 24.

Los ácidos L-nucleicos modificados, referidos en la presente memoria también como conjugados de ácido L-nucleico, como es ya evidente a partir del detalle anterior respecto a los sitios de unión entre el resto de ácido L-nucleico y el resto diferente de ácido L-nucleico pueden prepararse por varias reacciones, como se explica con más detalle en los siguiente.

- Las amidas ácidas pueden prepararse por reacción de N-hidroxisuccinimida (NHS) o activaciones similares de ácidos carbónicos, tales como anhídrido, cloruro de ácido, éster, succinimida y maleimida a partir de una amina primaria o secundaria ^{1,2}.

- El tioéter puede prepararse empezando a partir de un haluro o tiol ^{3,4} y puede someterse posteriormente a una oxidación en sulfóxido o sulfona ^{5,6}. Los haluros, en particular haloacetilo (ácido yodoacético, ácido bromoacético) pueden acoplarse a cualquier grupo funcional de una de ambas partes del ácido L-nucleico por enlace éter o amida ácida, y posteriormente el grupo yodo o bromo altamente reactivo puede acoplarse con un tiol libre. El haloacetilo es por lo tanto un caso especial de acoplamiento halogenuro tiol ⁷. El tioéter también puede prepararse empezando a partir de maleimida y tiol ⁷⁻⁹, isotiourea a partir de isotiocianato y amina ¹⁰, isourea empezando a partir de isocianato y amina ¹¹, carbamato empezando a partir de isocianato y alcohol ¹², uniones C-C por medio de una reacción de Diels-Alder ¹³, heterociclos por cicloadición 1,3 dipolar ¹³, aminas por aminación reductora, seguido de la reacción de, por ejemplo, aldehído o cetona con una amina después de reducción posterior ¹⁴, amida ácida empezando a partir de un ácido y una amina ^{15,16}, éster empezando a partir de ácido carbónico o los ácidos carbónicos activados mencionados anteriormente y alcohol, sulfonamida empezando a partir de amina y sulfonylcloruro ¹⁷, aminas secundarias empezando a partir de un epóxido y una amina ^{18,19}, tioéter empezando a partir de un epóxido y un tiol ²⁰, un disulfuro empezando a partir de un tiol y un tiol adicional o un disulfuro ^{21,22}, hidrazonas empezando a partir de una hidracina y un aldehído o una cetona, en el que la hidrazona puede reducirse adicionalmente a una hidracina modificada estable ²³, fosfotioatos empezando a partir de un fosfato o un ácido fosfórico activado, tal como por ejemplo fosforoimidazoluro y un tiol ²⁴, fosforamidato empezando a partir de un fosfato o un ácido fosfórico activado, tal como por ejemplo fosforoimidazoluro o fos-N-hidroxi benzotriazol y una amina ^{24,27}. Así, está en el alcance de la presente invención acoplar en primer lugar un conector a través de una unión fosfoamidato o fosfotioato al resto de ácido L-nucleico y posteriormente al resto diferente de ácido L-nucleico. Dichos conectores pueden ser etilendiamina o cisteamina, en particular.

En principio, las explicaciones anteriores se aplican también al caso de que el grupo reactivo de partida mencionado en primer lugar esté dispuesto en el resto diferente de ácido L-nucleico así como al caso en el que esté dispuesto en el resto de ácido L-nucleico. La modificación correspondiente del ácido L-nucleico en el sentido de que se proporciona un grupo reactivo correspondiente, es conocida para los expertos en esta técnica. Lo mismo se aplica al resto diferente de ácido L-nucleico.

El término ácido L-nucleico se usa en la presente memoria como sinónimo del término L-oligonucleótido o L-polinucleótido y se refiere, entre otros, a ácido L-desoxirribonucleico así como a ácido L-ribonucleico y combinaciones de estos, es decir, que un nucleótido individual o un grupo de nucleótidos está presente como ARN y los nucleótidos adicionales que constituyen el ácido nucleico están presentes como ADN o viceversa. Aquí, también se pretende que

en lugar de desoxirribosa o ribosa otros azúcares pueden formar el componente de azúcar del nucleótido. Además, está comprendido el uso de nucleótidos con modificaciones adicionales en la posición 2', tales como NH₂, OMe, OEt, OAlquilo, NHAlquilo y el uso de nucleobases naturales y no naturales, como por ejemplo isocitidina, isoguanosina. Está así también en el alcance de la presente invención que el ácido L-nucleico tenga las denominadas posiciones abásicas, es decir, nucleótidos, cuya nucleobase está ausente. Dichas posiciones abásicas pueden estar dispuestas en la secuencia nucleotídica del ácido L-nucleico así como en uno o ambos extremos, es decir, el extremo 5' y/o 3'.

Además está en el alcance de la presente invención que el ácido L-nucleico contenga uno o más D-nucleósidos o D-nucleótidos. Aquí, el o los varios D-nucleósidos o nucleótidos pueden estar dispuestos en el ácido L-nucleico así como en uno o ambos extremos del ácido L-nucleico. El único D-nucleósido o D-nucleótido puede portar una o más modificaciones, por ejemplo para incrementar la estabilidad del nucleósido o el nucleótido, respectivamente, y su unión al ácido L-nucleico, respectivamente.

En principio, el ácido L-nucleico puede estar presente en forma bicatenaria o monocatenaria. Típicamente, es un ácido L-nucleico monocatenario, que puede formar, sin embargo, estructuras secundarias definidas y así también estructuras terciarias, debido a su secuencia primaria. En la estructura secundaria una multitud de ácidos L-nucleicos tiene secciones bicatenarias.

Aparte de las modificaciones de alto peso molecular descritas en la presente memoria en particular, los ácidos L-nucleicos también pueden referirse a modificaciones respecto a nucleótidos individuales del ácido nucleico, en el que aquí p. ej. el grupo 2'-OH de la porción de azúcar de los nucleótidos puede estar presente como un metiléter, como ya se ha descrito anteriormente.

Los ácidos L-nucleicos y las partes de ácido L-nucleico, respectivamente, descritas en la presente memoria son preferiblemente ácidos nucleicos funcionales. A los ácidos nucleicos funcionales pertenecen, entre otros, aptámeros, spiegelmer, ribozimas y aptazimas. Preferiblemente, los ácidos L-nucleicos y las partes de ácido L-nucleico, respectivamente, son spiegelmer. Como ya se ha mencionado en el comienzo, los spiegelmer son ácidos nucleicos que se unen a una molécula diana o una parte de ésta 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 poner en contacto una biblioteca de ácido nucleico, en particular una biblioteca de ácido nucleico estadística, con la molécula diana.

Para un método de selección para el desarrollo de ácidos nucleicos funcionales se preparan en primer lugar bibliotecas de ADN combinatorias. Como norma, es una síntesis de oligonucleótidos de ADN, que contienen una región de 10-100 nucleótidos aleatorizados en el centro, que está flanqueada 5' y 3' terminalmente por dos sitios de unión de cebador. La preparación de dichas bibliotecas combinatorias se describe, por ejemplo, en Conrad, R.C., Giver, L., Tian, Y. y Ellington, A.D., 1996, *Methods Enzymol.*, Vol 267, 336-367. Dicha biblioteca de ADN monocatenario sintetizado químicamente puede convertirse en una biblioteca bicatenaria por la reacción en cadena de la polimerasa, que puede usarse para una selección en sí misma. Como norma, tiene lugar una separación de las cadenas individuales con métodos adecuados, de manera que se recupera una biblioteca monocatenaria, que se usa para el método de selección, si es 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). Es incluso posible usar la biblioteca de ADN sintetizado químicamente directamente para la selección *in vitro*. Además, en principio puede generarse una biblioteca de ARN a partir de ADN bicatenario, si un promotor T7 se ha incluido previamente, también por una polimerasa dependiente de ADN adecuada, p. ej. T7 ARN polimerasa. Con la ayuda de los métodos descritos, es posible generar bibliotecas de 10¹⁵ y más moléculas de ADN o ARN. Cada molécula de esta biblioteca tiene una secuencia diferente y así una estructura tridimensional diferente. Por los métodos de selección *in vitro* es ahora posible aislar una o más moléculas de ADN a partir de la biblioteca mencionada, que tienen una propiedad de unión significativa frente a una diana dada, por uno o más ciclos de selección y amplificación así como mutación, si es aplicable. Las dianas pueden ser virus, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas tales como metabolitos del metabolismo, agentes farmacéuticos y metabolitos de éstos, u otros compuestos químicos, bioquímicos o biológicos, tales como se describen, por ejemplo, en Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. y Yarus, 1995, *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 6, 763-797 y Lorsch, J.R. y Szostak, J.W., 1996, *Combinatorial Libraries, Synthesis, Screening and application potential*, ed. Riccardo Cortese, Walter de Gruyter, Berlín. El procedimiento se realiza de tal manera que las moléculas de ADN o ARN que se unen se aíslan a partir de la biblioteca usada inicialmente y se amplifican después de la etapa de selección por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. En la selección del ARN se pone una transcripción inversa delante de la etapa de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa. Una biblioteca enriquecida después de un primer ciclo de selección puede usarse para un nuevo ciclo de selección, de manera que las moléculas enriquecidas en el primer ciclo de selección tienen la oportunidad de prevalecer de nuevo por selección y amplificación y entrar en un ciclo nuevo de selección con aún más moléculas hijas. Al mismo tiempo, la etapa de la reacción en cadena de la polimerasa presenta la posibilidad de introducir nuevas mutaciones durante la amplificación, p. ej. variando la concentración de sal. Después de suficientes ciclos de amplificación y selección las moléculas que se unen prevalecen. De esta manera surge un conjunto enriquecido, cuyos miembros pueden separarse por clonación, y posteriormente determinarse respecto a su estructura primaria por métodos comunes para determinar una secuencia. Las secuencias obtenidas se ensayan para estudiar sus propiedades de unión respecto a la diana. El método para la generación de dichos aptámeros también se refiere como método SELEX y se describe, por ejemplo, en EP 0 533 838, cuya descripción se incluye en la presente memoria por referencia.

Las mejores moléculas de unión pueden acortarse a su dominio de unión esencial por acortamiento de las secuencias primarias, y prepararse por síntesis química o enzimática.

Una forma especial de aptámeros que se puede fabricar de dicha manera son los denominados spiegelmer, que se caracterizan esencialmente por estar constituidos al menos parcialmente, preferiblemente completamente, por los L-nucleótidos no naturales. Los métodos para la preparación de dichos spiegelmer se describen en PCT/EP 97/04726, cuya descripción se incluye en la presente memoria por referencia. La característica específica del método descrito en la presente memoria, es 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, estando en su forma o configuración natural, o dicha estructura diana. El método de selección *in vitro* descrito anteriormente se usa para seleccionar ácidos nucleicos o secuencias de unión inicialmente frente a los enantiómeros, es decir, la estructura no natural de una diana natural, como por ejemplo en el caso de que la molécula diana sea una proteína, frente a una D-proteína. Las moléculas de unión resultantes obtenidas de esta manera (D-ADN, D-ARN, y D-derivados correspondientes, respectivamente) se determinan en lo que se refiere a sus secuencias y la secuencia idéntica se sintetiza con módulos de ácido nucleico que son imágenes especulares (L-nucleótidos y derivados de L-nucleótidos, respectivamente). Los ácidos nucleicos enantioméricos que son imágenes especulares resultantes (L-ADN, L-ARN y L-derivados correspondientes, respectivamente), denominados spiegelmer, tienen por razones de simetría una estructura terciaria que es imagen especular y así una propiedad de unión para la diana presente en su forma o configuración natural.

Las moléculas diana descritas anteriormente, también referidas como diana, pueden ser moléculas o estructuras, tales como p. ej. virus, viroides, bacterias, superficies celulares, orgánulos celulares, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, pequeñas moléculas tales como metabolitos del metabolismo, agentes farmacéuticos y metabolitos de estos, u otros compuestos químicos, bioquímicos o biológicos.

En lo siguiente, la invención se ilustra adicionalmente por las figuras y ejemplos de los que resultan ventajas, realizaciones y características adicionales de la invención.

La Fig. 1 muestra un conector hexilamina, que tiene un espaciador lineal ("medio para mantener la distancia") que consiste en seis átomos de carbono así como un grupo amino terminal y un resto fosfato terminal. La sustitución indicada con R puede presentar aquí también un ácido nucleico y el resto de ácido L-nucleico de un ácido L-nucleico modificado, respectivamente. A través del grupo amino el resto diferente de ácido L-nucleico puede acoplarse al resto de ácido L-nucleico y así se forma el ácido L-nucleico modificado según la invención.

La Fig. 2 muestra conectores adicionales, en los que las estructuras referidas como (2), (4) y (6) corresponden a un conector según (1), (3) y (5), en el que en el último la parte fosfato proporcionada con el resto R representa preferiblemente el resto de ácido L-nucleico, y el resto diferente de ácido L-nucleico del ácido L-nucleico modificado se acopla a través del grupo funcional denominado X en el ácido L-nucleico. El término "oligo" significa ejemplarmente un oligonucleótido, en el que está en el alcance de la presente invención, que éste y el ácido L-nucleico o las partes de ácido L-nucleico, respectivamente, en la presente memoria pueden ser generalmente L-polinucleótidos. Los distintos sustituyentes se refieren en la presente memoria a los grupos reactivos siguientes, que son individuales y cada uno independiente de los demás:

X = OH, NH₂, HS, Hal, CHO, COOH.

Y = O, NH, NMe, S, CH₂.

Z₁, Z₂, Z₃, Z₄, Z₅ y Z₆ = H, Me, Alquilo, OH(CH₂)_n, HO, H₂N(CH₂)_n, H₂N, F, en el que n es un número entero entre 1 y 20 y en el que Alquilo se refiere a cadenas hidrocarbonadas lineales y ramificadas con preferiblemente 1-20 átomos de carbono, más preferiblemente 1 a 4 átomos de carbono y/o -(CH₂)_nH, -CH[(CH₂)_nH] [(CH₂)_mH], -C[(CH₂)_nH] [(CH₂)_mH] [(CH₂)_jH], -(CH₂)_n(CH₂)_m[(CH₂)_lH] [(CH₂)_kH], -(CH₂)_n(C)_m[(CH₂)_lH] [(CH₂)_kH] [(CH₂)_jH], en el que n, m, l, k y j son números enteros independientes entre sí entre 1 y 8, preferiblemente 1 a 4 átomos de carbono.

La Fig. 3 muestra una visión general de diferentes conectores, que están acoplados a diferentes posiciones de las nucleobases. Así, es notable que la parte de azúcar del nucleósido mostrada en cada caso puede ser una ribosa, una desoxirribosa o una ribosa modificada y desoxirribosa modificada, respectivamente, y el resto X puede ser = H, OH, H₂N, MeO, EtOH o alcoxi. Así, alcoxi, en particular, se refiere a cadenas oxihidrocarbonadas lineales y ramificadas con 1-20 átomos de carbono, preferiblemente 1 a 4 átomos de carbono y/o -O(CH₂)_nH, -CH[(CH₂)_nH] [(CH₂)_mH], -OC[(CH₂)_nH] [(CH₂)_mH] [(CH₂)_jH], -O(CH₂)_n(CH₂)_m[(CH₂)_lH] [(CH₂)_kH], -(CH₂)_n(C)_m[(CH₂)_lH] [(CH₂)_kH] [(CH₂)_jH], en el que n, m, l, k y j son números enteros independientes entre sí entre 1 y 8, preferiblemente 1 a 4 átomos de carbono. La estructura real del conector es X₁-[X]_n en los cuatro nucleósidos (1), (2), (3) y (4) mostrados, en el que n es un número entero entre 0 y 20. X₁ representa un grupo funcional que se selecciona del grupo que comprende HO, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR y COHal. En los conectores indicados como fórmulas estructurales (5-12) n es también un número entero entre 0 y 20, y Z significa independientemente de otros sustituyentes O, NH, NR o S, en el que R significa alquilo como se define en la presente memoria.

La Fig. 4 muestra conectores posibles en la posición 5 de los nucleósidos y nucleótidos de pirimidina, respectivamente. Respecto a los restos R', R'' y R''' básicamente se aplica lo que se ha dicho en la presente memoria en el contexto de la Fig. 5. El conector R tiene la estructura -[Y]_n-X₁ y puede adquirir preferiblemente las formas mostradas en las estructuras (2) a (9), en el que Z puede significar O, NH, NHR o S aquí también, independientemente de la elección de los demás sustituyentes, y n puede ser un número entero entre 1 y 20. El grupo funcional X₁ se selecciona preferiblemente del grupo que tiene OH, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR, COHal.

La Fig. 5 muestra en 1 la estructura básica de la citosina, que puede tener diferentes estructuras de conector en su amina exocíclica. Así, R' se refiere a un ácido L-nucleico o a un L-polinucleótido, OH, o fosfato, R'' a un ácido L-nucleico o a un L-polinucleótido, OH o fosfato y R''' a H, OH, OMe, OEt, NH₂. El resto R se refiere así al conector, que tiene la estructura básica $-[Y]_n-X_1$ y puede tener las fórmulas estructurales mostradas en (2) a (9), en el que Z = O, NH, NR, S y n puede ser un número entero entre 1 y 20. El grupo funcional X₁ se selecciona preferiblemente del grupo que tiene OH, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR, COHal.

La Fig. 6 muestra la formación de un ácido L-nucleico modificado según la invención por reacción de PEG-NHS con un ácido L-nucleico proporcionado con un conector. Después del acoplamiento exitoso está presente el ácido L-nucleico modificado, que comprende en el caso presente PEG como el resto diferente de ácido L-nucleico y en este caso real un oligonucleótido como ácido L-nucleico, en el que un conector o un espaciador, respectivamente, que porta un grupo amino se inserta entre ambos, y se vuelve una unión amida ácida entre el conector y el PEG. Además del ácido L-nucleico modificado la N-hidroxisuccinimida separada del PEG se obtiene como un producto adicional de la reacción. Como restos posibles se prefieren R, H, CH₃ y en general cadenas alquilo con una longitud de 1-20. El grupo funcional puede ser en principio el producto de una cualquiera de las reacciones explicadas en la presente memoria anteriormente. Hasta el momento, las realizaciones del conector descritas en asociación con las figuras adicionales, en particular Fig. 2 y 3, también se aplican a este contexto. Lo mismo se aplica a los sustituyentes y variables de control como n representadas en la fórmula.

La Fig. 7 muestra la conversión de diferentes derivados de PEG con diferentes conectores. Aquí, las dos reacciones (1) y (2) se diferencian sólo en que en la reacción (1) el grupo carboxilo está presente en el PEG y en la reacción (2) el grupo carboxilo está presente en un L-oligonucleótido proporcionado con un conector. El grupo funcional del compañero de reacción correspondiente respectivo, es decir, en el caso de la reacción (1) el ácido L-nucleico proporcionado con un conector, y en el caso de la reacción (2) el PEG proporcionado con un grupo amino. Así, se confirma la declaración que se hizo en el contexto de las diferentes reacciones como anteriormente, que son posibles entre un resto de ácido L-nucleico y un resto diferente de ácido L-nucleico, si es aplicable con la participación de uno o más conectores insertados, de que en principio los grupos reactivos mencionados pueden estar presentes en todos los compañeros de reacción que están implicados. Las estructuras finalmente obtenidas se diferenciarán entre sí correspondientemente, de manera que en el caso de la reacción (1), en la que está presente un grupo amida ácido en el PEG y en el caso de la reacción (2), en la que la amida ácida de unión está presente en la construcción de conector y oligonucleótido, es decir, el ácido L-nucleico. Respecto a los sustituyentes R se aplica lo que se ha dicho en el contexto de la figura 6, correspondientemente.

La Fig. 8 muestra la reacción de un halogenuro con un tioéster, que están unidos bien al resto diferente de ácido L-nucleico o al resto de ácido L-nucleico, respectivamente. En las reacciones (1) a (3) se pretende que el ácido L-nucleico, aquí como en todas las figuras abreviado como oligo, se proporcione con un conector, y que el conector porte un halogenuro, como por ejemplo I, Br, Cl. Este ácido L-nucleico derivatizado se hace reaccionar acto seguido con un PEG proporcionado con un grupo tiol, preferiblemente un grupo tiol terminal. En el caso de la reacción (1) ocurrirá un enlace tioéter entre el conector y PEG. Por oxidación puede resultar, como se muestra en la reacción (2), la formación de un sulfóxido o una sulfona, respectivamente. En las reacciones según (4) a (6) también ocurre una reacción entre un tiol y un halogenuro, en la que en estos casos el ácido L-nucleico se proporciona con el grupo tiol, y el conector porta el halogenuro. Correspondientemente, ocurre una formación de compuestos, en la que el azufre se dispone entre el ácido L-nucleico y el conector, y puede oxidarse, como se muestra en las reacciones (5) y (6), de nuevo a los derivados correspondientes.

La Fig. 9 muestra la reacción del PEG proporcionado con un grupo maleimida con un ácido L-nucleico, referido como oligo, que tiene un conector que porta un grupo tiol. El producto de la reacción es un tioéter.

La Fig. 10 muestra la reacción de un ácido L-nucleico que porta un grupo fosfato con un PEG, que se proporciona con un conector que porta un grupo tiol. El producto de la reacción es un fosfotioato.

La Fig. 11 muestra la reacción de un ácido L-nucleico proporcionado con un resto fosfato, terminal si es aplicable, con un PEG, que se proporciona con un conector que tiene una amina. El producto de la reacción es un fosfoamidato. Respecto al resto R se aplica lo que se detalló en el contexto de la Fig. 6.

La Fig. 12 muestra la inserción de un grupo amino o tiol reactivo, respectivamente, en un ácido L-nucleico usando un grupo fosfato activado, preferiblemente un grupo fosfato terminal del ácido L-nucleico. Aquí, se hace un fosforimidazoluro (I) en una primera etapa, que da lugar a la formación de un 2-aminoetilen-1-fosforamidato (II) en el caso de la reacción (2) usando una etilendiamina, o en el caso de la reacción (3) usando cisteamina a 2-tioetilen-1-fosfoamidato (III), respectivamente. Los compuestos según (II) y (III) pueden reaccionar acto seguido con los diferentes de ácido L-nucleico, particularmente con los descritos en la presente memoria.

La Fig. 13 muestra la reacción de un PEG proporcionado con un grupo cloruro de sulfonilo con un ácido L-nucleico que tiene un conector que porta un grupo amino. El producto de la reacción es una sulfonamida. Respecto al resto R se aplica lo que se detalló en el contexto de la Fig. 6.

La Fig. 14 muestra la reacción de un PEG proporcionado con un grupo epóxido con un ácido L-nucleico que tiene un conector que porta un grupo amino que forma una amina. Respecto al resto R se aplica lo que se detalló en el contexto de la Fig. 6.

La Fig. 15 muestra la reacción de un PEG proporcionado con un grupo epóxido con un ácido L-nucleico que tiene un conector proporcionado con un grupo tiol. El producto de la reacción es un tioéter.

La Fig. 16 muestra la reacción de un PEG proporcionado con un grupo isotiocianato con un ácido L-nucleico que tiene un conector que porta un grupo amino. El producto de la reacción es una isotiourea. Respecto al resto R se aplica lo que se detalló en el contexto de la Fig. 6.

La Fig. 17 muestra la reacción de un PEG proporcionado con un grupo isocianato con un ácido L-nucleico que tiene un conector que porta un grupo amino que forma una isourea. Respecto al resto R se aplica lo que se detalló en el contexto de la Fig. 6.

La Fig. 18 muestra la reacción de un PEG proporcionado con un grupo isocianato con un ácido L-nucleico que porta un grupo OH libre, que puede venir directamente del ácido L-nucleico, como por ejemplo de un grupo fosfato o el resto de azúcar del nucleósido, es decir, las posiciones 2'-OH, 3'-OH ó 5'-OH. Alternativamente, el grupo OH puede unirse al ácido L-nucleico a través de un conector adecuado. El producto de la reacción es un carbamato.

La Fig. 19 muestra la reacción de un grupo aldehído o ceto con un grupo amino, que está presente en cada caso bien en el resto diferente de ácido L-nucleico (reacción (1)), en el caso mostrado en PEG; o en el resto de ácido L-nucleico (reacción (2)). Preferiblemente aquí, el resto de ácido L-nucleico tiene un conector 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 un grupo amino, mientras que el ácido L-nucleico tiene un conector que porta el grupo carbonilo. El producto de la reacción obtenido directamente, imina, se convierte acto seguido en una amina por reducción. En el caso de la reacción (2) el PEG que porta un grupo carbonilo se hace reaccionar con el ácido L-nucleico, que porta un conector que tiene un grupo amino. El producto de la reacción imina se reduce y da lugar a una amina. Respecto al resto R se aplica lo que se detalló en el contexto de la Fig. 6.

La Fig. 20 muestra la reacción de un PEG proporcionado con un grupo tiol con un ácido L-nucleico que porta un conector proporcionado también con un grupo tiol. El producto de la reacción es un ácido L-nucleico modificado que tiene un grupo disulfuro entre el PEG y el ácido L-nucleico, hablando estrictamente con el conector unido a él.

La Fig. 21 muestra la reacción de un PEG proporcionado con un grupo hidracina con un ácido L-nucleico que porta un conector que comprende un grupo carbonilo. En una primera etapa de la reacción, se obtiene una hidrazona que se convierte acto seguido de manera reductora en una hidracina sustituida. Respecto al resto R se aplica lo que se detalló en el contexto de la Fig. 6.

La Fig. 22 muestra en la reacción (1) la conversión de un PEG proporcionado con un dieno conjugado con un ácido L-nucleico que porta un conector con un denominado grupo dienofílico. El dienófilo consiste en un enlace doble C-C, que a su vez tiene un sustituyente Z que comprende un grupo que obtiene electrones. Éste puede ser preferiblemente NO₂, CH₂Cl, COOR, CN o maleimida. Respecto al resto R se aplica lo que se detalló en el contexto de la Fig. 6. Debido a esta reacción se produce la formación de un ácido L-nucleico modificado que tiene un grupo hexeneilo entre el PEG y el ácido L-nucleico proporcionado con un conector. La reacción de Diels-Alder mostrada en la reacción (2) empieza con un PEG que tiene un dienófilo con un sustituyente Z que reacciona con un ácido L-nucleico que comprende un conector que porta un dieno conjugado. Respecto al sustituyente Z se aplica lo que se detalló en el contexto de la reacción (1). El producto de la reacción en esta reacción (2) también es un conjugado de ácido L-nucleico unido a través de un grupo hexeneilo.

La Fig. 23 muestra la estructura del mPEG-éster de NHS ramificado y lineal que se usó.

La Fig. 24 muestra en (1) el ensamblaje básico de un L-nucleósido abásico, que en lugar de la nucleobase puede tener bien un átomo de hidrógeno o una o más estructuras de conector opcionalmente diferentes. Aquí R' indica un ácido L-nucleico o un L-polinucleótido, OH o fosfato, R'' un ácido L-nucleico o un L-polinucleótido, OH o fosfato y X = H, OH, OMe, OEt, NH₂. El resto R indica bien el átomo de hidrógeno en lugar de la nucleobase o el conector, que puede tener las fórmulas estructurales mostradas en (2) a (8), en las que Z = CH₂, O, NH, NR, S y n puede ser un número entero entre 1 y 20. El grupo funcional X₁ se selecciona preferiblemente del grupo que tiene HO, H₂N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR, COHal.

La Fig. 25 muestra un ensayo de actividad de un spiegelmer de ADN PEGilado que se une a GnRH en ratas macho orquidectomizadas.

La Fig. 26a muestra un ensayo de actividad de un spiegelmer de ADN PEGilado que se une a GnRH *in vitro*.

La Fig. 26b muestra un ensayo de actividad de un spiegelmer de ADN no PEGilado y PEGilado que se une a GnRH *in vitro*.

La Fig. 27 muestra la farmacocinética de un spiegelmer de ADN PEGilado que se une a GnRH en ratas.

La Fig. 28a muestra un perfil farmacocinético de L-ARN PEGilado después de dosis intravenosa en ratas.

La Fig. 28b muestra un perfil farmacocinético de L-ARN no PEGilado después de dosis intravenosa en ratas.

La Fig. 28c muestra un perfil farmacocinético de L-ARN PEGilado después de dosis subcutánea en ratas.

La Fig. 28d muestra un perfil farmacocinético de L-ARN no PEGilado después de dosis subcutánea en ratas.

La Fig. 29 muestra un ensayo de actividad de un spiegelmer de ADN que se une a GnRH en ratas macho orquiectomizadas *in vivo*.

Ejemplo 1

Síntesis de conjugados de PEG de ácidos L-nucleicos

Las condiciones para la síntesis de conjugados de PEG de ácidos L-nucleicos se examinaron empezando a partir del ácido L-nucleico representado en la SEQ ID NO: 2 y PEG, en el que el PEG se modificó de manera que estaba presente bien como un éster de NHS o como una amina primaria para el acoplamiento en una amina y un fosfato, respectivamente. Se procedió de manera que el ácido nucleico se disolvió en un sistema acuoso. El pH se ajustó a pH 6,5-9,0 con diferentes tampones o bases como, por ejemplo, NaHCO₃, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, HEPES, MOPS, NH₄OAc, trietilamina. Se ensayó la influencia de la adición de diferentes disolventes orgánicos, como por ejemplo DMF, DMSO, acetonitrilo y otros, en el que la porción del disolvente orgánico se varió entre 0-100%. Posteriormente, se produjo la adición de diferentes derivados de PEG, como por ejemplo mPEG₂-éster de NHS ramificado, mPEG-éster de NHS lineal o mPEG-NH₂ (Shearwater Corporations) de diferentes pesos moleculares entre 10.000 Da y 40.000 Da. La adición de PEG-éster de NHS puede hacerse de diferentes maneras. Así, el PEG-éster de NHS puede disolverse por ejemplo en un ácido de baja concentración tal como, por ejemplo, 0,01 N HCl, o puede añadirse en gotas disolviéndose en un disolvente orgánico tal como DMF o añadirse como un sólido. La manera preferida de añadir PEG-NHS es como un sólido por partes. Además, se ensayó la influencia de la temperatura de la reacción entre 4°C-65°C. Como ácidos nucleicos se usaron ácidos nucleicos con la secuencia siguiente 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 según la SEQ ID NO: 1. Los rendimientos de las reacciones resumidas anteriormente fueron entre 5-78%.

La variante preferida de la reacción fue la adición de dos equivalentes de PEG-éster de NHS sólido en intervalos de aproximadamente 30 minutos, seis veces en total, a un ácido nucleico disuelto en un disolvente que consiste en 60 partes H₂O y 40 partes de DMF con NaHCO₃ (0,2 M), un pH de 8,0 y 37°. Las condiciones de la reacción dan lugar a un rendimiento de 78%.

Ejemplo 2

Síntesis de un conjugado de PEG de un fosfoamidato de ácido L-nucleico

Empezando a partir de un ácido L-nucleico con la secuencia 5'-PO₄-TAT TAG AGA C-3' (SEQ ID NO: 3) se hizo un conjugado correspondiente fosfoamidato PEG. El ácido L-nucleico (10 OD) se hizo reaccionar con PEG-NH₂ (20.000 Da, lineal, 1-10 equivalentes) en disolución acuosa con EDCI a 50°C a un conjugado de PEG de un fosfoamidato de ácido L-nucleico. El análisis y purificación se hicieron de manera análoga a la de la PEGilación de los ácidos L-nucleicos con PEG-NHS, como se ha descrito en el ejemplo 1. Las condiciones de la reacción no se optimizaron y dieron lugar a un rendimiento de < 8%.

Ejemplo 3

PEGilación de un spiegelmer ligando de GnRH

La hormona peptídica GnRH I (hormona liberadora de gonadotropina, gonadoliberina), que se refiere generalmente como GnRH, es un decapeptido hecho en el hipotálamo que estimula la secreción de las hormonas gonadotrópicas hormona luteinizante y hormona estimuladora del folículo (FSH) por la glándula pituitaria. GnRH es secretada por las neuronas del hipotálamo en pulsos y se une a un receptor en la superficie celular de la glándula pituitaria. El complejo ligando receptor se internaliza, por lo que ocurre una liberación de FSH y LH, que a su vez estimula la producción de hormonas sexuales tales como estrógeno, progesterona o testosterona. Pudo producirse un spiegelmer, es decir, un ácido L-nucleico que se une específicamente a GnRH y tiene la secuencia siguiente:

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 spiegelmer de la secuencia mostrada anteriormente se realizó en un sintetizador de ADN Biotech Oligopilot II de Amersham Pharmacia en escala de 780 µMol en una fase sólida 1.000 Å CPG (Controlled Pored Glass) según la química de 2-cianoetil-fosforamidita (Sinha *et al.* NAR, 12, 1984, p. 4539ff). Posteriormente, se unió una 6-(monometoxitritilamino)-hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita al extremo 5' del spiegelmer (5'-MMT-aminoheptil spiegelmer), para permitir la conjugación posterior a la síntesis con PEG.

Después de terminar la síntesis el 5'-MMT aminohexil spiegelmer se escindió de la fase sólida por una incubación de 8 horas en disolución de amoníaco al 33% a 65°C y se desprotegió completamente, después se concentró a sequedad, se recogió en 10 mM NaOH y se purificó mediante RP-HPLC. La escisión del grupo protector monometoxitritilo ocurrió con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,4% en 30 min a RT. TFA se eliminó por coevaporación dos veces con etanol y el 5'-aminohexil spiegelmer según la SEQ ID NO: 1 se purificó por precipitación en etanol (rendimiento: 5.000 OD, 7,5 μ moles). El pico del producto se recogió y se desaló mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sephadex G10 o por ultrafiltración (Labscale TFF System, Millipore).

El GnRH spiegelmer modificado 5' amino de dicha manera (5.000 OD, 7,5 μ moles) se preparó en 0,2 M NaHCO₃, pH 8,5/DMF 60:40 (v/v) (125 mL), se calentó a 37°C y se añadió en partes éster activado en polvo de N-hidroxisuccinimido (NHS) de poli (etilen) glicol ramificado de 40.000 Da (2 eq (equivalentes) cada 30 min, en conjunto 12 eq, (6 x 600 mg, 180 μ moles). El progreso de la reacción se monitorizó por electroforesis analítica en gel (8% poliacrilamida, 8,3 M urea). El producto bruto se purificó inicialmente por HPLC de intercambio iónico del PEG en exceso (Fuente Q 30; disolvente A: H₂O, disolvente B: 2 M NaCl; velocidad de caudal 20 mL/min; carga de la columna y elución de PEG libre con 10% B; elución del conjugado PEG-GnRH spiegelmer con 50% B), posteriormente el GnRH spiegelmer PEGilado por RP-HPLC se separó del GnRH spiegelmer no PEGilado (Fuente RPC 15: disolvente A: 100 mM acetato de trietilamonio (TEAA), disolvente B: 100 mM TEAA en H₂O/acetonitrilo 5:95; velocidad de caudal 40 mL/min; carga de la columna con 10% B; gradiente de 10% a 70% B en 10 volúmenes de columna, elución de PEG-GnRH spiegelmer a 45-50% B), se intercambió la sal (Fuente Q 30; disolvente A: H₂O, disolvente B: 2 M NaCl; velocidad de caudal 20 mL/min; carga de la columna y elución de PEG libre con 10% B; elución de PEG-GnRH spiegelmer con 50% B) y posteriormente se desaló por filtración en gel (Sephadex G10; disolvente H₂O; velocidad de caudal 5 mL/min) o ultrafiltración (Labscale TFF System, Millipore). Por liofilización se obtuvo el producto deseado como un polvo blanco (3.900 OD, 375 mg, 78%).

De manera análoga, ácidos nucleicos adicionales incluyendo la secuencia según la SEQ ID NO: 1 se unieron a diferentes PEG (10.000 Dalton lineal, 20.000 Dalton lineal, 20.000 Dalton ramificado, 35.000 Dalton lineal) y se purificaron.

Ejemplo 4

Síntesis de conjugados con FITC de ácidos L-nucleicos: Acoplamiento de isotiocianato de fluoresceína en un GnRH spiegelmer con un conector 5'NH₂-C₆

El GnRH spiegelmer 5' amino modificado obtenido según el ejemplo 3 se preparó en 0,5 M NaHCO₃ pH 8,5, se calentó a 65°C y se añadió un exceso de isotiocianato de fluoresceína (FITC, 10 eq) a la mezcla de reacción. La reacción se monitorizó mediante RP-HPLC analítica. Se agitó durante 48 h a 65°C, se separó el exceso de FITC por Centri-Spin10 (Princeton Separations) y el ácido L-nucleico marcado con fluoresceína se purificó por RP-HPLC. La liofilización dio lugar al producto deseado como un polvo amarillento en rendimiento cuantitativo.

Ejemplo 5

Ensayo de actividad de un spiegelmer de ADN PEGilado que se une a GnRH in vivo en ratas macho orquidectomizadas

Ratas macho se orquidectomizaron, por lo que el nivel de LH de las ratas se incrementó de manera constante durante los ocho días siguientes debido a la ausencia de señal de retroalimentación de la testosterona. En el día 8 el PEG-GnRH spiegelmer de ADN, es decir, el conjugado de PEG y GnRH spiegelmer, se administró intravenosamente a siete ratas (150 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre en el día 0 (antes de la orquidectomía), en el día 8 (0 horas antes de la aplicación i.v. del PEG-GnRH spiegelmer), 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 6 h así como 24 h después de la aplicación i.v. y se determinó el nivel respectivo de LH usando radioinmunoensayo (RIA). En paralelo, se administró sólo el vehículo (tampón PBS, pH 7,4) i.v. como control negativo a siete ratas macho orquidectomizadas y el antagonista estándar Cetorelix (100 μ g/kg) s.c. como control positivo a siete ratas macho orquidectomizadas. El resultado se muestra en la Fig. 25.

Con la excepción del control negativo (en la Fig. 25 representado como triángulos) existe un nivel de LH incluso después de 24 h bajo la influencia de los PEG-GnRH spiegelmer, que es comparable al de las ratas no orquidectomizadas y las ratas, respectivamente, que habían recibido el antagonista estándar Cetorelix. Esto prueba la idoneidad del PEG-GnRH spiegelmer de ADN para influir de manera duradera en el efecto de GnRH durante un periodo de tiempo largo. El hecho de que el efecto del PEG-GnRH spiegelmer de ADN descrito anteriormente es debido a la PEGilación del GnRH spiegelmer resulta del hecho de que después de la aplicación del GnRH spiegelmer sin la modificación correspondiente con aplicación subcutánea de 100 mg/kg pudo observarse una reducción de la actividad del GnRH spiegelmer después de unas pocas horas. El resultado se muestra también en la Fig. 29.

Ejemplo 6

Ensayo de actividad de spiegelmer de ADN PEGilados y no PEGilados que se une a GnRH en células CHO in vitro

El estudio de cultivo celular descrito en la presente memoria se realizó en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresan el receptor humano de GnRH. Aquí, se midió la liberación intracelular de iones Ca^{2+} , ya que esta liberación, importante para la transducción de la señal, ocurre después de la formación del complejo agonista receptor. El nivel de Ca^{2+} se determinó por un marcador fluorescente sensible a Ca^{2+} . El PEG-GnRH spiegelmer de ADN y el GnRH spiegelmer, respectivamente, fue para capturar el agonista GnRH e inhibir así su unión al receptor en la membrana celular. Se hizo experimentalmente de manera que el agonista GnRH (2 nM) se preincubó durante 20 min con el GnRH spiegelmer y el PEG-GnRH spiegelmer de ADN, respectivamente, en un intervalo de concentración de 100 pM hasta 1 μM . Cada una de estas disoluciones se administró a células CHO cargadas con marcador fluorescente y la concentración de Ca^{2+} respectiva se determinó con un Lector de Placas de Imagen Fluorescente (FLIPR). El resultado del PEG-GnRH spiegelmer de ADN (triángulos llenos) y de un antagonista estándar (cuadrados llenos), usado aquí como control positivo, se muestra en la Fig. 26a.

La determinación dependiente de la concentración resultó en una curva de actividad sigmoidal, que indica que el spiegelmer nativo, es decir, el GnRH spiegelmer no modificado (cuadrados llenos), así como el GnRH-spiegelmer de ADN modificado con PEG (triángulos llenos) fueron capaces de inhibir la formación del complejo GnRH receptor un 100%. La CI_{50} fue 20 nM para el GnRH spiegelmer y 30 nM para el PEG-GnRH spiegelmer de ADN (Fig. 26b).

Ejemplo 7

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

Siete ratas macho Wistar (Tierzucht Schönwalde GmbH, Alemania, peso: 250-300 g) se usaron para la determinación de las características farmacocinéticas de la unión a GnRH del spiegelmer de ADN PEGilado. El grupo se trató en paralelo con los grupos para los ensayos de actividad (véase el ejemplo 6), es decir, castrados después de una fase de adaptación y después de otra semana los animales recibieron una única dosis de 800 nmoles/kg de PEG-GnRH spiegelmer de ADN administrado intravenosamente. La sustancia se disolvió en 1xPBS, pH 7,4 (disolución madre: 1 mM).

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

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

Para la extracción en fase sólida, se usaron columnas de intercambio de aniones dimetilaminopropilo (DMA 3 ml/200 mg de material de columna, Macherey y Nagel, Düren) en un aparato de vacío Baker spe-12G (Mallinckrodt Baker, Griesheim). Los tampones usados consistieron en: tampón A (50 mM NaH_2PO_4 , pH 5,5; 0,2 M NaClO_4 ; formamida al 20% (v/v) y acetonitrilo al 5% (v/v) y tampón B (80 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0; 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaClO_4 ; formamida al 20% (v/v) y acetonitrilo al 5% (v/v), en el que los dos tampones A y B se mezclaron en una proporción específica para la preparación del tampón de lavado y de elución, de manera que se consiguieron las concentraciones de sal deseadas. Los intercambiadores aniónicos se lavaron con 2 ml de tampón A. Las muestras se añadieron aplicando -100 mbares y se lavaron con 2 ml de tampón A así como 2 ml de tampón de lavado (0,4 M NaClO_4). Después de secar el material de la columna durante 5 min aplicando -200 mbares, el spiegelmer de ADN PEGilado que se une a GnRH se eluyó con 3 x 0,5 ml de tampón de elución (0,9 M NaClO_4), en el que el tampón se calentó a 70°C antes de la elución. Los eluatos se almacenaron a 4°C hasta la filtración en gel.

Como estándar interno se había añadido un spiegelmer de ADN 30 mer a las muestras antes de la extracción, que se unió a una molécula de polietilenglicol (PEG) de 40 kDa en el extremo 5'. El estándar interno se llevó con tampón hasta un volumen de 360 μl a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se añadieron 10 μl de cada uno a cada muestra.

Para desalar las muestras antes del análisis por HPLC, se usaron columnas NAP-25 (Amersham Pharmacia Biotech). Los eluatos obtenidos se secaron en vacío y se disolvieron en 100 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.

La identificación y cuantificación del spiegelmer PEGilado se hizo mediante cromatografía de intercambio aniónico usando un sistema de HPLC Waters Alliance 2695 y detección a 254 nm. Las condiciones fueron como sigue:

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

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

ES 2 346 640 T4

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

eluyente B: 375 mM NaCl₄ en eluyente A

temperatura: 25°C

volumen de inyección: 20 µl

gradiente y velocidades de caudal: 0-1 min 10% eluyente B con 0,5 ml/min; 1-2 min 10% eluyente B con 2 ml/min; 2-3 min 30% eluyente B con 2 ml/min; 3-13 min 60% eluyente B con 2 ml/min; 13-19 min 10% eluyente B con 2 ml/min.

La concentración de spiegelmer de ADN PEGilado que se une a GnRH en los diferentes puntos de tiempo de muestreo se muestra en la Fig. 27. El tiempo medio del spiegelmer de ADN PEGilado que se une a GnRH después de inyección intravenosa es aproximadamente 4 horas en ratas.

Ejemplo 8

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

secuencias nucleotídicas:

L-ARN, 40 mer (NOX_M039)

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

40 kDalton PEG-L-ARN, 40 mer (NOX_M041)

PEG 5' uaa gga aac ugc 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 el L-ARN PEGilado (NOX_M041) se examinó en ratas macho (CD®, Charles River Alemania GmbH; peso 280-318 g). Después de un periodo de acondicionamiento de 7 días, 3 animales por sustancia recibieron una dosis única de 150 nmoles/kg aplicada intravenosamente. 4 ratas cada una por sustancia recibieron cada una 150 nmoles/kg como dosis subcutánea única. Las sustancias se disolvieron en 1 x PBS pH 7,4 (disolución madre: 383 µM). Después de la aplicación intravenosa, se tomaron muestras de sangre para el L-ARN no modificado antes de la aplicación de la sustancia (0 min) y 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h después de la aplicación de la sustancia y se transfirieron a tubos Eppendorf con EDTA para el análisis. Después de la aplicación intravenosa, se tomaron muestras de sangre para el L-ARN PEGilado antes de la aplicación de la 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 aplicación de la sustancia y se transfirieron a tubos Eppendorf con EDTA para el análisis. En los animales tratados subcutáneamente, se tomaron muestras de sangre para el L-ARN no modificado antes de la aplicación de la sustancia (0 min) y 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h después de la aplicación de la sustancia y se transfirieron a tubos Eppendorf con EDTA para el análisis. En los animales tratados subcutáneamente, se tomaron muestras de sangre para el L-ARN PEGilado antes de la aplicación de la sustancia (0 min) y 1 h, 3 h, 8 h, 16 h, 24 h, 36 h y 48 h después de la aplicación de la sustancia y se transfirieron a tubos Eppendorf con EDTA para el análisis.

La cantidad de L-ARN y L-ARN PEGilado en las muestras de sangre, respectivamente, 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 principio siguiente: la molécula de L-ARN que se quiere detectar se hibrida con una sonda oligonucleotídica 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 biotinilada (= sonda detectora; aquí: 5'-(BB) TTT TTT TT A GCT CTG CAC AGC GCT-3' (SEQ ID NO: 7)). Para esto, se une un conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina al complejo en una etapa adicional. Después de la adición de un sustrato quimioluminiscente, se genera luz y se mide en un luminómetro.

Inmovilización de la sonda oligonucleotídica: 100 µl de la sonda de captura (0,75 pmoles/µl en tampón de acoplamiento: 50 mM Na₂HPO₄ pH 8,5, 0,5 mM EDTA) por pocillo (cubeta o cavidad en una placa) se transfirieron a placas DNA BIND (COSTAR) y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó con 3 x 200 µl de tampón de acoplamiento cada una y se incubaron durante 1 h a 37°C con 200 µl de tampón de bloqueo (BSA al 0,5% (p/v) en tampón de acoplamiento) cada una. Después de un nuevo lavado 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)) las placas pueden usarse para la detección.

Hibridación y detección: se preparó una disolución de 20 pmoles/µl de la sonda L-ADN de detección (= sonda detectora) en 10 mM Tris-HCl pH 8,0. Se mezclaron 10 µl de plasma con EDTA (o ddH₂O) con 90 µl de tampón de hibridación 1 (0,5 x SSC pH 7,0, SDS al 0,5% (p/v)). Posteriormente, se añadieron 2 µl de la disolución de la

sonda detectora (20 pmoles/ μ l), se mezclaron y se centrifugaron. Después se realizó una etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 min en el Termociclador (MJ Research). Los lotes se transfirieron a pocillos DNA-BIND preparados adecuadamente (véase anteriormente) y se incubaron durante 2 h a 50°C. Después de eso, se realizaron etapas de lavado: 2 x 200 μ l tampón de hibridación 1 (0,5 x SSC pH 7,0, SDS al 0,5% (p/v) y 3 x 200 μ l 1 x TBS/Tween 20 (20 mM Tris-Cl pH 7,6, 137 mM NaCl, Tween 20 al 0,1% (v/v)). Se diluyó 1 μ l de conjugado estreptavidina fosfatasa alcalina (Promega) con 5 ml 1 x TBS/Tween 20. Se añadieron 100 μ l del conjugado diluido por pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se realizaron las etapas de lavado siguientes: 1 x 200 μ l 1 x TBS/Tween 20 y 3 x 200 μ l 1 x tampón de ensayo (20 mM Tris-Cl pH 9,8, 1 mM $MgCl_2$). Finalmente, se añadieron 100 μ l CSPD “Sustrato Listo Para Usarse” (Applied Biosystems), se incubó 30 min a temperatura ambiente y se midió la quimioluminiscencia en un lector de placas multidetección POLARstar Galaxy (BMG Labtechnologies).

Las curvas de concentración-tiempo del L-ARN PEGilado después de la aplicación intravenosa y subcutánea se muestran en la Fig. 28a y Fig. 28c. Los perfiles de concentración del L-ARN no modificado después de la aplicación intravenosa y subcutánea se muestran en la Fig. 28b y Fig. 28d. Después de la aplicación intravenosa, el tiempo medio terminal es 50 minutos para el L-ARN no modificado. Para la sustancia PEGilada, por el contrario, resulta un tiempo medio de aproximadamente 18 horas. Después de la aplicación subcutánea, el tiempo medio terminal es 84 minutos para el L-ARN no modificado, para la sustancia PEGilada, por el contrario, resulta una fase de eliminación muy larga.

Así, se muestra, que el ácido L-nucleico modificado según la invención es ventajoso en comparación con el ácido L-nucleico no modificado. Esta ventaja surge también con vista al estado de la técnica, descrito por ejemplo 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. El tiempo medio farmacocinético del aptámero 2'-F PEGilado (40 kDa PEG) administrado intravenosamente *in vivo* a ratas Sprague-Dawley es 228 min y es así claramente inferior al de los ácidos L-nucleicos modificados según la invención.

25

Ejemplo 9

Método general para la PEGilación de ácidos L-ribonucleicos

Se generó un ácido L-ribonucleico para el examen del perfil farmacológico de L-ARN no modificado y PEGilado en ratas. El L-ARN tiene la secuencia siguiente:

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

35

La síntesis del L-ARN con la secuencia mostrada anteriormente se realizó en un Sintetizador ÄKTA Pilot 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) en una escala de 20 μ M en una fase sólida CPG 1.000 Å según la química de 2-cianoetil fosforamidita. Posteriormente, se acopló 6-(monometoxitritilamino)-hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita al extremo 5' del L-ARN (5'-MMT-aminohehexil-L-ARN) para permitir la conjugación después de la síntesis con PEG.

Después de terminar la síntesis, El 5'-MMT-aminohehexil-L-ARN se escindió de la fase sólida por una incubación de 30 min en disolución de metilamina al 41% a 65°C y las nucleobases se desprotegeron completamente. La desprotección de la posición 2' se hizo por incubación en 1,5 ml DMSO, 0,75 ml trietilamina (TEA) y 1 ml TEA 3HF durante 2 h a 60°C. Se hizo una primera purificación mediante RP-HPLC. La escisión del grupo protector monometoxitritilo se realizó con ácido acético al 80% en 70 min a RT. El ácido acético se eliminó por coevaporación dos veces con etanol y el 5'-aminohehexil-L-ARN según la SEQ ID NO: 4 se purificó por precipitación en etanol (rendimiento: 220 OD, 60% puro). El producto se recogió en 1 M acetato de sodio, pH 8,0 y se desaló mediante cromatografía de exclusión por tamaño con una columna Sephadex G10 o con Vivaspin 3000 (Vivascience, Hannover, Alemania).

50

El L-ARN 5'-amino modificado de dicha manera (530 OD, 60% puro) se preparó en tampón acuoso universal según Theorell y Stenhagen (33 mM citrato de sodio, 33 mM fosfato de sodio, 57 mM borato de sodio, pH 7,5) (7,5 ml), se calentó a 37°C, se añadió DMF (5 ml) y se añadió en partes polvo de éster activado de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) de poli (etilen) glicol ramificado de 40.000 Da (2 eq cada 45 min, en total 18 eq). El progreso de la reacción se monitorizó por electroforesis en gel analítica (8% poli(acrilamida), 8,3 M urea) o HPLC analítica de intercambio iónico. El producto bruto se purificó inicialmente por HPLC analítica de intercambio iónico del PEG en exceso (Fuente Q; disolvente A: 10 mM hidrógenocarbonato de sodio, pH 7,5, disolvente B: 10 mM hidrógenocarbonato de sodio, pH 7,5, 2 M cloruro de sodio, carga de la columna y elución de PEG libre con 5% B; velocidad de caudal 20 ml/min; separación y elución del conjugado PEG-L-ARN del L-ARN que no ha reaccionado con un gradiente hasta 35% B durante 20 volúmenes de columna; velocidad de caudal 50 ml/min), posteriormente se desala por ultrafiltración (Labscale TFF System, Millipore). Por liofilización, se obtuvo el producto deseado como un polvo blanco (254 OD, 48% (80% respecto a la pureza del producto de partida)).

De manera análoga, ácidos L-nucleicos adicionales incluyendo la secuencia según la SEQ ID NO: 1 se unieron con diferentes PEG (10.000 Dalton lineal, 20.000 Dalton lineal, 20.000 Dalton ramificado, 35.000 Dalton lineal) y se purificaron.

65

Ejemplo 10

Ensayo de actividad de un spiegelmer de ADN que se une a GnRH in vivo en ratas macho orquidectomizadas

Se orquidectomizaron ratas macho, por lo que el nivel de LH de las ratas se incrementó de manera constante durante los ocho días siguientes debido a la ausencia de señal de retroalimentación de la testosterona. En el día 8 el PEG-GnRH spiegelmer de ADN (NOX 1255) se administró subcutáneamente a cinco ratas (100 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre en el día 0 (antes de la orquidectomía), en el día 8 (0 horas antes de la aplicación s.c. del GnRH spiegelmer), así como 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 6 h 24 h después de la aplicación s.c. y se determinó el nivel respectivo de LH usando radioinmunoensayo (RIA). En paralelo, se administró sólo el vehículo (tampón PBS, pH 7,4) s.c. como control negativo a cinco ratas macho orquidectomizadas y el antagonista estándar Cetorelix (100 µg/kg) s.c. como control positivo a cinco ratas macho orquidectomizadas. El resultado se muestra en la Fig. 29.

Los niveles de LH disminuyeron en el grupo GnRH spiegelmer de ADN (en la Fig. 29 representado como círculos) y alcanzaron su punto más bajo después de 1,5 h, y se mantuvieron durante aproximadamente 3 h. Esta reducción es comparable con ratas no orquidectomizadas y las ratas, respectivamente, tratadas con Cetorelix (antagonista estándar). Seis horas después de la dosis de GnRH spiegelmer de ADN los niveles de LH se incrementaron lentamente y alcanzaron el nivel del grupo control no tratado en 24 h.

Así, el efecto biológico del GnRH spiegelmer de ADN es observable durante un periodo de 3 horas, mientras que el GnRH spiegelmer de ADN PEGilado es activo durante un periodo de 24 horas (véase el ejemplo 5).

Las referencias proporcionadas en lo que sigue corresponden a las citas, proporcionadas con números en superíndice, proporcionadas en la presente memoria.

Bibliografía

1. **Bragg, P. D. & 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. & Fairbanks, G.** Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S] dithio bis(succinimidyl propionate). *J Mol Biol* **104**, 243-261 (1976).

3. **Buter, J. & Kellogg, R. M.** Synthesis of macrocyclic and medium ring dithio compounds using cesium thiolates. *J Chem. Soc. Chem. Commun.*, 466-468 (1980).

4. **Buter, J. & Kellogg, R. M.** Synthesis of sulfur-containing macrocycles using cesium thiolates. *J Org. Chem.* **46**, 4481-4485 (1981).

5. **Kennedy, R. J. & Stock, A. M.** The oxidation of organic substances by potassium peroxymonosulfates. *J Org. Chem.* **25**, 1901-1906 (1960).

6. **Huang, Z., Schneider, K. C. & 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. & Rider, P.** Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphydryl group and subsequent attachment of thiol specific probes. *Nucleic Acids Res* **13**, 4485-4502 (1985).

8. **Smyth, D. G., Blumenfeld, O.O. & Konigsberg, W.** Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem J*, **91**, 589-595 (1964).

9. **Heitz, J. R., Anderson, C. D. & Anderson, B. M.** Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides. *Arch Biochem Biophys* **127**, 627-636 (1968).

10. **Podhradsky, D., Drobnica, L. & Kristian, P.** Reactions of cystine, its derivatives, glutathione coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates. *Experientia* **35**, 154-155 (1979).

11. **Vishnyakova, Golubeva & Glebova.** *Russ. Chem. Rev.* **54**, 249-261 (1985).

12. **Hazzard, Lammiman, Poon, Satchell & 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. & Richert, C.** Monitored selection of dna-hybrids forming duplexes with capped terminal c:g base pairs. *J Comb Chem* **3**, 374-386 (2001).

15. **Bischoff, R., Coull, J. M. & 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. & Musso, G. F.** Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. *Nucleic Acids Res* **15**, 5353-5372 (1987).
17. **Allen, D. J., Darke, P. L. & Benkovic, S. J.** Fluorescent oligonucleotides and deoxynucleotide triphosphates: preparation and their interaction with the large (Klenow) fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase 1. *Biochemistry* **28**, 4601-4607 (1989).
18. **Pitha, J., Kocielek, K. & Caron, M. G.** Detergents linked to polysaccharides: preparation and effects on membranes and cells. *Eur J Biochem* **94**, 11-18 (1979).
19. **Elling, L. & 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, New York, 1974).
21. **Zuckermann, R., Corey, D. & Schutz, P.** Efficient methods for attachment of thiol specific probes to the 3'-ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res* **15**, 5305-5321 (1987).
22. **Teare J. & Wollenzien, P.** Specificity of site directed psoralen addition to RNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 3359-3372 (1989).
23. **Ghosh, S. S., Kao, P. M. & Kwoh, 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).
24. **Ivanovskaya, M. G., Gottikh, M. B. & Shabarova, Z. A.** Modifikation of oligo(poly)nucleotide phosphomonoester groups in aqueous solution. *Nucleosides Nucleotides* **6**, 913-934 (1987).
25. **Ralph, R. K., Young, R. J. & 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).
26. **Chu, B. C., Wahl, G. M. & 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).

Las características de la invención descritas en la descripción anterior, las reivindicaciones así como las figuras pueden ser esenciales individualmente así como en cualquier combinación para la comprensión de la invención en sus diferentes realizaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido L-nucleico modificado, que comprende un resto de ácido L-nucleico y un resto diferente de ácido L-nucleico, en el que el resto de ácido L-nucleico está conjugado con el resto diferente de ácido L-nucleico, y la conjugación del resto de ácido L-nucleico con el resto diferente de ácido L-nucleico da lugar a una excreción retardada de un organismo comparada con un ácido L-nucleico que comprende sólo el resto de ácido L-nucleico, en el que dicho resto de ácido L-nucleico es un spiegelmer y el resto diferente de ácido L-nucleico se selecciona del grupo que consiste en poli(etilen)glicol lineal, poli(etilen)glicol ramificado, hidroxietil almidón, péptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, polioxipropileno, polioxiamidato, poli(2-hidroxietil)-L-glutamina y polietilen glicol preciso.
2. Un ácido L-nucleico modificado, que comprende un resto de ácido L-nucleico y un resto diferente de ácido L-nucleico, en el que el resto de ácido L-nucleico está conjugado con el resto diferente de ácido L-nucleico, y la conjugación del resto de ácido L-nucleico con el resto diferente de ácido L-nucleico da lugar a un tiempo de retención incrementado en un organismo comparado con un ácido L-nucleico que comprende sólo el resto de ácido L-nucleico, y en el que dicho resto de ácido L-nucleico es un spiegelmer y el resto diferente de ácido L-nucleico se selecciona del grupo que consiste en poli(etilen)glicol lineal, poli(etilen)glicol ramificado, hidroxietil almidón, péptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, polioxipropileno, polioxiamidato, poli(2-hidroxietil)-L-glutamina y polietilen glicol preciso.
3. Un ácido L-nucleico modificado, particularmente de la reivindicación 1 y/o la reivindicación 2, que comprende un resto de ácido L-nucleico y un resto diferente de ácido L-nucleico, en el que el resto de ácido L-nucleico está conjugado con el resto diferente de ácido L-nucleico, y el resto diferente de ácido L-nucleico tiene un peso molecular de más de 300 Da, preferiblemente más de 20.000 Da, y más preferiblemente más de 40.000 Da.
4. El ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el ácido L-nucleico modificado tiene un peso molecular de 600 a 500.000 Da, preferiblemente de 10.000 a 400.000 Da, más preferiblemente de 50.000 a 300.000 Da.
5. El ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el resto de ácido L-nucleico tiene un peso molecular de 300 a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 25.000 Da, más preferiblemente de 7.000 a 15.000 Da.
6. El ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el resto diferente de ácido L-nucleico está unido directamente o indirectamente al resto de ácido L-nucleico a través de un grupo funcional del resto de ácido L-nucleico, que está presente en o unido a uno de los componentes siguientes del ácido L-nucleico, en el que el grupo funcional se selecciona del grupo que comprende 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.
7. El ácido L-nucleico modificado de la reivindicación 6, **caracterizado** porque la unión del resto diferente de ácido L-nucleico con el resto de ácido L-nucleico ocurre a través del grupo 2'-OH, 3'-OH y/o 5'-OH o un derivado de estos, o uno o más de los restos de azúcar del resto de ácido L-nucleico.
8. El ácido L-nucleico modificado de la reivindicación 6 ó 7, **caracterizado** porque la unión ocurre a través de al menos una de las posiciones 5 ó 6 de la base de pirimidina.
9. El ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado** porque la unión ocurre a través de al menos una de las bases de purina, en el que la unión ocurre preferiblemente en la posición 8.
10. El ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado** porque la unión ocurre en uno o más de los grupos amino exocíclicos y/o endocíclicos y/o grupos ceto de las bases de purina y/o pirimidina y/o posición o posiciones abásicas.
11. El ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque se dispone un conector entre el resto de ácido L-nucleico y el resto diferente de ácido L-nucleico.
12. El ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque el resto de ácido L-nucleico comprende un ácido nucleico según la SEQ ID NO: 1.
13. El ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque el resto de ácido L-nucleico tiene un 6-aminohexilfosfato en el extremo 5'-OH como un conector.
14. El ácido L-nucleico modificado de la reivindicación 13, **caracterizado** porque se acopla polietilen glicol al amino libre del conector aminohexilfosfato.
15. Uso del ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la fabricación de un medio de diagnóstico.

ES 2 346 640 T4

16. Uso del ácido L-nucleico modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la preparación de un medicamento.

17. Un método para la preparación de un ácido L-nucleico modificado que comprende un resto de ácido L-nucleico y un resto diferente de ácido L-nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** por las etapas siguientes:

a) proporcionar un ácido L-nucleico, que forma el resto de ácido L-nucleico o una parte de éste, del ácido L-nucleico modificado;

b) proporcionar uno diferente de ácido L-nucleico, que forma el resto diferente de ácido L-nucleico o una parte de éste, del ácido L-nucleico modificado;

c) hacer reaccionar el ácido L-nucleico de a) y el diferente de ácido L-nucleico de b); y

d) opcionalmente aislar el ácido L-nucleico modificado obtenido en la etapa c), en el que el resto de ácido L-nucleico es un Spiegelmer.

18. El método de la reivindicación 17, **caracterizado** porque el ácido L-nucleico de la etapa a) comprende un conector.

19. El método de la reivindicación 17, **caracterizado** porque después de proporcionar el ácido L-nucleico en la etapa a) se proporciona con un conector.

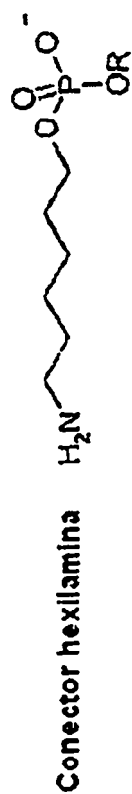
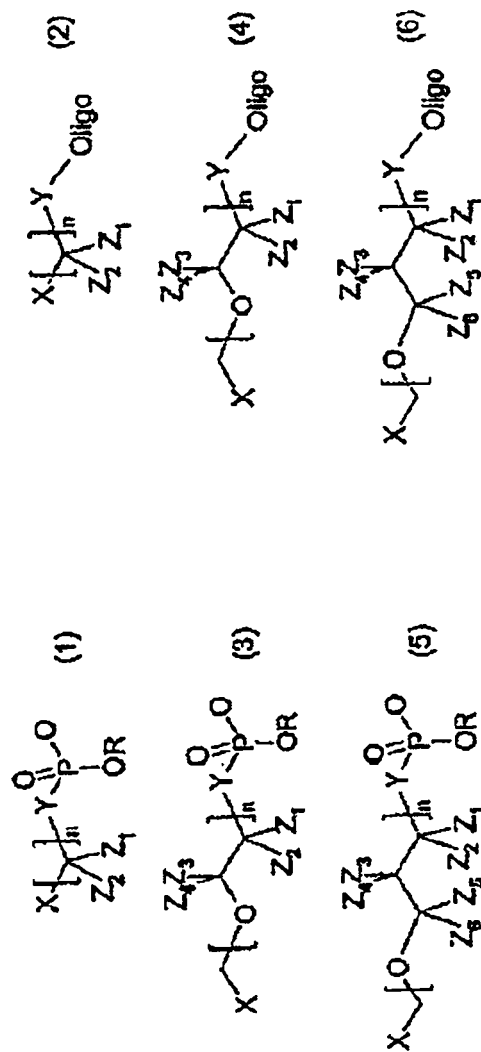


Fig. 1

Conectores adicionales



X = HO, H₂N, HS, Hal, CHO, COOH

Y = O, NH, NMe, S, CH₂

Z₁₋₂₀ = H, Me, Alkyl, HO(CH₂)_n, HO, H₂N(CH₂)_n, H₂N, F
n = 1-20

Fig. 2

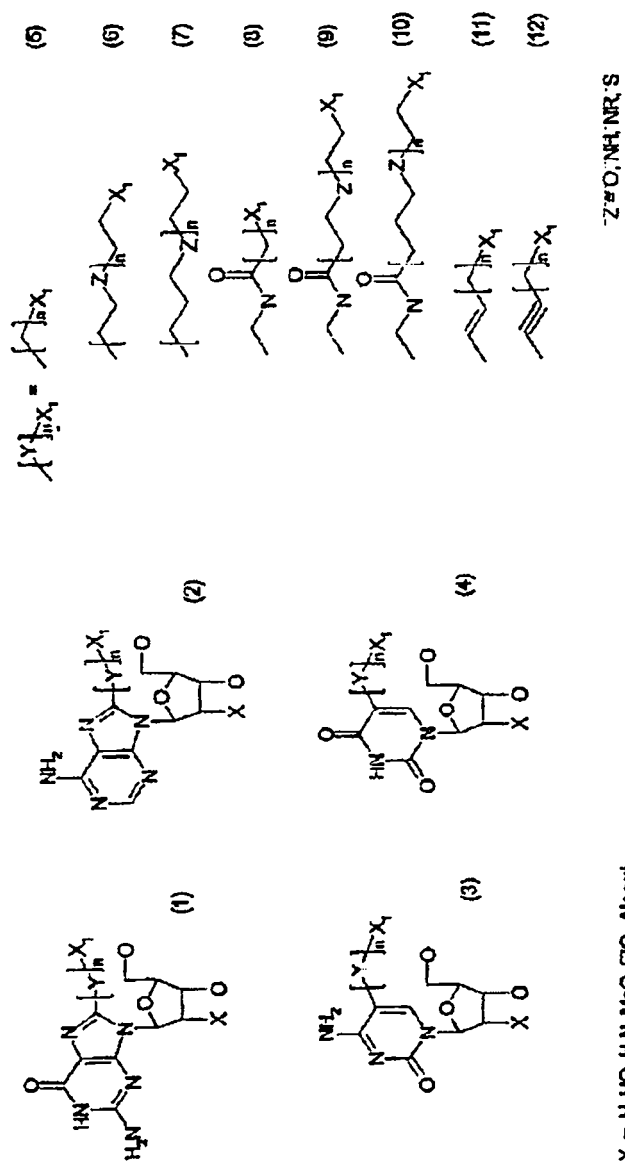
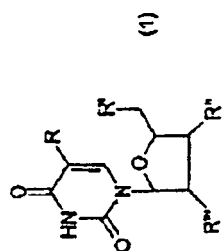


Fig. 3

Posibles conectores en la posición 5 de las pirimidinas



R' = oligo, OH, fosfato

R'' = oligo, OH, fosfato

R''' = H, OH, OMe, OEI, NH₂

X = HO, J, N, EBN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR, COHal

n = 1-20

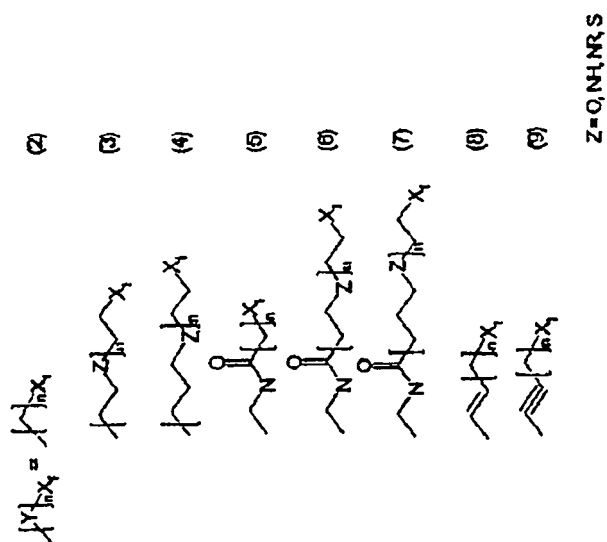
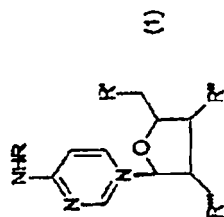


Fig. 4

Posibles conectores en el amino exocíclico de citosina



R' = oligo, OH, fosfato
 R'' = oligo, OH, fosfato
 R''' = H, OH, OMe, OEt, NH₂
 X = HO, H₂N, H₂N, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR, CONH₂
 n = 1-20

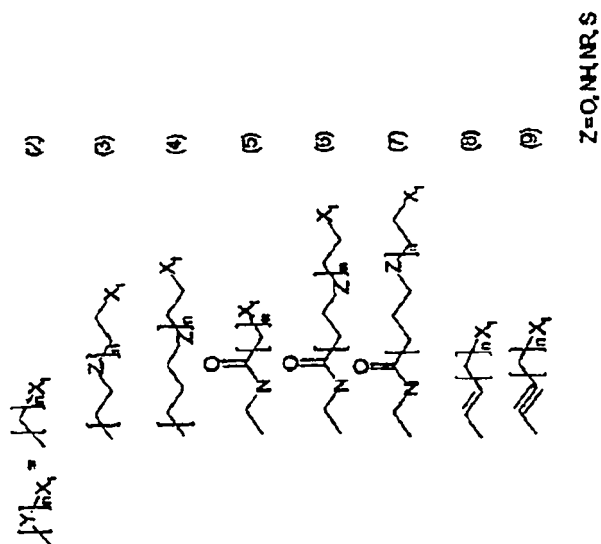


Fig. 5

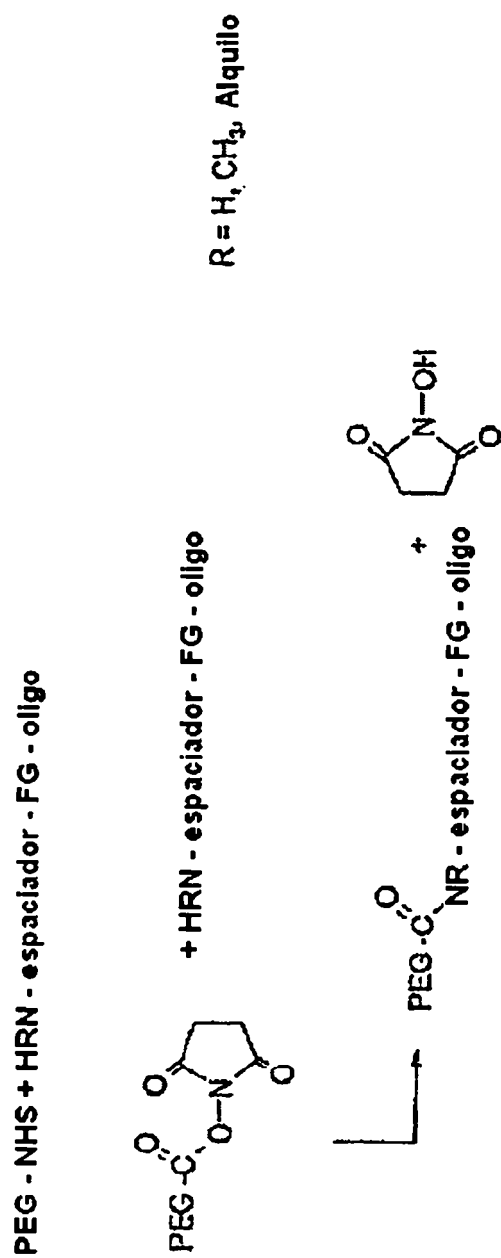
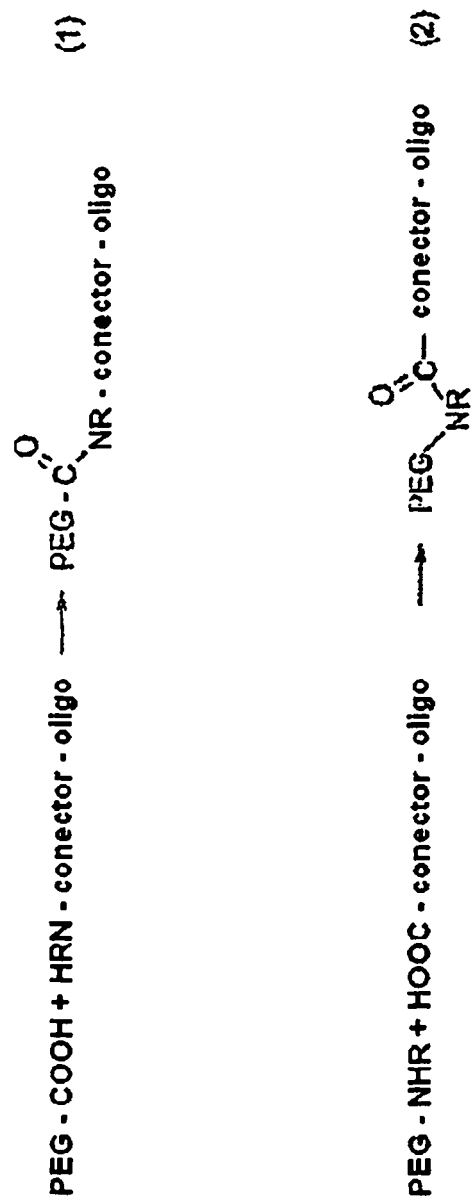
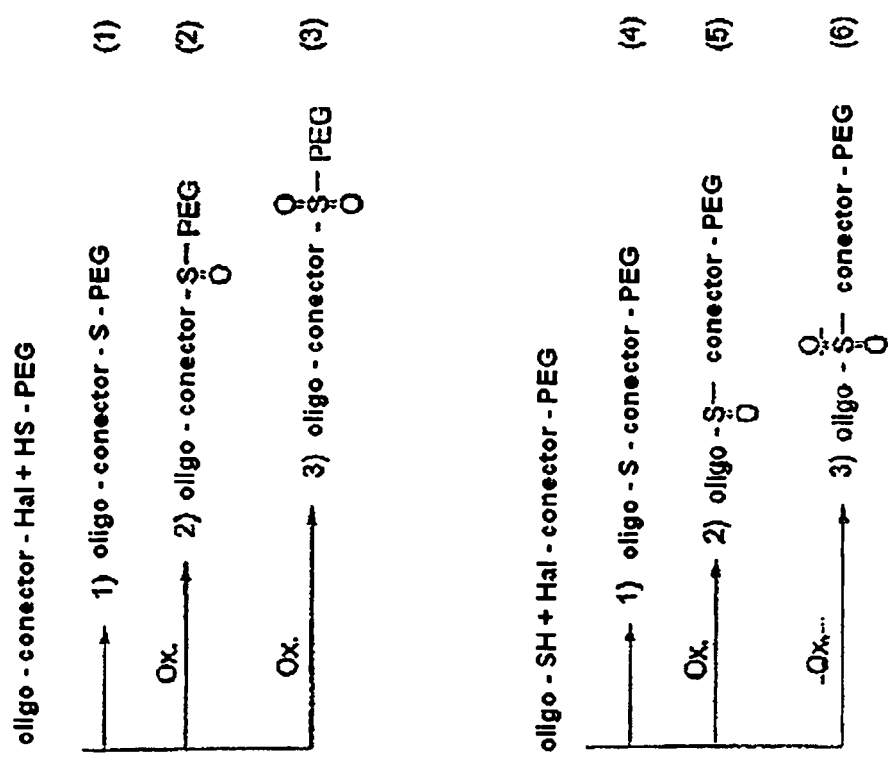


Fig. 6



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 7



Hal: I, Br, Cl

Fig. 8

Maleimida + sulfuro

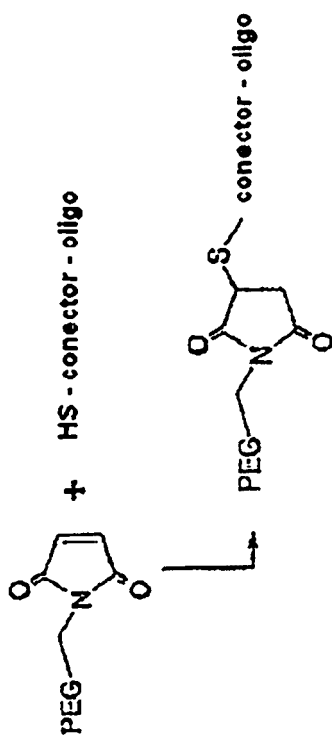


Fig. 9

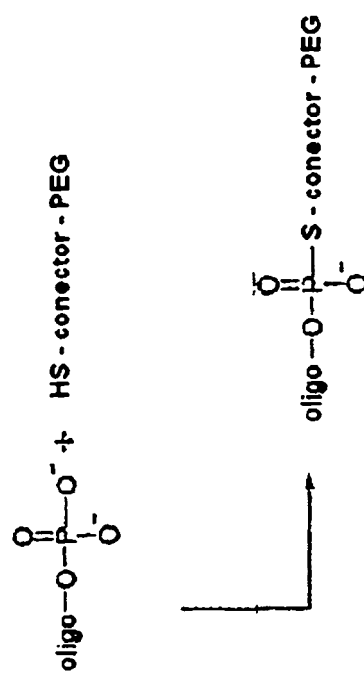


Fig. 10

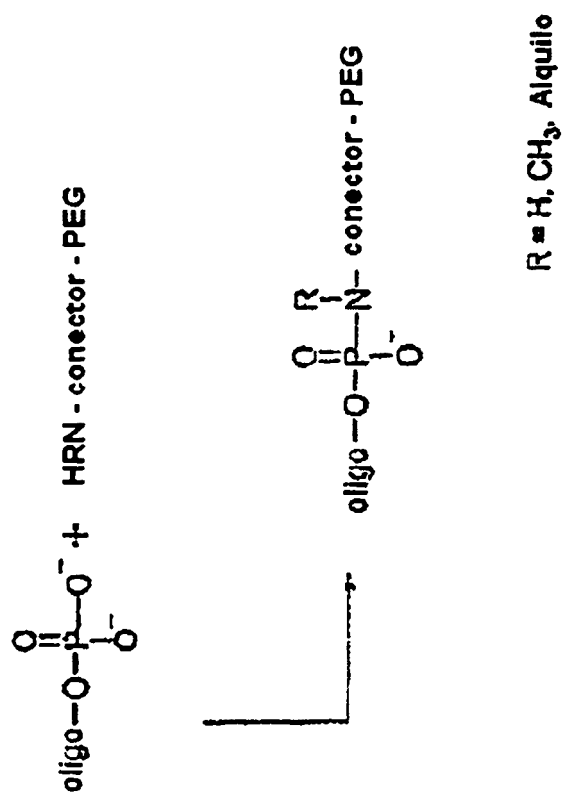


Fig. 11

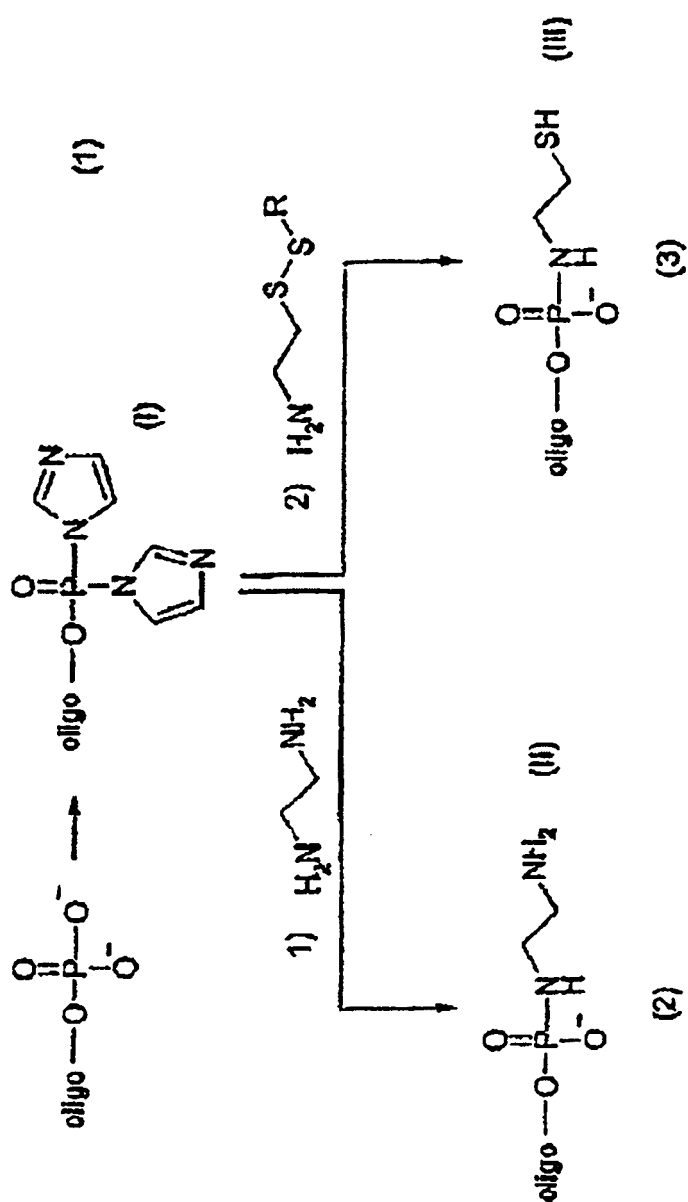
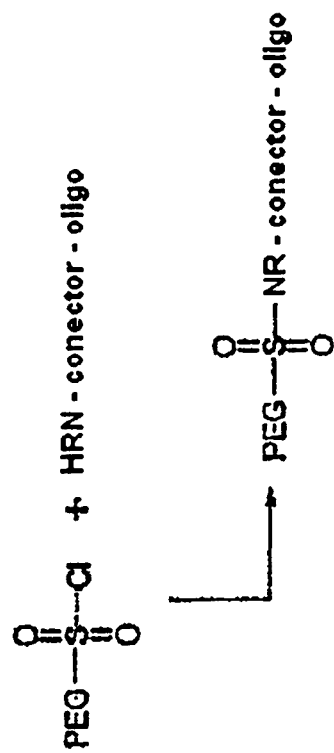


Fig. 12

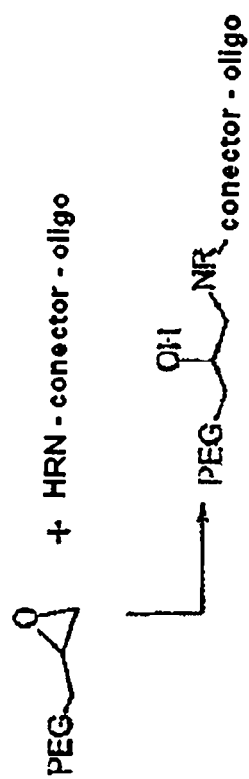
Cloruro de sulfonilo + amina



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 13

Epóxido + amina



$\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{Alquilo}$

Fig. 14

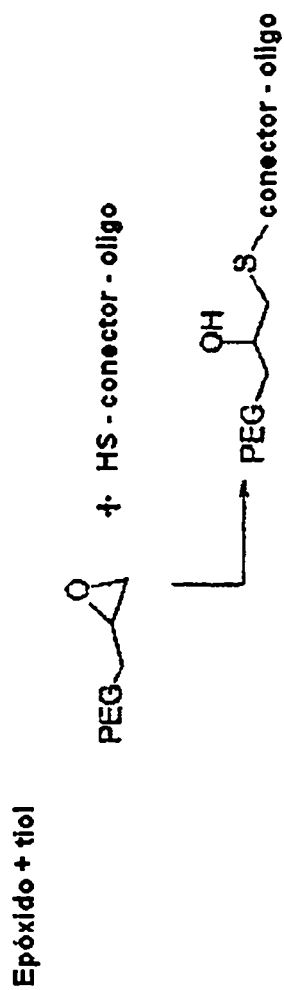
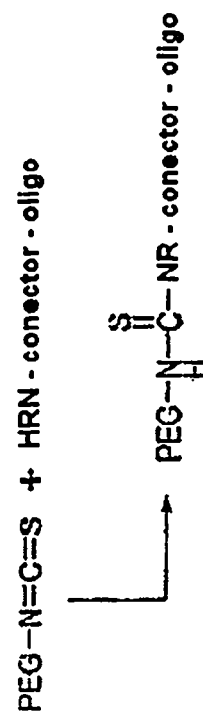


Fig. 15

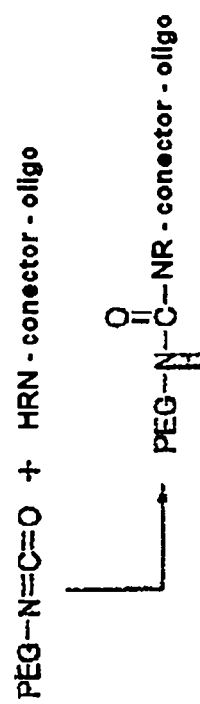
Isotiocianato + amina



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 16

Isocianato + amina



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 17

Isocianato + alcohol

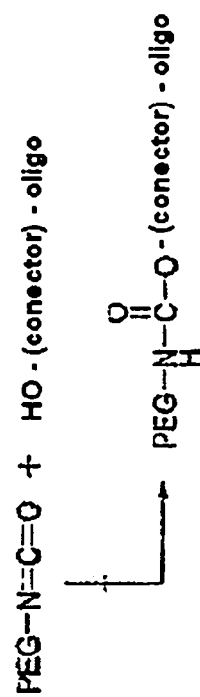


Fig. 18

Aminación reductora

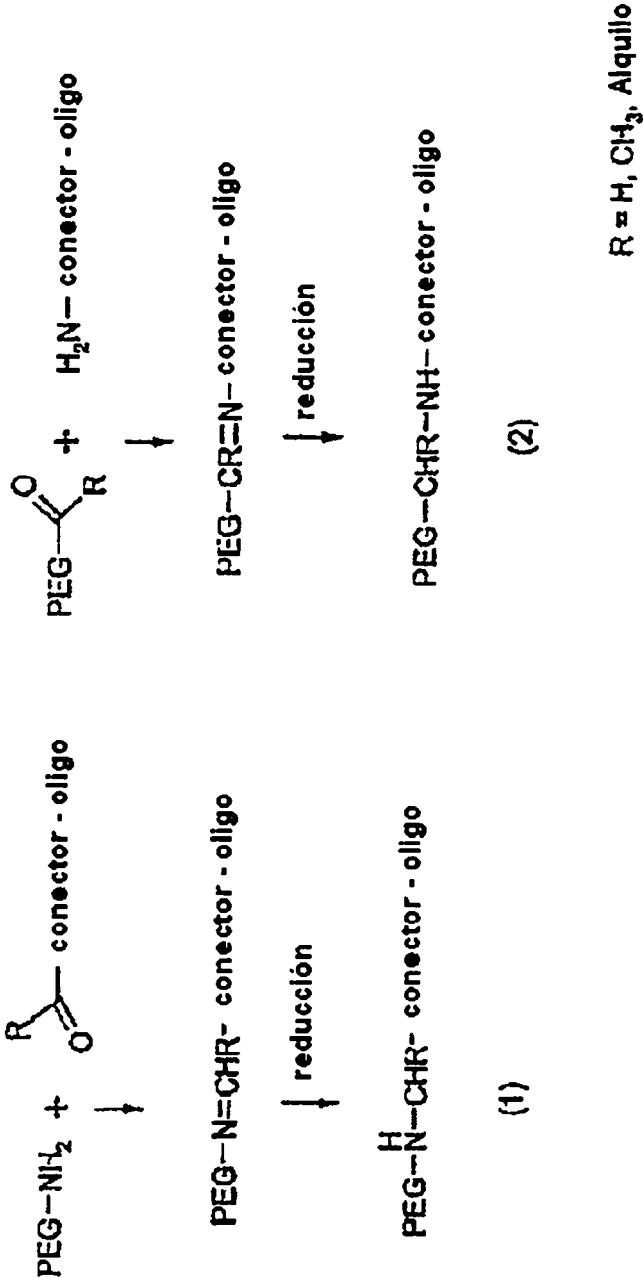


Fig. 19

Disulfuro

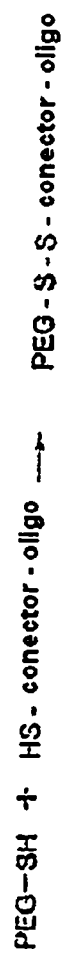
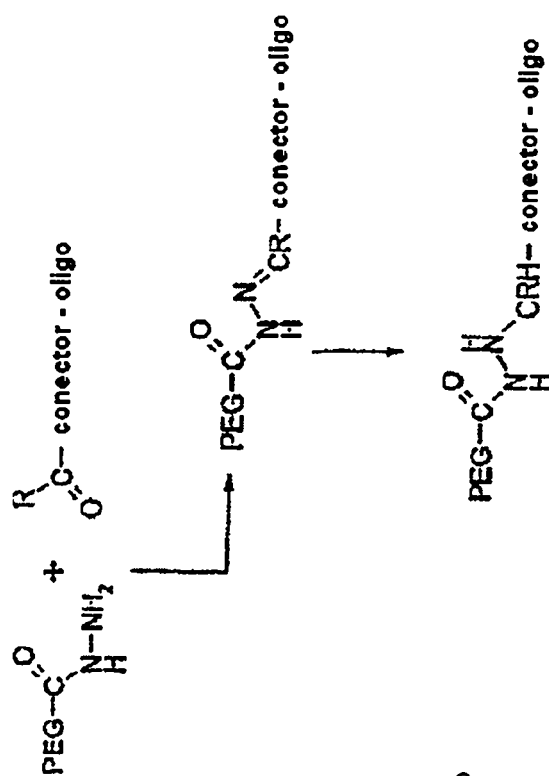


Fig. 20

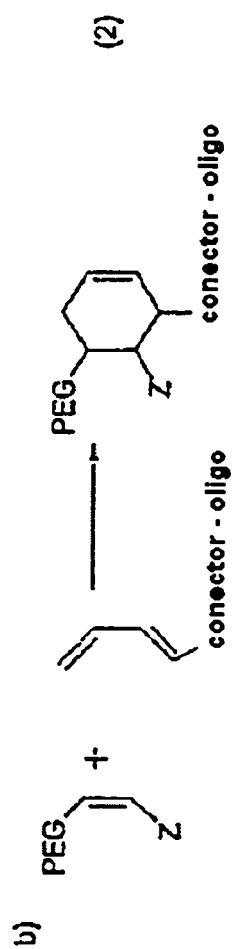
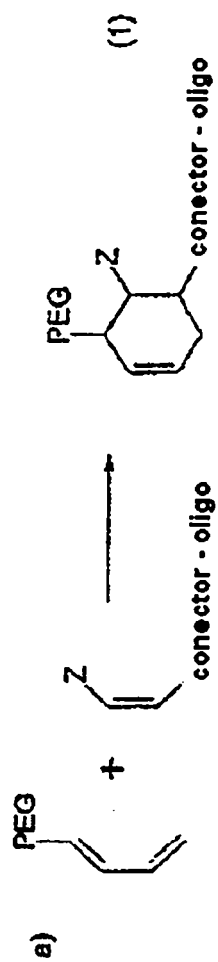
Hidrazina



R = H, CH₃, Alquilo

Fig. 21

Reacción de Diels-Alder



Z = grupo liberador de electrones, tal como p. ej.
 NO_2 , CH_2Cl , COOR , CN , y más
 - o maleimida

Fig. 22

Estructura de metoxi polietilen glicol lineal y ramificado

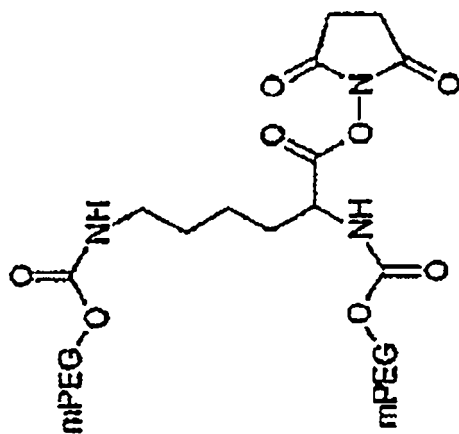
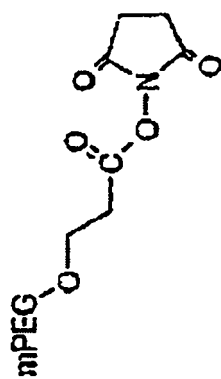
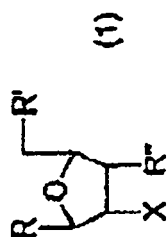


Fig. 23



L-nucleósido abásico



$R' = \text{HO, fosfato, oligo}$
 $R'' = \text{HO, fosfato, oligo}$
 $X = \text{H, OH, OMe, OEt, NH}_2$
 $X_1 = \text{HO, H}_2\text{N, HRN, HS, SSR, Hal, CHO, COOH, COOR, COHal}$
 $Z = \text{CH}_2, \text{O, NH, NAlquilo, S}$
 $n = 1-20$

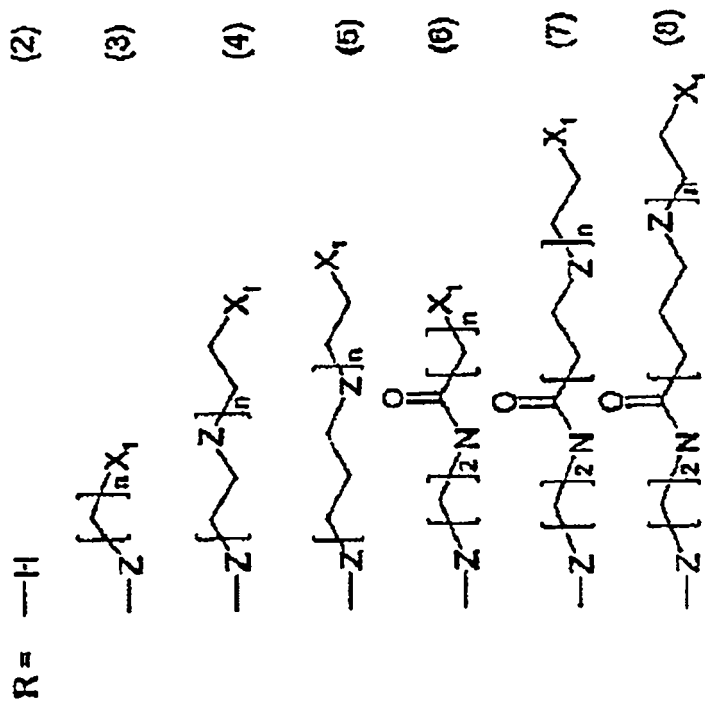


Fig. 24

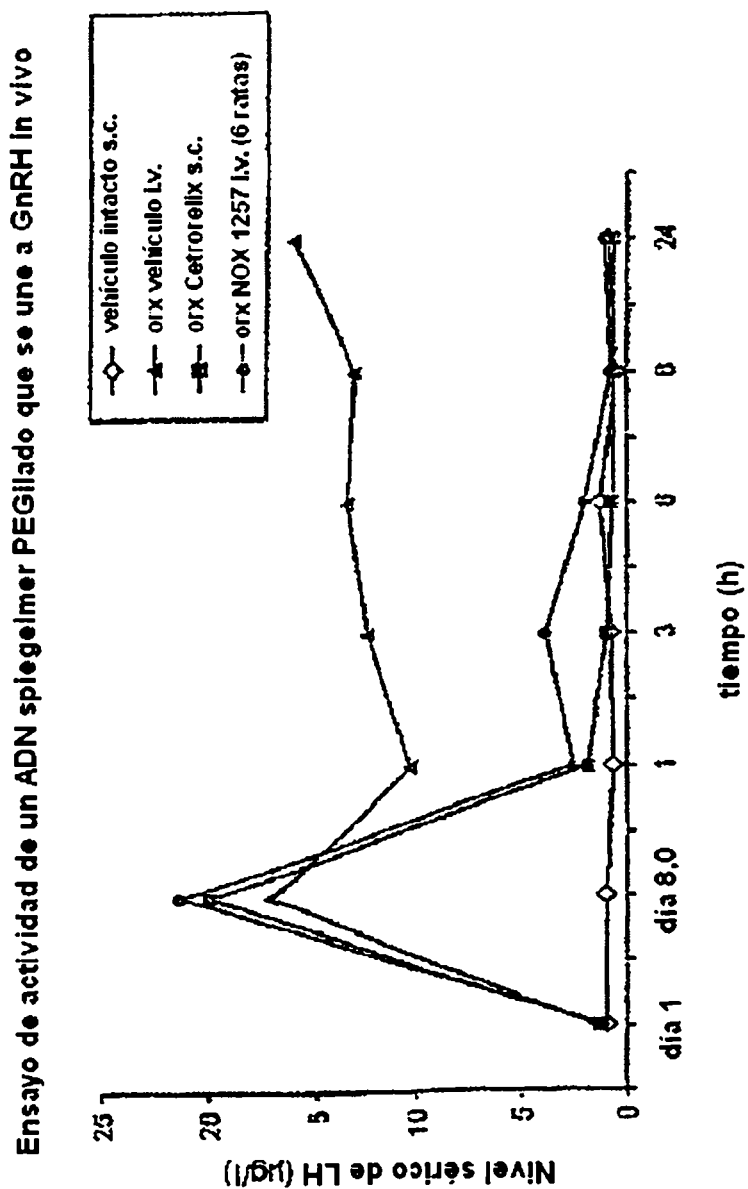


Fig. 25

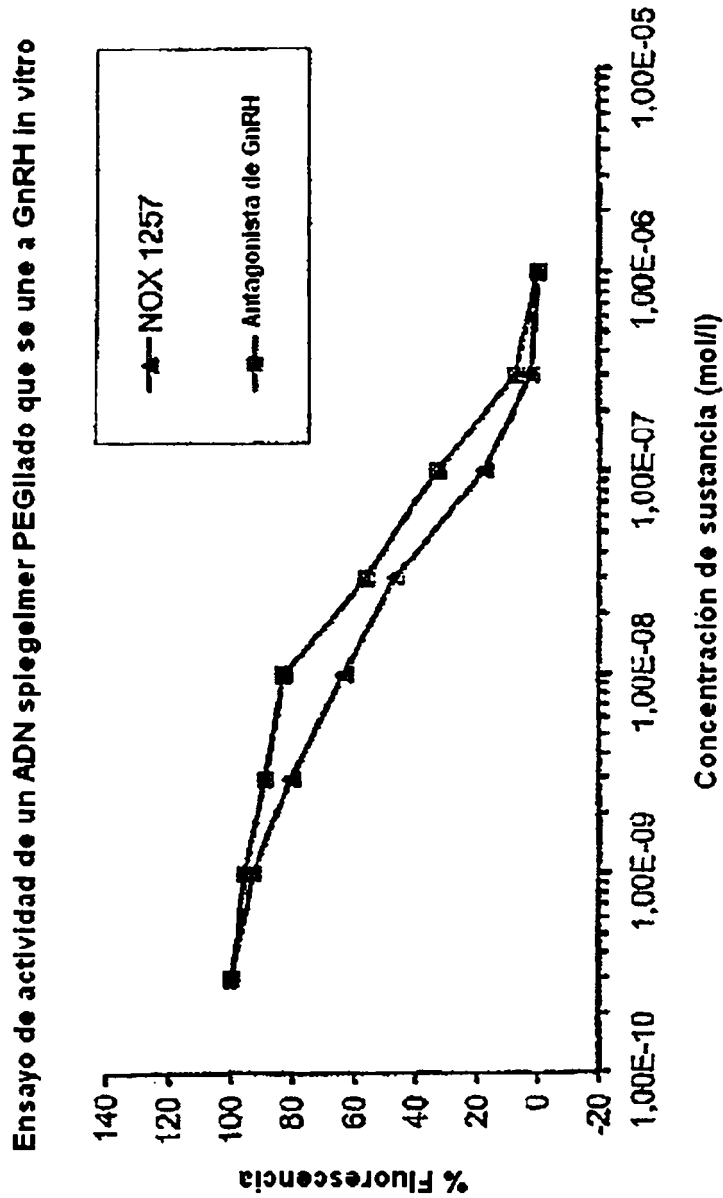


Fig. 26a

Ensayo de actividad de un ADN splegimer no PEGilado y PEGilado que se une a GnRH in vitro

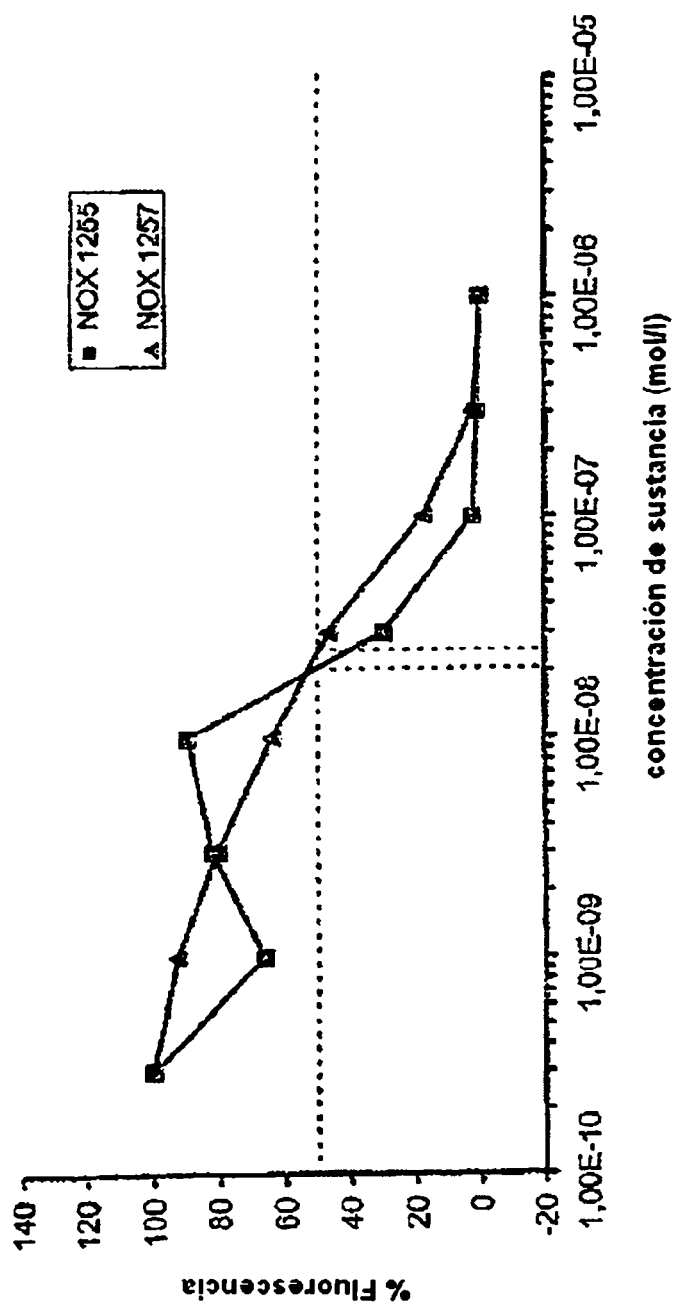


Fig. 26b

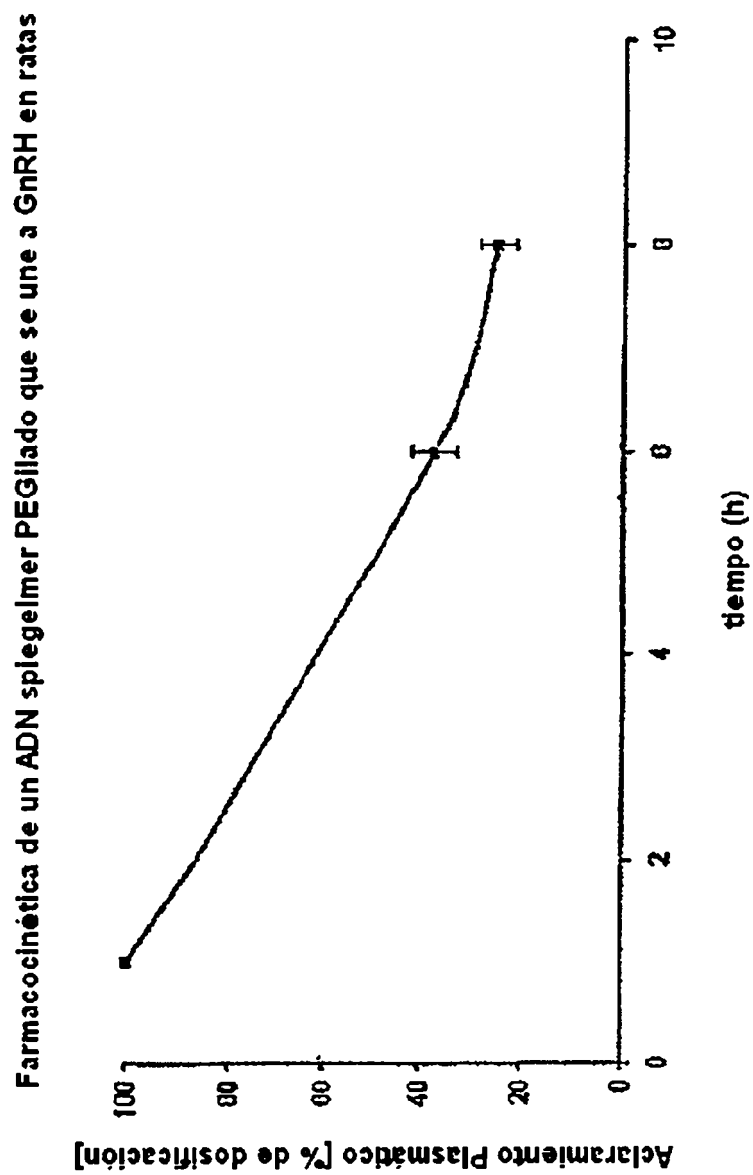


Fig. 27

Perfil farmacocinético de L-ARN PEGilado, dosis intravenosa

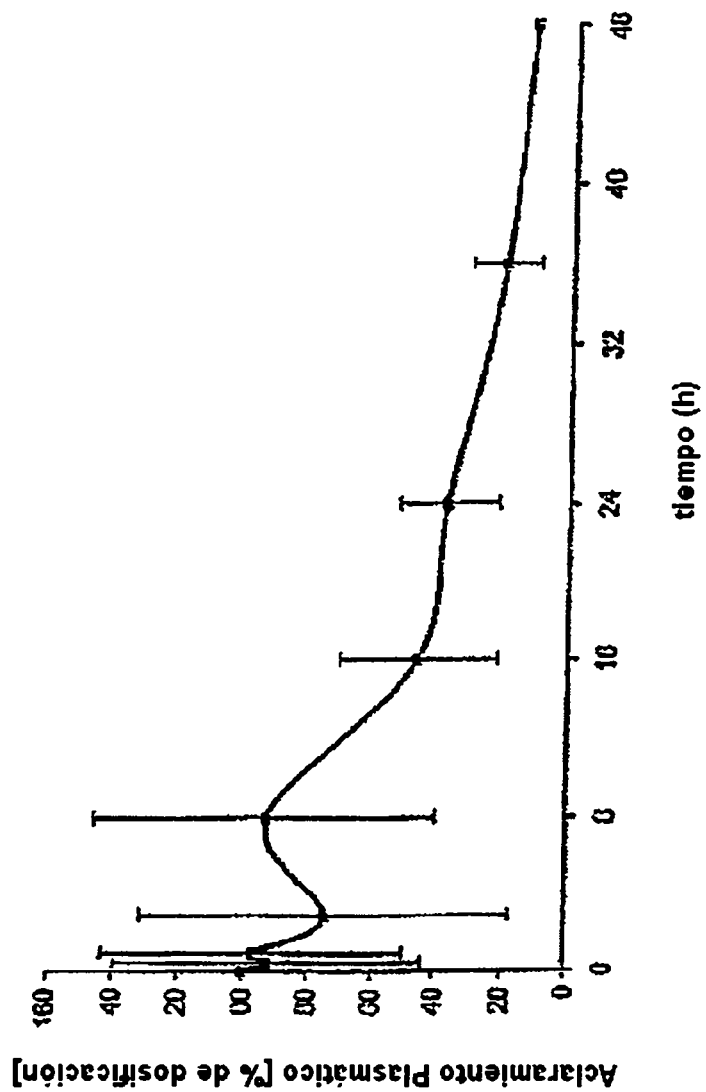


Fig. 28a

Perfil farmacocinético de L-ARN, dosis intravenosa

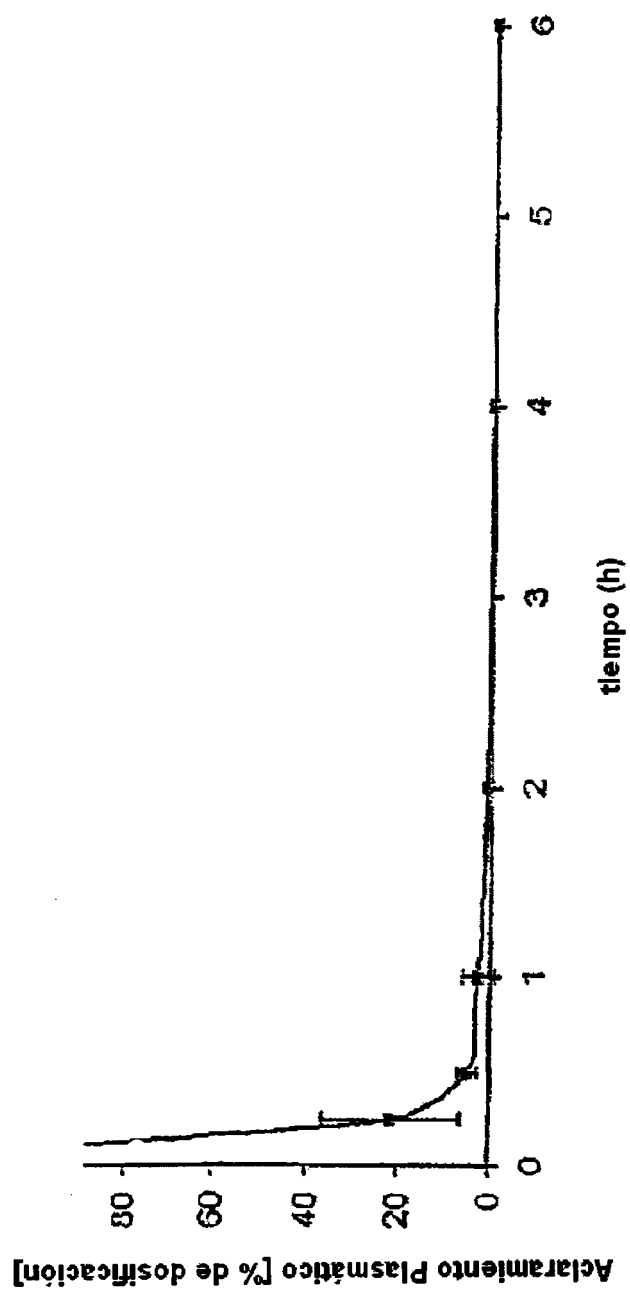
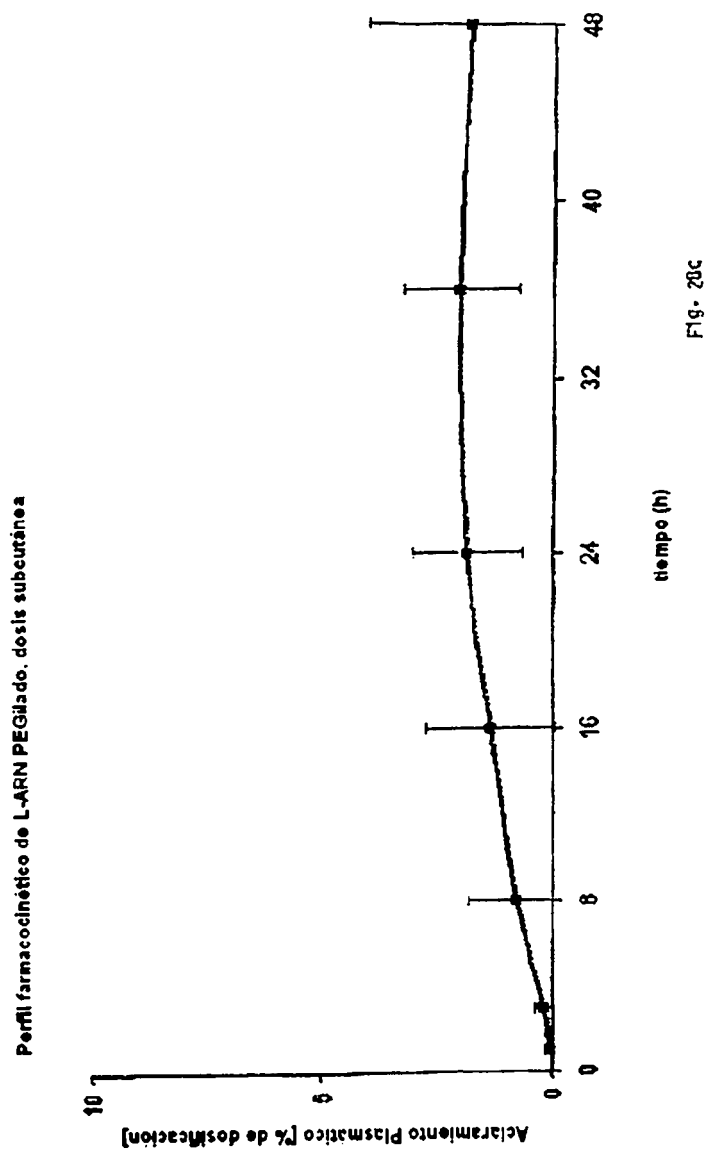


Fig. 28b



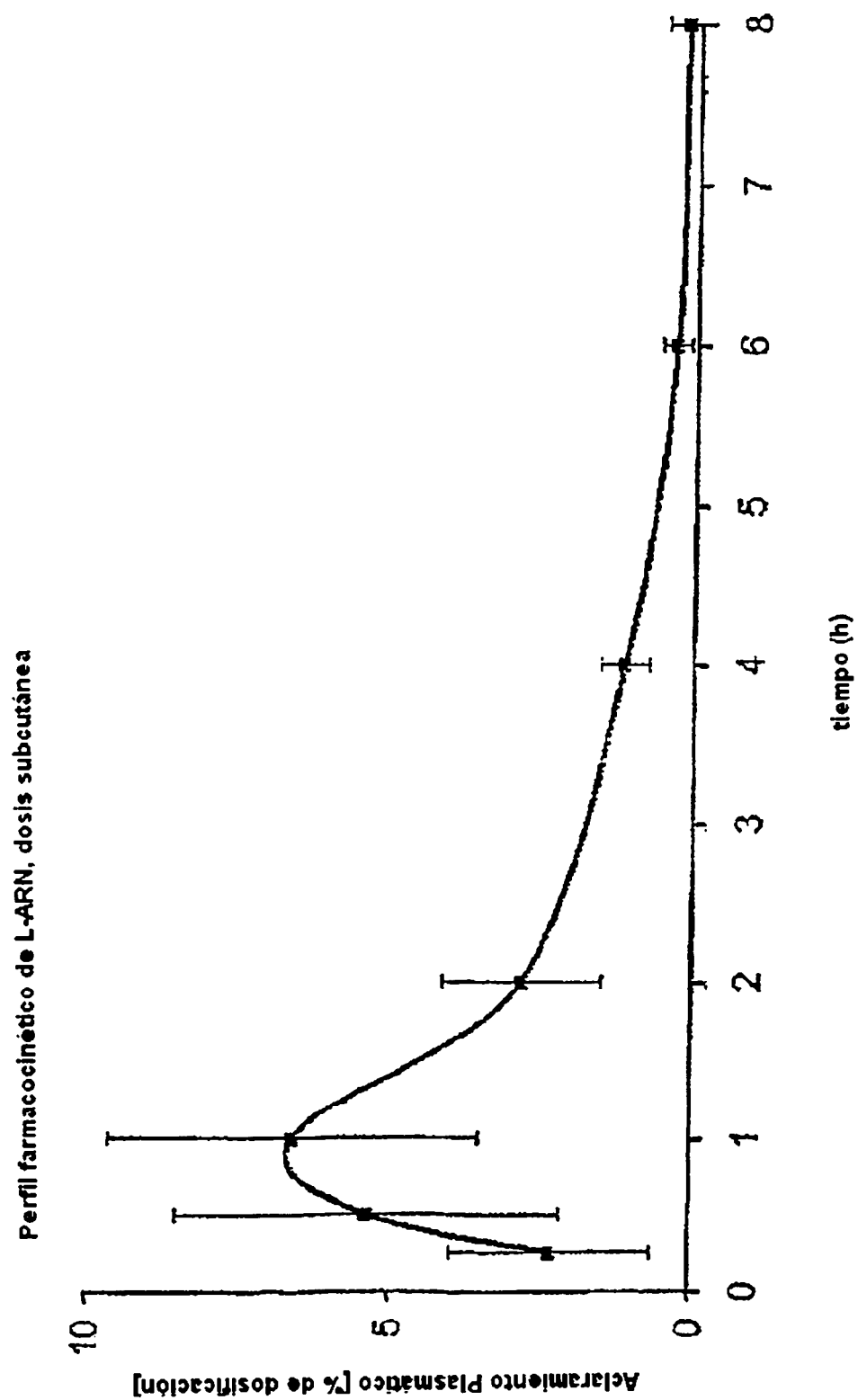


Fig. 28d

Ensayo de actividad de un ADN splegimer que se une a GnRH in vivo

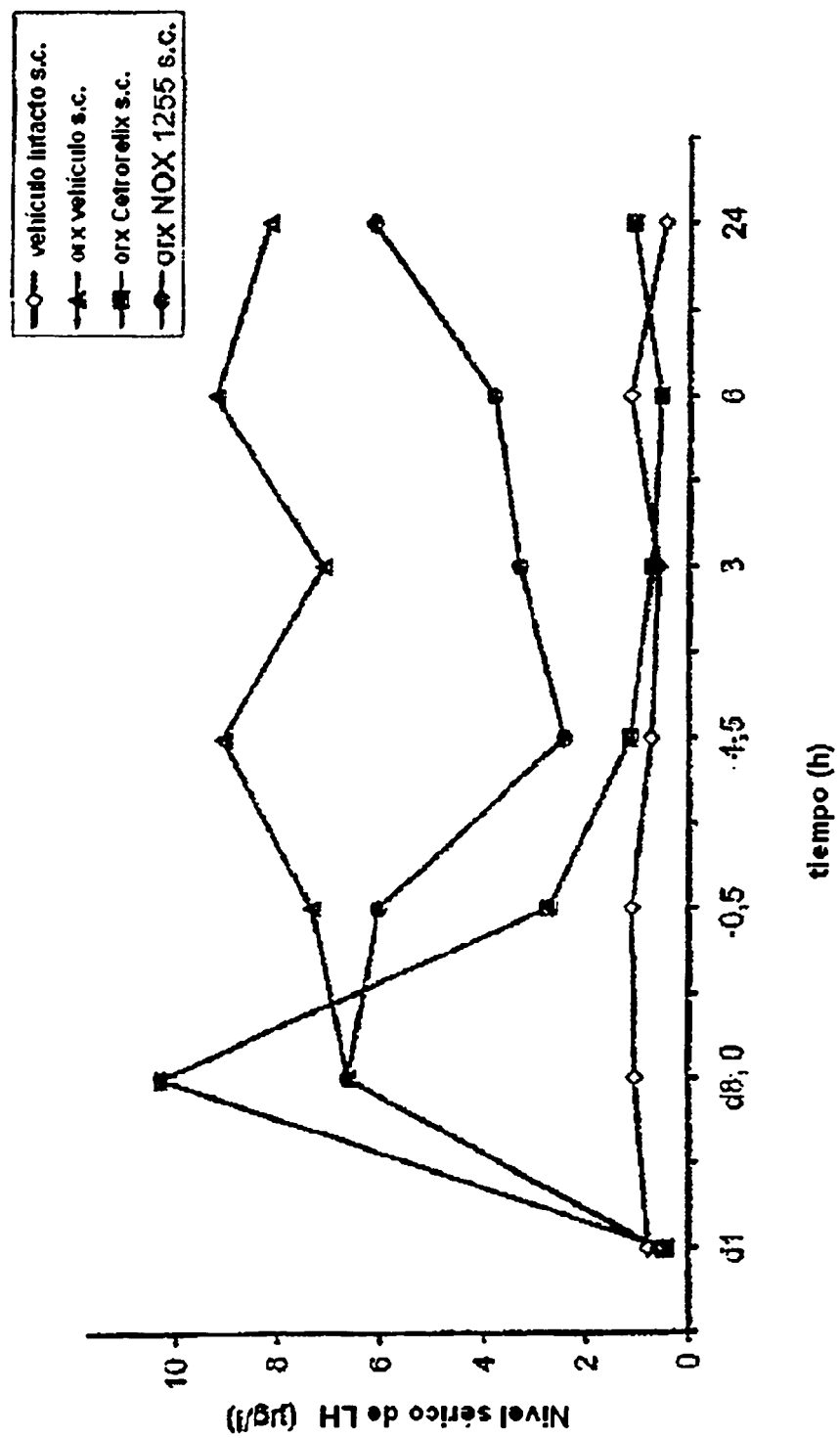


Fig. 29

ES 2 346 640 T4

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Noxxon Pharma AG	
5	<120> Ácido L-Nucleico Modificado	
	<130> N 10032 PCT	
	<160> 7	
	<170> PatentIn version 3.1	
10	<210> 1	
	<211> 67	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ácido L-nucleico, que se une específicamente a GnRH	
20	<400> 1	
	ccaagcttgc gtaagcagtc tcctctcagg ggaggttggg cggcgtaaa gcaccgggtt	60
25	gcagggg	67
	<210> 2	
	<211> 10	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ácido L-nucleico modificado	
	<220>	
	<221> base modificada	
40	<222> (1)..(1)	
	<223> grupo NH ₂ en el extremo 5'	
45	<400> 2	
	tattagagac	10
	<210> 3	
50	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ácido L-nucleico modificado	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> grupo PO ₄ en el extremo 5'	
65	<400> 3	
	tattagagac	10

ES 2 346 640 T4

	<210> 4	
	<211> 40	
	<212> ARN	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<221> L-ARN	
10	<222> (1)..(40)	
	<223>	
	<400> 4	
15	uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcu gugcagagcu	40
	<210> 5	
20	<211> 40	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> PEG-L-ARN 40 kDalton	
	<220>	
30	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Modificación con PEG en el extremo 5'	
35	<400> 5	
	uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcu gugcagagcu	40
40	<210> 6	
	<211> 32	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<221> L-ADN	
	<222> (1)..(32)	
50	<223> sonda de captura de L-ADN	
	<220>	
	<221> L-ADN	
55	<222> (32)..(32)	
	<223> NH ₂ en el extremo 3'	
	<400> 6	
60	ccgcacaga ccgagtttcc ttatttttt tt	32
	<210> 7	
65	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 346 640 T4

<220>
<221> ácido nucleico artificial
<222> (1)..(24)
5 <223> sonda detectora de L-ADN
<220>
<221> ácido nucleico artificial
10 <222> (1)..(1)
<223> biotinilado en el extremo 5'

<400> 7
15 ttttttttag ctctgcacag cgct

24

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65