



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 975 373**

(51) Int. Cl.:
A61K 47/60
(2007.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2017 PCT/EP2017/001399**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2018 WO18099600**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2017 E 17829597 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3548089**

(54) Título: **Un método para la polialcoxilación de ácidos nucleicos que permite la recuperación y reutilización del exceso de reactante de polialcoxilación**

(30) Prioridad:

30.11.2016 EP 16201391

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

04.07.2024

(73) Titular/es:

**TME PHARMA AG (100.0%)
Max-Dohrn-Straße 8-10
10589 Berlin, DE**

(72) Inventor/es:

BETHGE, LUCAS

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 975 373 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un método para la polialcoxilación de ácidos nucleicos que permite la recuperación y reutilización del exceso de reactante de polialcoxilación

- 5 La presente invención se refiere a un método para la preparación de una molécula de ácido nucleico modificada que comprende un resto de ácido nucleico y un resto no ácido nucleico, haciendo reaccionar un primer reactante y un segundo reactante, en donde el primer reactante comprende el resto no ácido nucleico y un grupo carboxilo y en donde el segundo reactante es una molécula de ácido nucleico modificada con amino que comprende el resto de ácido nucleico y una modificación amino que comprende un grupo amino unido al resto de ácido nucleico.
- 10 La conjugación de fármacos, tales como ácidos nucleicos, péptidos, proteínas y nanopartículas con otros restos tales como compuestos polialcoxi, se usa ampliamente para aumentar la biodisponibilidad, estabilidad, seguridad y eficacia para aplicaciones terapéuticas. Dentro del campo de productos terapéuticos de oligonucleótidos, los aptámeros y los Spiegelmers (también denominados aptámeros de imagen especular) están normalmente polialcoxilados. El polietilenglicol (abr. PEG) es un compuesto polialcoxi usado habitualmente que ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos como parte de medicamentos administrados por vía intravenosa, oral y dérmica.
- 15 En general, un ácido nucleico polialcoxilado se prepara por un método que primero ensambla el ácido nucleico que contiene un grupo reactivo en una fase sólida (Hoffmann et. al, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 2011, 4:4.46.1-4.46.30). Después de la escisión de la fase sólida y la desprotección, el ácido nucleico sintetizado se purifica por métodos tales como la cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (abr. RP-HPLC) o cromatografía de intercambio iónico-cromatografía líquida de alto rendimiento (abr. IEX-HPLC) o ultrafiltración (abr. UF). Después, 20 el grupo reactivo del ácido nucleico se puede hacer reaccionar con un compuesto polialcoxi que tiene un grupo reactivo de emparejamiento adecuado para formar un conjugado del compuesto polialcoxi y el ácido nucleico. Después de la conjugación, el producto bruto que consiste en moléculas de ácido nucleico polialcoxilado y moléculas de ácido nucleico no polialcoxilado se purifica por métodos que pueden ser una combinación de HPLC, en particular RP- o IEX-HPLC, y ultrafiltración.
- 25 El rendimiento de una reacción de polialcoxilación depende de la naturaleza y pureza del ácido nucleico que se va a polialcoxilar, del tipo de reacción de polialcoxilación y de las propias condiciones de reacción. Los tipos de reacción más habitualmente usados para la polialcoxilación de ácidos nucleicos son:
- 30 a) aminolisis del éster activo del ácido polalcoxicarboxílico por un oligonucleótido modificado con amino en presencia de una base;
 - b) adición de un oligonucleótido modificado con tiol a un compuesto polialcoxi que lleva un grupo maleimida; y
 - c) cicloadición 1,3-dipolar de un oligonucleótido modificado con azida con un compuesto polialcoxi que lleva un grupo alquino o de un oligonucleótido modificado con alquino con un compuesto polialcoxi que lleva un grupo azida.
- 35 La reacción de polialcoxilación más ampliamente usada es la aminolisis de un éster activo de ácido polalcoxicarboxílico mediante un oligonucleótido modificado con amino en presencia de una base. La reacción es rápida y fácilmente escalable. La adición de maleimida-tiol no requiere ninguna base y es una reacción rápida y selectiva, pero el tiol debe liberarse del precursor disulfuro en una etapa de reacción separada con un agente reductor tal como DTT. El exceso de DTT debe eliminarse por completo antes de la reacción de conjugación, ya que también dará adición a la maleimida y, por lo tanto, reducirá el rendimiento. La eliminación del DTT debe ser rápida ya que el tiol liberado sufrirá oxidación. Esto complica el uso para la producción a gran escala. La cicloadición 1,3-dipolar, 40 también conocida como "reacción clic", necesita la presencia de cobre como catalizador o una especie de alquino estéricamente impedido. Para la "reacción clic" sin metales, es necesario introducir de forma post-sintética la azida o el alquino estéricamente impedido en el oligonucleótido, ya que ambos son sensibles frente a bases nucleófilas tales como la metilamina/amoníaco usadas para la escisión y desprotección de oligonucleótidos.
- 45 Teniendo en cuenta las limitaciones de la adición de maleimida-tiol y la "reacción clic", la formación de oligonucleótidos polialcoxilados a gran escala se realiza mejor por aminolisis de un éster activo del ácido polalcoxicarboxílico por un oligonucleótido modificado con amino. Típicamente, los ácidos polalcoxicarboxílicos se activan como ésteres de N-hidroxisuccinimida que se preparan en una reacción separada, se purifican y se almacenan hasta su uso. Debido a su naturaleza reactiva, los ésteres antes mencionados son propensos a la hidrólisis al correspondiente ácido polalcoxicarboxílico libre y N-hidroxisuccinimida. Esto exige inevitablemente precauciones durante la manipulación, almacenamiento o transporte de dichas sustancias.

50 El documento WO 2012/149198 A2 se refiere a un método para preparar un oligonucleótido pegilado terapéutico.

55 El documento WO 2015/113776 A1 se refiere a un método para la preparación de una molécula de ácido nucleico polialcoxilado, en donde el método comprende separar la molécula de ácido nucleico polialcoxilado de la molécula de ácido nucleico no polialcoxilado haciendo precipitar la molécula de ácido nucleico polialcoxilado de una mezcla que comprende tanto la molécula de ácido nucleico no polialcoxilado como la molécula de ácido nucleico polialcoxilado.

El problema subyacente de la presente invención es proporcionar un método para la preparación de una molécula de ácido nucleico modificada y más específicamente una molécula de ácido nucleico polialcoxilado tal como una molécula de ácido nucleico PEGilado.

Este y otros problemas se resuelven mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas. Se pueden considerar realizaciones preferidas de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

El problema subyacente de la presente invención se resuelve más específicamente en un primer aspecto que también es una primera realización del primer aspecto, por un método para la preparación de una molécula de ácido nucleico modificada que comprende un resto de ácido nucleico y un resto no ácido nucleico haciendo reaccionar un primer reactante y un segundo reactante, en donde el primer reactante comprende el resto no ácido nucleico y un grupo carboxilo, y en donde el segundo reactante es una molécula de ácido nucleico modificada con amino que comprende el resto de ácido nucleico y una modificación amino que comprende un grupo amino que está unido al resto de ácido nucleico, en donde el método comprende las siguientes etapas:

a) activar el grupo carboxilo del primer reactante, mediante un reactivo de condensación y una base no nucleófila en un disolvente orgánico miscible con agua, y

b) hacer reaccionar el grupo carboxilo activado del primer reactante de la etapa a) y el grupo amino de la modificación amino de la molécula de ácido nucleico modificada con amino que se ha disuelto en agua o una mezcla de un disolvente orgánico miscible con agua y agua,

mediante lo cual se forma la molécula de ácido nucleico modificada,

en donde

el primer reactante y/o el resto no ácido nucleico es un compuesto polialcoxi,

el agente de condensación se selecciona del grupo que consiste en

a) una sal de fosfonio seleccionada del grupo que consiste en BOP, PyBOP, PyBrop, AOP, PyAOP, BrOP y PyClOP,

b) una sal de uronio seleccionada del grupo que consiste en HCTU, TCTU, TBTU, HBTU, HATU, TOTU y COMU, y

c) una carbodiimida seleccionada del grupo que consiste en DCC (N,N'-díciclohexilcarbodiimida), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida), y

el disolvente orgánico miscible con agua se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, sec-butanol, terc-butanol, dimetilsulfóxido, dietilsulfóxido, metiletilsulfóxido, formamida, metilformamida, dimetilformamida, etilformamida, etilmetylformamida, dietilformamida, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidona, N-etylpirrolidona, acetonitrilo, acetona, etil metil cetona, metil propil cetona, dietil cetona, metil isopropil cetona, formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de isopropilo, acetato de metilo, acetato de etilo, propanoato de metilo, tetrahidrofurano y dioxano, preferiblemente dimetilformamida, acetonitrilo y dimetilsulfóxido.

En una segunda realización del primer aspecto que también es una realización de la primera realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico modificada con amino se disuelve en una mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible con agua en presencia de una sal de amonio cuaternario.

En una tercera realización del primer aspecto que también es una realización de la primera y segunda realización del primer aspecto, el primer reactante activado de la etapa a) se añade a la molécula de ácido nucleico modificada con amino disuelta en agua o en una mezcla de un disolvente orgánico miscible con agua y agua.

En una cuarta realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda y tercera realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico modificada con amino es adecuada para usar en un método analítico, en diagnóstico y/o terapia.

En una quinta realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera y cuarta realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico modificada con amino se selecciona del grupo que comprende aptámeros modificados con amino, Spiegelmers modificados con amino, ácidos nucleicos inmunoestimuladores modificados con amino, ARNip modificados con amino, moléculas de miARN modificados con amino y moléculas antisentido de ácidos nucleicos modificados con amino, preferiblemente los aptámeros son aptámeros que consisten en nucleótidos L y/o D

y/o en donde el resto de ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende aptámeros, Spiegelmers, ácidos nucleicos inmunoestimuladores, ARNip, moléculas de miARN y moléculas antisentido de ácido nucleico, preferiblemente los aptámeros son aptámeros que consisten en nucleótidos L y/o D.

En una sexta realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta realización del primer aspecto, en la etapa b) se usa un exceso de moléculas del primer reactante activado respecto a las moléculas ácido nucleico modificadas con amino.

- 5 En una séptima realización del primer aspecto que también es una realización de la sexta realización del primer aspecto, el exceso se expresa como una relación molar de moléculas del primer reactante activado y las moléculas de ácido nucleico modificadas con amino, en donde la relación molar es de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5.
- 10 En una octava realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima realización del primer aspecto, para activar el primer reactante según la etapa a), el primer reactante se disuelve en el disolvente orgánico miscible con agua y se añaden el agente de condensación y la base, preferiblemente primero el agente de condensación y posteriormente la base, en donde el agente de condensación se disuelve en el disolvente orgánico miscible con agua.
- 15 En una novena realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y octava realización del primer aspecto, entre 0,25 min y 60 min, preferiblemente entre 0,5 min y 20 min y más preferiblemente entre 1,0 min y 5,0 min después de añadir la base, la solución así obtenida se añade a la solución que contiene la molécula de ácido nucleico modificada con amino, preferiblemente entre 1,0 min y 5,0 min después de añadir la base, comprendiendo la solución el agente condensante y la base se añade a la solución que contiene la molécula de ácido nucleico modificada con amino.
- 20 En una décima realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava y novena realización del primer aspecto, el agente de condensación se selecciona del grupo que consiste en PyBOP, TBTU, COMU y HBTU, preferiblemente el agente de condensación es HBTU.
- En una undécima realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena y décima realización del primer aspecto, la base se selecciona del grupo que comprende diisopropiletilamina (DIPEA), trimetilamina y DBU, preferiblemente diisopropiletilamina (DIPEA).
- 25 En una 12^a realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima y undécima realización del primer aspecto, una o la relación molar de la base al primer reactante es igual o mayor que 1.
- 30 En una 13^a realización del primer aspecto que también es una realización de la octava, novena, décima, undécima y duodécima realización del primer aspecto, la solución de la molécula de ácido nucleico modificada con amino contiene la base no nucleófila, de modo que la relación molar de la base no nucleófila al número de fosfodiésteres en la molécula de ácido nucleico modificada con amino es mayor que 3.
- 35 En una 14^a realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y 13^a realización del primer aspecto, la etapa a) se lleva a cabo a una temperatura de 5°C a 60°C, preferiblemente a una temperatura de 10°C a 40°C, más preferiblemente a una temperatura de 15°C a 30°C, lo más preferiblemente a temperatura ambiente.
- En una 15^a realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a y 14^a realización del primer aspecto, la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de 5°C a 60°C, preferiblemente a una temperatura de 10°C a 40°C, más preferiblemente a una temperatura de 15°C a 30°C, lo más preferiblemente a temperatura ambiente.
- 40 En una 16^a realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a y 15^a realización del primer aspecto, la reacción del grupo carboxilo activado del primer reactante con el grupo amino de la molécula de ácido nucleico modificada con amino se completa después de 5 minutos a seis horas, preferiblemente después de 15 minutos a 45 minutos, más preferiblemente después de 15 a 30 minutos.
- 45 En una 17^a realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a, 15^a y 16^a realización del primer aspecto, la etapa b) se lleva a cabo en un intervalo de pH de 7,5 a 10, preferiblemente en un intervalo de pH de 7,5 a 9 y más preferiblemente en un intervalo de pH de 7,5 a 8,5.
- 50 En una 18^a realización del primer aspecto, que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a, 15^a, 16^a y 17^a realización del primer aspecto, en la etapa b) el primer reactante activado se añade a la solución de las moléculas de ácido nucleico modificadas con amino hasta que de 80% a 100% de las moléculas modificadas con amino han reaccionado con el primer reactante, preferiblemente hasta que de 90% a 100% de las moléculas de ácido nucleico modificadas con amino han reaccionado con el primer reactante.

En una 19^a realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a, 15^a, 16^a, 17^a y 18^a realización del primer aspecto, después de completar la etapa b) cualquier primer reactante que no ha reaccionado se separa de la reacción por ultrafiltración y/o cromatografía, preferiblemente por cromatografía de intercambio iónico.

- 5 En una 20^a realización del primer aspecto que también es una realización de la 19^a realización del primer aspecto, el primer reactante separado se recicla y se usa en la etapa a).

En una 21^a realización del primer aspecto que también es una realización de la cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a, 15^a, 16^a, 17^a, 18^a, 19^a y 20^a realización del primer aspecto, el compuesto polialcoxi es un compuesto polialcoxi lineal o ramificado.

- 10 En una 22^a realización del primer aspecto, que también es una realización de la cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a, 15^a, 16^a, 17^a, 18^a, 19^a, 20^a y 21^a realización del primer aspecto, el compuesto polialcoxi se selecciona del grupo que comprende polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, poliglicerol.

- 15 En una 23^a realización del primer aspecto que también es una realización de la cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a, 15^a, 16^a, 17^a, 18^a, 19^a, 20^a, 21^a y 22^a realización del primer aspecto, el compuesto polialcoxi es polietilenglicol.

- 20 En una 24.^a realización del primer aspecto que también es una realización de la cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, 13^a, 14^a, 15^a, 16^a, 17^a, 18^a, 19^a, 20^a, 21^a, 22^a y 23^a realización del primer aspecto, el compuesto polialcoxi tiene un peso molecular de 5.000 Da a 100.000 Da, preferiblemente de 20.000 Da a 80.000 Da, más preferiblemente 40.000 Da.

Se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico modificada obtenida por un método según el primer aspecto, que incluye cualquier realización del mismo.

También se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico modificada obtenida por un método según el primer aspecto, que incluye cualquier realización del mismo, para usar en terapia.

- 25 Adicionalmente se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico modificada obtenida por un método según el primer aspecto, que incluye cualquier realización del mismo, para usar en diagnóstico.

Además se describe en el presente documento el uso de una molécula de ácido nucleico modificada obtenida por un método según el primer aspecto, que incluye cualquier realización del mismo, en un método *in vitro* para analizar una muestra.

- 30 La presente invención se basa en la sorprendente identificación de un protocolo mejorado para la polialcoxilación de oligonucleótidos modificados con amino que permite una producción más eficiente de ácidos nucleicos polialcoxilados como se conoce en el estado de la técnica (Hoffmann et. al, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 2011, 4:4.46.1-4.46.30). La presente invención proporciona en particular un método para la preparación de ácidos nucleicos polialcoxilados que comprende hacer reaccionar un ácido nucleico modificado con amino con un ácido polialcoxicarboxílico activado con un reactivo de condensación justo antes de la reacción de conjugación. Además, se descubrió sorprendentemente que el ácido polalcoxicarboxílico usado en exceso para llevar la reacción hasta completarse podría recuperarse durante el procesamiento posterior, tal como mediante purificación por UF y/o HPLC del producto de polialcoxilación bruto. Después del secado, el ácido polalcoxicarboxílico reciclado era reutilizable para otra reacción de polialcoxilación.

- 40 El método de la presente invención como se define en las reivindicaciones presenta varias ventajas en comparación con los métodos de la técnica anterior. Más específicamente, dicho método de la invención es menos laborioso y es un procedimiento de fabricación más respetuoso con el medio ambiente que permite el reciclado del primer reactante que lleva el grupo carboxilo que se usa en exceso. Además, la preparación del primer reactante que lleva el grupo carboxilo requiere menos etapas de fabricación y, por lo tanto, es menos laborioso que la preparación y aislamiento del reactante carboxilo activado que se ha descrito en la técnica anterior. Además, el primer reactante que lleva el grupo carboxilo es más estable que el resto carboxilo activado descrito en la técnica anterior y no requiere condiciones especiales de almacenamiento en frío, lo que aumenta las ventajas del método de la invención.

- 45 A la luz de lo anterior y de acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones, el propio ácido polalcoxicarboxílico se puede usar como material de partida para la reacción con la molécula de ácido nucleico modificada con amino tal como un oligonucleótido modificado con amino, para formar así la molécula de ácido nucleico modificada y el oligonucleótido modificado, respectivamente, de modo que la modificación es un resto polialcoxi y más preferiblemente un resto PEG.

- 50 En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, el primer reactante activado preparado en la etapa a) del método de la invención se hace reaccionar con la molécula de ácido nucleico modificada con amino, de modo que la reacción ocurre en una solución; los elementos de dicha solución comprenden dicho primer

reactante activado y dicha molécula de ácido nucleico modificada con amino y un disolvente, de modo que el disolvente se selecciona del grupo que comprende agua y una mezcla de un disolvente orgánico miscible con agua y agua. Preferiblemente, el primer reactante activado y/o la molécula de ácido nucleico modificada con amino se disuelven o dispersan en el disolvente o en una parte de dicho disolvente. Como se usa preferiblemente en el presente documento, una parte del disolvente es una fase del disolvente o una de las fases formadas por el disolvente.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, el primer reactante activado se añade al ácido nucleico modificado con amino, de modo que, preferiblemente, el ácido nucleico modificado con amino está presente en la solución. En una realización alternativa, el ácido nucleico modificado con amino, que está preferiblemente presente en la solución, se añade al primer reactante activado, preferiblemente al primer reactante activado de la etapa a).

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, el resto de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, la molécula de ácido nucleico modificada con amino comprende el resto de ácido nucleico y una modificación amino que está unida al resto de ácido nucleico.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, la molécula de ácido nucleico modificada con amino se ha disuelto en agua o una mezcla de un disolvente orgánico miscible con agua y agua, antes de hacer reaccionar la molécula de ácido nucleico modificada con amino con el primer reactante. Por consiguiente, la solución en la que está presente la molécula de ácido nucleico modificada con amino antes y después de la reacción con el primer reactante es diferente, también con respecto a la solución y los disolventes que forman dicha solución.

En una realización y como se usa preferiblemente en el presente documento, un resto de carbohidrato es un resto que comprende un carbohidrato o un polímero de carbohidratos. Un resto de carbohidrato incluye, pero no se limita a, un carbohidrato, un polímero de carbohidratos, una glicoproteína, un nucleótido y un ácido nucleico.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador modificado con amino es un ácido nucleico inmunoestimulador modificado con amino.

En una realización del método de la invención, como se define en las reivindicaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador es un ácido nucleico inmunoestimulador.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, un aptámero es un ácido nucleico que se une a una diana, que preferiblemente se une a la diana mediante una unión diferente del emparejamiento de bases de Watson-Crick o del emparejamiento de bases de Hoogsteen. Preferiblemente, el aptámero consiste en D-nucleótidos. En una realización alternativa, el aptámero es un aptámero mixto que comprende tanto D-nucleótidos como al menos un L-nucleótido, de modo que preferiblemente el número de L-nucleótidos en el aptámero es menor que el número de D-nucleótidos.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, un Spiegelmer es un ácido nucleico de L-nucleótidos que se une a la diana, que preferiblemente se une a la diana mediante una unión diferente del emparejamiento de bases de Watson-Crick o del emparejamiento de bases de Hoogsteen. Preferiblemente, el Spiegelmer consiste en L-nucleótidos. En una realización alternativa, el Spiegelmer es un Spiegelmer mixto que comprende tanto L-nucleótidos como al menos un D-nucleótido, de modo que preferiblemente el número de D-nucleótidos en el aptámero es menor que el número de L-nucleótidos.

Tanto los aptámeros como los Spiegelmers pueden modificarse. Dicha modificación puede estar relacionada con un solo nucleótido de la secuencia de nucleótidos de dichos aptámeros y Spiegelmers y son bien conocidas en la técnica. Describen ejemplos de dicha modificación, entre otros, Venkatesan et al. (Venkatesan, N., Kim, S.J., et al., *Curr. Med. Chem.* 10, 1973 (2003)) y Kusser (Kusser, W., J. *Biotechnol.* 74, 27 (2000)). Dicha modificación puede ser un átomo de H, un átomo de F o un grupo OCH₃ o grupo NH₂ en la posición 2' del nucleótido individual que constituye el aptámero. Además, el aptámero según la presente invención puede comprender al menos un nucleótido bloqueado (LNA) o un nucleótido desbloqueado (UNA).

En una realización y como se usa preferiblemente en el presente documento, temperatura ambiente significa de 20°C a 22°C.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, un primer reactante activado es un primer reactante que se ha sometido a activación por medio de un reactivo de condensación; preferiblemente, el primer reactante activado es un primer reactante que comprende un grupo carboxilo activado, de modo que el grupo carboxilo activado resulta de un grupo carboxilo del primer reactante que se ha sometido a activación por medio de un reactivo de condensación.

La sal de amonio cuaternario usada en una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, se usa para mejorar la solubilidad de la molécula de ácido nucleico modificada con amino en la mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible con agua. Se selecciona del grupo que comprende cloruro de tetraalquilamonio, bromuro de tetraalquilamonio, tetrafluoroborato de tetraalquilamonio, hexafluorofosfato de tetraalquilo, hidrogenosulfato de tetraalquilo, hidrogenofosfato de tetraalquilo, en donde el alquilo es una cadena de alquilo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 átomos de C, en donde preferiblemente el compuesto de amonio cuaternario es bromuro de tetrabutilamonio.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, los ácidos grasos incluyen ácidos grasos saturados e insaturados con uno o varios dobles enlaces. Tanto los ácidos grasos saturados como los insaturados pueden tener una longitud de cadena de 8 a 30 átomos de carbono, es decir, una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 átomos de carbono.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, los esteroides incluyen corticosteroides tales como colesterol, ácidos biliares tales como ácido cólico y ácido litocólico, hormonas esteroideas tales como cortisol o progesterona, glucósidos esteroideos tales como digoxigenina y metabolitos de los esteroides antes mencionados.

En una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, la base y preferiblemente la base no nucleófila se selecciona del grupo que comprende trialquilaminas tales como diisopropiletilamina (DIPEA), trimetilamina, triisopropilamina, bases de poliaminofosfacenos peralquilados estéricamente impedidos tales como t-Bu-P4, 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), 2,6-di-terc-butilpiridina, 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno, tetrametilpiperidida de litio, terc-butóxido de potasio, 1,1,3,3-tetrametilguanidina, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina. En una realización preferida, la base es diisopropiletilamina (DIPEA).

El método de polialcoxilación de la invención como se define en las reivindicaciones, se puede aplicar a ácidos nucleicos que contienen restos azúcar naturales, por ejemplo ácidos 2'-desoxirribonucleicos (en lo sucesivo "ADN") y ácidos ribonucleicos (en lo sucesivo "ARN") y ácidos nucleicos que contienen restos azúcar modificados, restos fosfato modificados o nucleobases modificadas. El método según la invención no se limita al estereoisómero natural de ARN y ADN. También se pueden usar ácidos nucleicos polialcoxilados que comprenden ADN (L-ADN) o ARN (L-ARN) imágenes especulares, así como L-ADN o L-ARN modificados con azúcar, fosfato o nucleótido, así como oligonucleótidos híbridos D/L y se pueden preparar modificaciones de los mismos mediante el método según la presente invención. Las modificaciones en el resto de azúcar incluyen el cambio del tamaño del anillo (p. ej., furanosa, hexosa), sustitución, introducción o eliminación de átomos de un solo anillo (p. ej., carba-azúcares, aza-azúcar), sustitución, introducción o eliminación de grupos o átomos de cadenas laterales. (p. ej., 2'-F, 2'OMe), sustitución del anillo por derivados acíclicos o policíclicos (p. ej., ácido nucleico desbloqueado, ácido nucleico-aminoácido, ácido nucleico bloqueado, ácido nucleico triciclo), orientación o posición de la nucleobase (orientación α-anomérica, ácido nucleico de hexitol). El oligonucleótido también puede consistir en uno o más restos abásicos naturales o no naturales (p. ej., tetrahidrofurano, etilenglicol). Los restos fosfato modificados incluyen fosforotioatos, fosforoditioatos, alquilfosfonatos, alquilfosfatos, fosforamidatos y fosfortioamidatos. Las modificaciones de las nucleobases pueden ocurrir de forma natural, tal como inosina, xantina, 5,6-dihidrouracilo o 5-metilcitosina, o modificaciones artificiales, tales como C5-alquinilpirimidinas, purinas y pirimidinas N-alquiladas, derivados C6 y/o C5 de pirimidinas y purinas y otros. El ácido nucleico también puede comprender o consistir en una o más de las modificaciones mencionadas anteriormente.

Los métodos para el ensamblado de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. En realizaciones, los ácidos nucleicos se ensamblarán por el método de fosforamidita empleando un acoplamiento por etapas de unidades estructurales protegidas con el ácido nucleico naciente sobre un soporte sólido (Beaucage et al., *Tetrahedron* 1992, 48(12), 2223-2311). En una realización preferida, la dirección de síntesis es de 3' a 5', pero también es aplicable la síntesis inversa de 5' a 3' (Srivastava et al., *Nucleic Acids Symposium Series* 2008, 52, 103-104). Una vez que se ensambla la secuencia de ácidos nucleicos deseada y se introducen todas las modificaciones necesarias para el procesamiento posterior, el ácido nucleico se escinde del soporte sólido y se desprotege. Los ácidos nucleicos pueden entonces purificarse por cualquiera de los medios conocidos en la técnica.

Habitualmente, la etapa de escisión y desprotección implica el uso de amoniaco y/o alquilamina o sales de amoniaco. Por ejemplo, el ARN se escinde con NH₃/MeNH₂ seguido de NEt₃.HF o Bu₄NF. En caso de polialcoxilación posterior, estas aminas y sales de amonio deben eliminarse, ya que conducen a reacciones secundarias no deseadas que disminuyen la eficacia del acoplamiento durante la polialcoxilación. La eliminación de especies de amina se logra mediante intercambio de sales, que se puede hacer por adición de grandes cantidades de sales de sodio seguido de precipitación o ultrafiltración, o durante el IEX-HPLC usando gradientes de sales de sodio para la elución. Despues de la purificación por IEX-HPLC, también es necesaria la eliminación del exceso de sal antes de la polialcoxilación. Si es necesario, se pueden aplicar una pluralidad de técnicas diferentes. En realizaciones preferidas se usa intercambio de sal seguido de ultrafiltración antes de la polialcoxilación. La posición de la modificación amino en el segundo reactante y preferiblemente en la molécula de ácido nucleico modificada con amino tal como, p. ej., un oligonucleótido, puede estar en el extremo 3' y/o en el extremo 5' y/o en cualquier posición entre el nucleótido terminal 3' y el nucleótido terminal 5' del segundo reactante y preferiblemente de la molécula de ácido nucleico modificada con amino tal como, p. ej., un oligonucleótido. Los ácidos nucleicos amino modificados usados para los ejemplos para ilustrar la presente

invención se sintetizaron y purificaron según los ejemplos 1-3.

Los compuestos polialcoxi que se pueden usar en la presente invención como se define en las reivindicaciones, incluyen polí(óxidos de etileno), polí(óxidos de propileno) y compuestos mixtos de polí(óxido de etileno)/polí(óxido de propileno). Los compuestos polialcoxi tienen preferiblemente la fórmula: $P_rO-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2CHRO)_y-(CH_2CH_2O)_zQ$, en donde x, y y z son cada uno independientemente cero o un número entero positivo, con la condición de que al menos uno de x, y y z no es cero; R es H o un alquilo, tal como un grupo alquilo C1, C2, C3 o C4, preferiblemente un grupo metilo, P_r es un grupo de protección o un grupo marcador, y Q es un grupo que permite el acoplamiento con el oligonucleótido. Cuando x, y o z no son cero, típicamente son hasta 1000. En algunas realizaciones, x es de 3 a 1000, por ejemplo de 100 a 500, y tanto y como z son cero. En otras realizaciones, x e y son

5 cada uno independientemente de 3 a 1000, por ejemplo de 100 a 500, y z es cero. En otras realizaciones más, x y z son cada uno independientemente de 3 a 500, por ejemplo de 100 a 300, e y es de 3 a 1000, por ejemplo de 100 a 500. Preferiblemente, el compuesto polialcoxi está protegido, por ejemplo, por un grupo alquilo C1, C2, C3 o C4,

10 preferiblemente un grupo metilo. Los grupos marcadores que pueden estar representados por P_r incluyen fluoresceína y biotina o también cualquier otro grupo reactivo tal como, por ejemplo, tiol, maleimida, azida o alquino. Los compuestos polialcoxi usados se identifican normalmente por su peso molecular medio aproximado y su nombre

15 químico abreviado (por ejemplo, PEG = polí(etilenglicol); PPG = polí(propilenglicol)). El compuesto polialcoxi puede ser lineal o ramificado y habitualmente tiene un peso molecular medio de aproximadamente 0,2 kD a aproximadamente 60 kD, preferiblemente de aproximadamente 2 kD a aproximadamente 40 kD. Cuando el compuesto polialcoxi está

20 ramificado, el grupo Q que permite el acoplamiento con el oligonucleótido puede llevar dos o más restos polialcoxi. Por ejemplo, Q puede representar una lisina o un resto equivalente que lleva dos restos polialcoxi y un grupo reactivo. En una realización preferida del método de la invención, el grupo Q que permite el acoplamiento con el oligonucleótido comprende un resto ácido carboxílico. Preferiblemente, el compuesto polialcoxi es PEG.

La formación de un enlace amida entre un ácido carboxílico y una amina, realizado preferiblemente en el método de la invención entre el primer reactante que comprende un grupo carboxilo y el segundo reactante, es decir, una molécula

25 de ácido nucleico modificada con amino que comprende un grupo amino, es una reacción de condensación, que se puede lograr a 160-180°C (Jursic, B. S.; Zdravkovski, Z. *Synth. Commun.* 1993, 23, 2761-2770). Sin embargo, las altas temperaturas son incompatibles con los oligonucleótidos. Por lo tanto, los ácidos carboxílicos se activan, por

30 ejemplo, como ésteres. Los ésteres de alcoholes atractores de electrones tales como el p-nitrofenol (pNP), pentafluorofenol, N-hidroxisuccinimida (NHS), hidroxibenzotriazol (HOBt) y otros, presentan una mayor electrofiliidad en el centro carbonilo, lo que los hace susceptibles para reaccionar con una amplia variedad de nucleófilos. De acuerdo

35 con esto, se prefiere este tipo de alcoholes en realizaciones del método de la invención. Reaccionan con aminas en condiciones suaves para producir la amida deseada. Para la conjugación de ácidos polialcoxicarboxílicos con biomoléculas tales como ADN, ARN o proteínas se usan más comúnmente ésteres de N-hidroxisuccinimida (ésteres de NHS).

40 Preferiblemente, la reacción de oligonucleótidos modificados con amino con ésteres de PEG-NHS se realiza en disolventes orgánicos acuosos o soluciones que comprenden agua y un disolvente orgánico miscible con agua. Los disolventes orgánicos preferidos son apróticos, polares e incluyen, por ejemplo, DMF, DMSO, NMP o acetonaítrilo. La concentración del disolvente orgánico en soluciones que comprenden un disolvente orgánico miscible con agua puede variar de aproximadamente 10% a aproximadamente 75%. El ácido nucleico, tal como por ejemplo el oligonucleótido,

45 normalmente se usa o está presente en una solución acuosa ligeramente alcalina, lo que se aplica igualmente al segundo reactante en general. Para alcanzar el pH ligeramente alcalino se pueden usar tampones, tales como bicarbonato de sodio o borato de sodio, pero también bases aminas terciarias no nucleófilas, tales como NEt₃ o DIPEA. Preferiblemente, el pH de la solución de oligonucleótidos se ajusta de 8,5 a 9,5. Cuando se usan aminas no nucleófilas para el tamponamiento, esto se puede lograr añadiendo la base en un exceso de 2 a 5 veces frente al número total

50 de puentes fosfodiéster proporcionados por el oligonucleótido presente. El éster de PEG-NHS se usa como una solución en un disolvente orgánico miscible con agua y permanece en solución cuando se añade a la solución acuosa del oligonucleótido. Las relaciones molares del éster de PEG-NHS y del oligonucleótido pueden variar de 1:1 a 5:1 por grupo amino reactivo proporcionado por el oligonucleótido dependiendo de la escala y la reactividad. La adición del éster de PEG-NHS continúa preferiblemente hasta que se completa la reacción. La reacción puede seguirse mediante

55 todas las técnicas analíticas disponibles para el experto. En realizaciones de la invención, se aplica RP-HPLC para seguir la reacción de PEGilación. Para lograr la mejor conversión, las temperaturas pueden variar de temperatura ambiente a 45°C.

60 Los ésteres de ácido polalcoxicarboxílico-NHS antes mencionados, o más específicamente los ésteres de PEG-NHS, preferiblemente se forman previamente en una reacción separada y posteriormente se purifican y almacenan hasta su uso en el método de la invención. Los ésteres de NHS se preparan, por ejemplo, por reacción de un ácido carboxílico con NHS en presencia de un agente de condensación tal como una carbodiimida, p. ej., DCC, EDC o DIC. En la

65 química de péptidos, se dispone de una gran cantidad de agentes de condensación para la formación de enlaces amida entre ácidos carboxílicos y aminas. El grupo de agentes de condensación comprende sales de fosfonio, tales como BOP, PyBOP, PyBrop, AOP, PyAOP, BrOP y PyClOP, sales de uronio, tales como HCTU, TCTU, TBTU, HBTU,

HATU, TOTU y COMU y muchas otras (C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque *Tetrahedron*, 2005, 61, 10827-10852, Ayman El-Faham y Fernando Albericio, *Chem. Rev.*, 2011, 111, (11), 6557-6602), todos los cuales pueden usarse en realizaciones de la invención. Un agente de condensación es un reactivo que reacciona con un ácido carboxílico para formar un éster que tiene alta reactividad frente a una amina u otro nucleófilo, permitiendo así la reacción de

condensación deseada en condiciones suaves. La formación de enlaces amida en solución y la síntesis de péptidos en fase sólida se llevan a cabo en disolventes orgánicos con bajo contenido de agua tales como DMF, NMP, DMSO, ACN o CH_2Cl_2 . Sin embargo, los oligonucleótidos no son solubles en disolventes orgánicos exentos de agua.

Los autores de la presente invención también han descubierto sorprendentemente que los reactivos de condensación comunes mencionados anteriormente se pueden usar de manera muy eficiente para la activación del ácido PEGcarboxílico (PEG-COOH) en el contexto de la preparación de oligonucleótidos PEGilados, si la activación de PEG-COOH con el reactivo de condensación se lleva a cabo en un disolvente orgánico miscible con agua durante un período de 0,5 min a 60 min, preferiblemente de 1 a 20 min, a lo que le sigue la adición del PEG activado al oligonucleótido modificado con amino en agua (véanse los ejemplos 4-10). La figura 3 muestra un cromatograma típico del Spiegelmer NOX-E36 L-ARN modificado con 5'-amino bruto (5'-NH₂-NOX-E36, Tabla 1, entrada 1) antes de la PEGilación cuando se analiza por A) IEX-HPLC y C) por RP-HPLC. En las figuras 3B y 3D, respectivamente (ejemplo 9), se muestra un cromatograma típico de 5'-NH₂-NOX-E36 bruto después de la PEGilación con PEG-COOH de 40 kDa y el reactivo de condensación HBTU. En los ejemplos mostrados, el análisis de RP-HPLC indica la conversión completa si el porcentaje del área de UV del pico de producto eluido posterior es igual o ligeramente mayor que el porcentaje del contenido de producto de longitud completa del oligonucleótido modificado con 5'-amino encontrado por IEX-HPLC. Por ejemplo, el 5'-NH₂-NOX-E36 bruto usado en los ejemplos 4-10 muestra una pureza de 47% del producto de longitud completa por IEX-HPLC. El producto bruto contiene hasta 15% de especies modificadas con amino que no tienen la secuencia de nucleótidos deseada, tal como secuencias de fallo y de adición, que también son PEGilables. Por lo tanto, en este caso hasta 60% del área de UV del pico del producto por RP-HPLC puede atribuirse a conversión completa (ejemplo 5).

Se lograron resultados comparables cuando se usaron PyBOP, TBTU o COMU (ejemplos 4-7). Además, se demostró que los ácidos carboxílicos de moléculas pequeñas se acoplaban eficazmente a oligonucleótidos modificados con amino. Como se muestra en el ejemplo 11, la biotina se activó y se acopló a 5'-NH₂-NOX-A12 (Tabla 1, entrada 2) con una eficacia muy alta. El análisis de IEX-HPLC del 5'-NH₂-NOX-A12 bruto antes de la biotinilación usando HBTU para la preactivación se muestra en la figura 4A. El análisis de LC-MS y IEX-HPLC del 5'-biotina-NOX-A12 bruto resultante se muestra en las figuras 4B y 4C y verifica el peso molecular correcto y el desplazamiento en el tiempo de retención esperado para el producto biotinilado.

Además, los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que el exceso de PEG-COOH tal como PEG-COOH de 40 kDa usado para llevar hasta completarse la reacción de PEGilación se puede recuperar de la mezcla de reacción bruta ya sea por ultrafiltración (ejemplo 12) o durante la purificación por IEX (ejemplo 15) del oligonucleótido PEGilado bruto. Después de la eliminación de moléculas pequeñas contenidas en la reacción, tales como reactivo de condensación, disolventes orgánicos o sales por UF y el posterior secado (ejemplo 16), el PEG-COOH recuperado podría reusarse para la PEGilación de un oligonucleótido modificado con amino (ejemplos 18, 19 y 22). El análisis de IEX-HPLC de 5'-NH₂-NOX-A12 bruto antes de la PEGilación se muestra en la figura 5A. En la figura 5B se muestra un cromatograma de IEX típico de NOX-A12 bruto después de la PEGilación con PEG-COOH "nuevo". En la figura 5C se muestra un cromatograma de IEX típico del producto NOX-A12 PEGilado purificado resultante. El PEG-COOH de 40 kDa reciclado mostró una alta eficacia de conjugación similar en comparación con el PEG-COOH "nuevo" (ejemplos 18, 19 y 17, respectivamente). El rendimiento y la calidad del producto PEGilado eran igualmente altos para el PEG de 40 kDa "nuevo" y reciclado. Las figuras 5C y 5E muestran un análisis típico de IEX-HPLC de NOX-A12 PEGilado purificado después de PEGilación con PEG-COOH de 40 kDa "nuevo" y "reciclado", respectivamente.

La presente invención como se define en las reivindicaciones demuestra ser superior ya que usa ácidos polialcoxicarboxílicos en lugar de ésteres de NHS de ácidos polialcoxicarboxílicos para la polialcoxilación de moléculas de ácidos nucleicos modificadas con amino, tales como oligonucleótidos. El método es superior porque no requiere ninguna producción intermedia ni aislamiento de ningún éster de NHS activado del ácido polialcoxicarboxílico, reduciendo así el número de etapas de reacción generales. Además, el ácido polialcoxicarboxílico es más estable y más fácil de almacenar que los ésteres de NHS del ácido polialcoxicarboxílico sensibles a la humedad. Además, el método de la invención permite la reutilización económica de reactivos que típicamente se usan en exceso para llevar la reacción hasta completarse.

De acuerdo con esto y en una realización del método de la invención como se define en las reivindicaciones, después de completarse la etapa b) en sus diversas realizaciones, cualquier primer reactante que no ha reaccionado se separa de la reacción, preferiblemente por ultrafiltración y/o cromatografía, preferiblemente cromatografía de intercambio iónico. Dependiendo de la naturaleza del exceso del primer reactante, el material que no ha reaccionado, es decir, el primer reactante que no ha reaccionado, puede separarse de la molécula de ácido nucleico y más específicamente de la molécula de ácido nucleico modificada por ultrafiltración (UF) o cromatografía, preferiblemente de la molécula de ácido nucleico modificada deseada. La UF es el método de elección cuando hay una diferencia suficientemente grande en el volumen hidrodinámico, relacionado con el peso molecular, entre el primer reactante y la molécula de ácido nucleico modificada y sin modificar. Alternativamente, podría usarse cromatografía de intercambio iónico (IEX HPLC) o de fase inversa (RP-HPLC) en caso de diferencias de carga o lipofilicidad entre el primer reactante y la molécula de ácido nucleico modificada y no modificada. En el caso de primeros reactantes no cargados (neutros), tales como compuestos polialcoxi, esteroides, carbohidratos y ácidos grasos, la IEX-HPLC es el método de elección, ya que la resina tiene una afinidad más débil por el primer reactante que por el ácido nucleico. En el caso de péptidos proteínas

o glicoproteínas anfifílicos, podrían emplearse IEX-HPLC o RP-HPLC.

Está dentro de la presente invención como se define en las reivindicaciones que un ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico. En los referente a las expresiones ácido nucleico y molécula de ácido nucleico, se usan en el presente documento como sinónimos a menos que se indique lo contrario. Además, dicho(s) ácido(s) nucleico(s)

5 también se denomina(n) preferiblemente en el presente documento la(s) molécula(s) de ácido nucleico según la presente invención, el(los) ácido(s) nucleico(s) según la presente invención, el(los) ácido(s) nucleico(s) de la invención o la(s) molécula(s) de ácido nucleico de la invención. Además, está dentro de la presente invención que un ácido nucleico es un oligonucleótido. A la luz de lo anterior, se debe reconocer que la descripción de la presente solicitud en la medida en que se refiere a un oligonucleótido, se aplica igualmente a cualquier ácido nucleico, y viceversa, siempre 10 que no se indique explícitamente lo contrario. Además, cualquier discurso presentado en el presente documento relacionado con el uso de un oligonucleótido en el método de la invención se aplica igualmente al primer reactante y su uso en el método de la invención.

La presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico modificada obtenida por un método de la presente invención.

15 Además, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico modificada obtenida por un método de la invención, para usar en terapia. Dicho uso en terapia comprende la administración de la molécula de ácido nucleico modificada a un sujeto que la necesite. Dicho sujeto es preferiblemente un ser humano que padece una enfermedad o está en riesgo de padecer una enfermedad. En dicho uso, la molécula de ácido nucleico modificada es capaz de tratar dicha enfermedad o prevenir dicha enfermedad.

20 Además, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico modificada obtenida mediante un método de la invención, para usar en diagnóstico. Dicho diagnóstico puede ser un diagnóstico *in vivo* o un diagnóstico *in vitro*. En caso de diagnóstico *in vivo*, la molécula de ácido nucleico modificada se administra a un sujeto que va a ser diagnosticado. Dicho sujeto es preferiblemente un ser humano que padece una enfermedad, está en riesgo de padecer 25 una enfermedad o se sospecha que padece o está desarrollando dicha enfermedad. En dicho uso, la molécula de ácido nucleico modificada es capaz de unirse a un biomarcador asociado con una enfermedad.

Finalmente, la presente descripción se refiere en otro aspecto al uso de una molécula de ácido nucleico modificada obtenida por un método de la invención en un método *in vitro* para analizar una muestra. Dicho análisis de la muestra tiene como objetivo detectar la presencia o ausencia de un analito. Para tal uso, la molécula de ácido nucleico es capaz de unirse al analito.

30 Será reconocido por un experto en la técnica. Que las aplicaciones analíticas y de diagnóstico de la molécula de ácido nucleico modificada obtenida por el método de la invención pueden abarcar métodos de hibridación *in vitro* o *in vivo* de ácidos nucleicos, o unión *in vitro* o *in vivo* del ácido nucleico a la molécula diana en el caso de aptámeros, y detección del ácido nucleico hibrido o unido por medio de radiactividad, absorbancia o emisividad de luz.

35 Las aplicaciones sintéticas incluyen el uso de ácidos nucleicos en catálisis asimétrica, bibliotecas codificadas de ácidos nucleicos y cromatografía de afinidad.

Los expertos en la técnica reconocerán que el ácido nucleico según la invención consiste preferiblemente en nucleótidos que están unidos covalentemente entre sí, preferiblemente a través de enlaces o conexiones fosfodiéster. Otros enlaces o conexiones presentes en una molécula de ácido nucleico como objeto de la presente invención son enlaces y conexiones fosfotioato, respectivamente, y enlaces y conexiones fosfoamidato, respectivamente.

40 Se debe reconocer que las expresiones agente de condensación y agente condensante se usan en el presente documento como sinónimos.

Se debe reconocer que las expresiones "de la invención" y "de la presente invención" se usan en el presente documento como sinónimos.

Se debe reconocer que cualquier porcentaje indicado en el presente documento es en volumen/volumen (v/v).

45 La presente invención se ilustra con más detalle mediante la tabla, las figuras y los ejemplos de los que se pueden extraer características, realizaciones y ventajas adicionales, en donde

La fig. 1 muestra un dibujo esquemático de un método según la presente invención como se define en las reivindicaciones;

La fig. 2 muestra reactivos que permiten la introducción de grupos amino reactivos en los ácidos nucleicos;

50 La fig. 3 A muestra el análisis de IEX-HPLC del producto de síntesis bruto típico de 5'NH₂-NOX-E36 antes de PEGilación;

La fig. 3 B muestra el análisis de IEX-HPLC del producto de síntesis bruto típico de 5'NH₂-NOX-E36 después de PEGilación;

- La fig. 3 C muestra el análisis de RP-HPLC del producto de síntesis bruto típico de 5'NH₂-NOX-E36 antes de PEGilación;
- La fig. 3 D muestra el análisis de RP-HPLC del producto de síntesis bruto típico de 5'NH₂-NOX-E36 después de PEGilación;
- 5 La fig. 4 A muestra el análisis de IEX-HPLC del producto de síntesis bruto típico de 5'NH₂-NOX-A12 antes de la conjugación;
- La fig. 4 B muestra el análisis de LCMS del producto de síntesis bruto típico de 5'NH₂-NOX-A12 después de la conjugación con biotina;
- 10 La fig. 4 C muestra el análisis de IEX-HPLC del producto de síntesis bruto típico de 5'NH₂-NOX-A12 después de la conjugación con biotina;
- La fig. 5 A muestra el análisis de IEX-HPLC del producto de síntesis bruto típico de 5'NH₂-NOX-A12 antes de la PEGilación;
- La fig. 5 B muestra el análisis de IEX-HPLC del producto bruto típico de 5'NH₂-NOX-A12 después de PEGilación con PEG "nuevo";
- 15 La fig. 5 C muestra el análisis de IEX del producto purificado típico de 5'NH₂-NOX-A12 después de PEGilación con PEG "nuevo";
- La fig. 5 D muestra el análisis de IEX-HPLC del producto bruto típico de 5'NH₂-NOX-A12 después de PEGilación con PEG "reciclado"; y
- 20 La fig. 5 E muestra el análisis de IEX del producto purificado típico de 5'NH₂-NOX-A12 después de PEGilación con PEG "reciclado".

Tabla 1: Secuencias de écidos nucleicos usadas para demostrar el método según la presente invención como se define en las reivindicaciones

Tabla 1

Nº	Secuencia	Longitud	Tipo	Modificación	Nombre
1	5'-G-C-A-C-G-U-C-C-C-U-C-A-C-C-G-U-C-A-G-U-G-A-A-G-A-C- U-C-G-U-U-G-G-C-C-U-G-C-C-G-3'	40 nt	L-ARN	5' PEG 40 kDa por connector aminohexilo	NOX-E36
2	5'-G-C-G-U-G-G-G-U-G-A-U-U-C-U-A-G-A-B-G-A-B-G-U-U-U-G-I-G-C- U-U-G-I-A-U-U-U-C-U-U-A-G-U-U-C-A-G-U-U-A-I-C-G-C-3'	45 nt	L-ARN	5' PEG 40 kDa por connector aminohexilo	NOX-A12

Ejemplo 1: Síntesis de ARN

Los Spiegelmers de ARN se produjeron por síntesis en fase sólida usando un sintetizador ÄktaPilot100 (GE Healthcare, Friburgo) en una columna de volumen fijo de 48 ml usando química de fosforamidita de ARN 2'-TBDMS (Damha y Ogilvie, *Methods in Molecular Biology*, 1993, 81-114, The Humana Press Inc., Totowa, Nueva Jersey). L-rA(N-Bz)-, L-rC(Ac)-, L-rG(N-ibu)- y L-rU-fosforamiditas se adquirieron de ChemGenes (Wilmington, MA, EE. UU.). El modificador amino 5' amC6 se adquirió de ChemGenes (Wilmington, MA, EE. UU.). La síntesis del Spiegelmer modificado con amino se inició en CPG modificado con L-riboG o L-riboC con tamaño de poro de 600 Å (Prime Synthesis, Aston, PA, EE. UU.). Como alternativa, se podría haber usado un tamaño de poro de CPG modificado con 3'amino(TFA) de 1000 Å (ChemGenes, Wilmington, MA, EE. UU.). Para el acoplamiento (12 min por ciclo), se usaron etiltiotetrazol 0,6 M (Azide Chemical Co., Ltd, Anzhen, Wuxi, CN) en acetonitrilo y 1,5-4 equivalentes de la respectiva solución de fosforamidita 0,2 M en acetonitrilo. Se usó un ciclo de protección-oxidación. Los disolventes y reactivos estándar para la síntesis de oligonucleótidos se adquirieron en Biosolve (Valkenswaard, NL), Proligo (Hamburgo, D), VWR (Karlsruhe, D) o Sigma Aldrich (Taufkirchen, D). Los Spiegelmers se sintetizaron con 5'-MMT-ON. La escisión y la desprotección se lograron de acuerdo con Wincott et al. (Wincott, *Nucleic Acids Research* 1995, 23(14), 2677-2684) con alteraciones menores. En detalle, tras completarse la síntesis automatizada, el oligonucleótido unido a CPG (700 µmol) se secó brevemente y se transfirió a un frasco de vidrio. Se añadieron 200 ml de MeNH₂ ac. (40%) y la suspensión se agitó suavemente a temperatura ambiente. Después de 90 min la suspensión se filtró y el CPG residual se lavó varias veces con EtOH ac. (50%). Los filtrados combinados se concentraron y finalmente se liofilizaron hasta sequedad. Para la eliminación de los grupos 2'-TBDMS, el producto bruto seco se disolvió en 120 ml de DMSO seguido de 60 ml de NEt₃ y 80 ml de NEt₃-3HF. Esta mezcla se agitó suavemente a 65°C durante 2 h. Después de escisión de los grupos 2'-TBDMS, la reacción se inactivó por adición de 1 L de agua helada. La eliminación del grupo MMT fue asistida por la adición de ácido acético (25 ml). Posteriormente, el Spiegelmer se desalinizó por filtración de flujo tangencial usando una membrana de celulosa regenerada de 2 kDa (Sartorius, Gottingen, D). Para el intercambio de sal se añadieron 3 L de solución de NaCl 0,25 M y la solución se desalinizó por filtración de flujo tangencial. Finalmente, el producto se recogió y se secó por liofilización.

Ejemplo 2: Síntesis de 5'NH₂-NOX-E36 (**1** prePEG)

Aplicando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se usaron 10,2 g de L-rG CPG (600 Å, 70 µmol/g, 711 µmol) para ensamblar 5'NH₂-NOX-E36 (**1** prePEG) con 2 eq. de amidita por ciclo de acoplamiento de nucleótidos. Rendimiento después de UF: 150.732 OD, Pureza: 47%, Masa: 12.997 Da (encontrado), 12.996 Da (calc).

Ejemplo 3: Síntesis de 5' NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG)

Aplicando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se usaron 1,7 g de L-rC CPG (600 Å, 72 µmol/g, 123 µmol) para ensamblar 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG) con 2,5 eq. de amidita por ciclo de acoplamiento de nucleótidos. Rendimiento después de UF: 23.985 OD, Pureza: 52%, Masa: 14.656 Da (encontrado), 14.656 Da (calc).

Ejemplo 4: PEGilación de 5' NH₂-NOX-E36 usando PyBOP para activación y DMF como codisolvente

A una solución de 1000 OD (40 mg, 1,54 µmol) de 5'NH₂-NOX-E36 (**1** prePEG) en 1 ml de agua se añadió una solución de 193 mg (600 µmol) de Bu₄NBr en 750 ml de DMF seguido de 69 µl (52 mg, 405 µmol) de DIPEA. En otro recipiente de reacción se disolvieron 92 mg (2,31 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 2,5 ml de DMF. A la solución de PEG se le añadieron 1,8 mg (3,5 µmol) de PyBOP en 60 µl de DMF, seguido de 6,0 µl (4,6 mg, 35 µmol) de DIPEA. Después, la solución de PEG se agitó completamente con agitador vortacial y se añadió a la solución de oligonucleótidos después de 2 minutos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 52% de conversión.

Ejemplo 5: PEGilación de 5' NH₂-NOX-E36 usando PyBOP para activación y DMSO como codisolvente

A una solución de 1000 OD (40 mg, 1,54 µmol) de 5'NH₂-NOX-E36 (**1** prePEG) en 1 ml de agua se añadió una solución de 193 mg (600 µmol) de Bu₄NBr en 2 ml de DMSO seguido de 69 µl (52 mg, 405 µmol) de DIPEA. En otro recipiente de reacción se disolvieron 92 mg (2,31 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 0,5 ml de ACN. A la solución de PEG se le añadieron 1,8 mg (3,5 µmol) de PyBOP en 60 µl de ACN seguido de 6,0 µl (4,6 mg, 35 µmol) de DIPEA. Después, la solución de PEG se agitó completamente con agitador vortacial y se añadió a la solución de oligonucleótidos después de 2 minutos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 60% de conversión.

Ejemplo 6: PEGilación de 5'NH₂-NOX-E36 usando TBTU para activación

A una solución de 1000 OD (40 mg, 1,54) de 5'NH₂-NOX-E36 (**1** prePEG) en 1 ml de agua se añadió una solución de 193 mg (600 µmol) de Bu₄NBr en 2 ml de DMSO seguido de 69 µl (52 mg, 405 µmol) de DIPEA. En otro recipiente de reacción, se disolvieron 92 mg (2,31 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 0,5 ml de ACN. A la solución de PEG se le añadieron 1,1 mg (3,5 µmol) de TBTU en 60 µl de ACN seguido de 6,0 µl (4,6 mg, 35 µmol) de DIPEA. Luego, la solución de PEG se agitó completamente con agitador vortacial y se añadió a la solución de oligonucleótidos después de 2 minutos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 59% de conversión.

Ejemplo 7: PEGilación de 5'NH₂-NOX-E36 usando COMU para activación

A una solución de 1000 OD (40 mg, 1,54 µmol) 5'NH₂-NOX-E36 (**1** prePEG) en 1 ml de agua se añadió una solución de 193 mg (600 µmol) de Bu₄NBr en 2 ml de DMSO seguido de 69 µl (52 mg, 405 µmol) de DIPEA. En otro recipiente de reacción, se disolvieron 92 mg (2,31 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 0,5 ml de ACN. A la solución de PEG se le añadieron 1,5 mg (3,5 µmol) de COMU en 60 µl de ACN seguido de 6,0 µl (4,6 mg, 35 µmol) de DIPEA. Después la solución de PEG se agitó completamente con agitador vortical durante 2 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 45% de conversión.

Ejemplo 8: PEGilación de 5'NH₂-NOX-E36 en presencia de Bu₄NBr usando HBTU para la activación

A una solución de 1000 OD (40 mg, 1,54 µmol) de 5'NH₂-NOX-E36 (**1** prePEG) en 1 ml de agua se añadió una solución de 193 mg (600 µmol) de Bu₄NBr en 2 ml de DMSO seguido de 69 µl (52 mg, 405 µmol) de DIPEA. En otro recipiente de reacción, se disolvieron 92 mg (2,31 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 0,5 ml de ACN. A la solución de PEG se le añadieron 1,3 mg (3,5 µmol) de HBTU en 7,5 µl de ACN seguido de 6,0 µl (4,6 mg, 35 µmol) de DIPEA. Después la solución de PEG se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 42% de conversión.

Ejemplo 9: PEGilación de 5'NH₂-NOX-E36 sin Bu₄NBr usando HBTU para la activación

A una solución de 6000 OD (240 mg, 9,23 µmol) de 5'NH₂-NOX-E36 (**1** prePEG) en 6 ml de agua se le añadieron 12 ml de DMSO seguido de 414 µl (307 mg, 2,38 mmol) de DIPEA. En otro recipiente de reacción se disolvieron 554 mg (13,8 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 2,5 ml de ACN. A la solución de PEG se le añadieron 7,85 mg (20,7 µmol) de HBTU en 100 µl de ACN seguido de 36,0 µl (26,8 mg, 207 µmol) de DIPEA. Después la solución de PEG se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 45,5% de conversión.

Ejemplo 10: PEGilación de 5'NH₂-NOX-A12 sin Bu₄NBr usando HBTU para la activación

A una solución de 15.966 OD (638 mg, 19,6 µmol, 50% de FLP) de 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG) en 16 ml de agua se le añadieron 32 ml de DMSO seguido de 1,12 ml de DIPEA. En otro recipiente de reacción, se disolvieron 1,97 g (49,3 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 8 ml de ACN. A la solución de PEG se añadieron 19,9 mg (52,5 µmol) de HBTU en 200 µl de ACN seguido de 83 µl de DIPEA. Después la solución de PEG se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 58% de conversión.

Ejemplo 11: Biotinilación de 5'NH₂-NOX-A12 usando HBTU para la activación

A una solución de 200 OD (8 mg, 0,237 µmol, 50% de FLP) 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG) en 200 µl de agua se le añadieron 400 µl de DMSO seguido de 12,5 ml de DIPEA. En otro recipiente de reacción se disolvieron 0,167 mg (0,683 µmol) de biotina en 90 µl de DMSO. A la solución de biotina se le añadieron 0,259 mg (0,683 µmol) de HBTU en 10 µl de ACN seguido de 1,8 µl de DIPEA. Después, la solución de biotina se agitó completamente con agitador vortical durante 1 minuto y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 55% de conversión. El producto bruto se precipitó por adición de 20 µl de solución de acetato de sodio 3 M y 10 ml de EtOH y se almacenó a -20°C durante 2 h. El precipitado se recogió por centrifugación (4000 g) y decantación. El sedimento se disolvió en agua y se desalinizó por cromatografía de exclusión por tamaño para producir 159 OD (6,4 mg, 0,192 µmol) de NOX-A12 biotinilado con 45% de pureza por IEX-HPLC, MS: 14.883 Da (calc.), 14.883 Da (encontrado).

Ejemplo 12: Reciclado por UF del exceso de PEG-COOH de 40 kDa después de la pegilación de 5'NH₂-NOX-A12

Una parte alícuota de 7983 OD del producto de PEGilación de NOX-A12 bruto preparado según el ejemplo 10 se sometió a ultrafiltración de flujo tangencial (UF) usando una membrana de celulosa regenerada con corte de exclusión de peso molecular (MWCO) de 30 kDa (Sartorius, Göttingen, D). La presión de la bomba se ajustó a 1 bar y se usaron 10 litros de agua como alimentación. El retenido se recogió y se liofilizó para dar 0,87 g (7264 OD) de un sólido incoloro. Posteriormente, el filtrado se concentró y se desalinizó por filtración de flujo tangencial usando una membrana de celulosa regenerada de corte de exclusión de 2 kDa (Sartorius, Göttingen, D). La presión de la bomba se ajustó a 1 bar y se usó agua como alimentación. El método se continuó hasta que el filtrado mostró una conductividad inferior a 20 µS/cm. El retenido se recogió y se liofilizó para dar 0,51 g de PEG-COOH de 40 kDa como un sólido incoloro.

Ejemplo 13: Ultrafiltración de la mezcla de PEGilación de NOX-A12 bruta

Otra parte alícuota de 7983 OD del producto de PEGilación de NOX-A12 bruto preparado según el ejemplo 10 se sometió a ultrafiltración de flujo tangencial (UF) usando una membrana de celulosa regenerada de MWCO de 2 kDa (Sartorius, Göttingen, D). La presión de la bomba se ajustó a 1 bar y se usaron 10 L de agua como alimentación. El retenido se recogió y se liofilizó para dar 1,38 g (7829 OD) de un sólido incoloro.

5 Ejemplo 14: Purificación por IEX-HPLC y posterior UF de NOX-A12 PEGilado

El producto NOX-A12 bruto de 0,87 g (7264 OD) obtenido en el ejemplo 12 se purificó más por cromatografía de IEX-HPLC. Se cargó una solución acuosa de una muestra de 6000 OD en una columna de IEX-HPLC TOSOH Super Q5PW de 12 ml (resina 500 OD/ml, 50°C) y se eluyó a 50°C aplicando un gradiente del siguiente sistema tampón (tampón A: Na₂HPO₄ 25 mM, pH 7,5, ACN al 10%; tampón B: Na₂HPO₄ 25 mM, NaBr 1 M, pH 7,5, ACN al 10%; gradiente: 5% de B a 35% de B en 25 CV). Todas las fracciones que contenían producto (>75% de FLP por IEX-HPLC) se combinaron (842 OD), se desalinizaron por UF usando una membrana de celulosa regenerada de MWCO de 5 kDa (Millipore, Bedford, MA) y finalmente se liofilizaron. Rendimiento: 801 OD, 76% de FLP.

Ejemplo 15: IEX-HPLC-Reciclado del exceso de PEG-COOH de 40 kDa después de la PEGilación de 5'NH₂-NOX-A12

15 El producto NOX-A12 bruto (1,38 g, 7829 OD) obtenido en el ejemplo 13 se purificó más por cromatografía de IEX-HPLC. Una solución acuosa de una muestra de 6000 OD se cargó en una columna de IEX-HPLC TOSOH Super Q5PW de 12 ml (resina 500 OD/ml, 50°C) y se eluyó a 50°C aplicando un gradiente del siguiente sistema tampón (tampón A : Na₂HPO₄ 25 mM, pH 7,5, ACN al 10%; tampón B: Na₂HPO₄ 25 mM, NaBr 1 M, pH 7,5, ACN al 10%; gradiente: 5% de B a 35% de B en 25 CV). Durante la carga y el lavado posterior a la carga con 2CV, se recogió el flujo, se desalinizó mediante una membrana de celulosa regenerada con MWCO de 2 kDa (Sartorius, Göttingen, D) y se liofilizó para dar 410 mg de un sólido incoloro de PEG-COOH de 40 kDa. Todas las fracciones que contenían producto (>7% de FLP por IEX-HPLC) se combinaron (1004 OD), se desalinizaron por UF usando una membrana de celulosa regenerada de MWCO de 5 kDa (Millipore, Bedford, MA) y finalmente se liofilizaron. Rendimiento: 1042 OD, 76% de FLP.

Ejemplo 16: Secado de PEG-COOH de 40 kDa reciclado para uso posterior en la PEGilación de 5'NH₂-NOX-A12

25 El PEG-COOH de 40 kDa recuperado por cromatografía de IEX-HPLC o filtración de flujo tangencial como se ilustra en los ejemplos 12 y 15 se disolvió en acetona (20 ml/g) y se almacenó sobre almohadillas de secado de tamices moleculares durante la noche para eliminar el agua residual. Se eliminó el tamiz molecular y la solución de PEG se concentró a presión reducida.

Ejemplo 17: PEGilación de 5'NH₂-NOX-A12 usando PEG-COOH de 40 kDa "nuevo" y HBTU para activación

30 A una solución de 100 OD (4 mg, 0,14 µmol, 50% de FLP) de 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG) en 100 µl de agua se añadieron 200 µl de DMSO seguido de 7,5 ml de DIPEA. En otro recipiente de reacción se disolvieron 13,7 mg (0,34 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa "nuevo" (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 60 µl de ACN. A la solución de PEG-COOH se le añadieron 0,13 mg (0,34 µmol) de HBTU en 10 µl de ACN seguido de 0,6 µl de DIPEA. La solución de PEG se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 43% de conversión.

Ejemplo 18: PEGilación de 5'NH₂-NOX-A12 usando PEG-COOH de 40 kDa "recuperado por UF" y HBTU para activación

40 A una solución de 100 OD (4 mg, 0,14 µmol, 50% de FLP) 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG) en 100 µl de agua se le añadieron 200 µl de DMSO seguido de 7,5 ml de DIPEA. En otro recipiente de reacción se disolvieron 13,7 mg (0,34 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa "recuperado por UF" y secado (obtenido como en los ejemplos 12 y 16) en 60 µl de ACN. A la solución de PEG se le añadieron 0,13 mg (0,340 µmol) de HBTU en 10 µl de ACN seguido de 0,6 µl de DIPEA. La solución de PEG-COOH se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 48% de conversión.

Ejemplo 19: PEGilación de 5'NH₂-NOX-A12 usando PEG-COOH de 40 kDa "recuperado por IEX-HPLC" y HBTU para activación

50 A una solución de 100 OD (4 mg, 0,14 µmol, 50% de FLP) de 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG) en 100 µl de agua se le añadieron 200 µl de DMSO seguido de 7,5 ml de DIPEA. En otro recipiente de reacción se disolvieron 13,7 mg (0,34 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa "recuperado por IEX-HPLC" y secado (obtenido como en los ejemplos 15 y 16) en 60 µl de ACN. A la solución de PEG se le añadieron 0,13 mg (0,34 µmol) de HBTU en 10 µl de ACN seguido de 0,6 µl de DIPEA. La solución de PEG-COOH se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 47% de conversión.

Ejemplo 20: Síntesis en fase sólida de 5'NH₂-NOX-A12

Aplicando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se usaron 1,70 g de L-rC CPG (600 Å, 72 µmol/g, 122 µmol) para ensamblar 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG) con 2,5 eq. de amidita por ciclo de acoplamiento de nucleótidos. Rendimiento después de la desprotección y UF: 23.378 OD, Pureza: 49%, Masa: 14.656 Da (encontrado), 14.656 Da (calc).

- 5 Ejemplo 21: PEGilación de 5'NH₂-NOX-A12 con PEG-COOH de 40 kDa "nuevo" y subsiguiente procesamiento posterior para producir NOX-A12

A una solución de 6000 OD (240 mg, 7,86 µmol, 48% de FLP) de 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG, sintetizada según el ejemplo 20 en 6 ml de agua, se le añadieron 12 ml de DMSO seguido de 0,42 ml de DIPEA. En otro recipiente de reacción se disolvieron 628 mg (15,7 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 2,55 ml de ACN. A la solución de PEG se añadieron 5,96 mg (15,7 µmol) de HBTU en 50 µl de ACN seguido de 40 µl de DIPEA. La solución de PEG se agitó completamente durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 39% de conversión. Se preparó una parte alícuota adicional de 0,5 eq de PEG-COOH disolviendo 157 mg (1,97 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa (JenKem Technology, Allen, TX, EE. UU.) en 0,7 ml de ACN. A la solución de PEG se añadieron 1,49 mg (1,97 µmol) de HBTU en 12,5 µl de ACN seguido de 10 µl de DIPEA. La solución de PEG se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. La reanudación del seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 52% de conversión. Otra adición de 0,5 eq de PEG-COOH activado condujo a 58% de conversión después de 30 minutos adicionales. La reacción se detuvo por dilución en 500 ml de agua y se sometió a filtración de flujo tangencial usando una membrana de celulosa regenerada MWCO de 30 kDa (Sartorius, Göttingen, D). La presión de la bomba se ajustó a 1 bar y se usaron 20 L de agua como alimentación. El retenido se recogió para dar 5581 OD. El producto NOX-A12 bruto se purificó más por cromatografía de IEX-HPLC. El producto se cargó en una columna de IEX-HPLC TOSOH Super Q5PW de 12 ml (resina de 500 OD/ml, 50°C) y se eluyó a 50°C aplicando un gradiente del siguiente sistema tampón (tampón A: Tris 25 mM, pH 7,5, ACN al 10%; tampón B: Tris 25 mM, NaCl 2 M, pH 7,5, ACN al 10%; gradiente: 5% de B a 35% de B en 25 CV). Todas las fracciones que contenían producto (>75 % de FLP por IEX-HPLC) se combinaron, se desalinizaron por UF usando una membrana de celulosa regenerada de MWCO de 2 kDa (Millipore, Bedford, MA) y finalmente se liofilizaron. Rendimiento: 1474 OD, 75% de FLP.

Ejemplo 22: PEGilación de 5'NH₂-NOX-A12 con PEG-COOH de 40 kDa "recuperado por IEX-HPLC" y subsiguiente procesamiento posterior para producir NOX-A12

30 A una solución de 6000 OD (240 mg, 7,86 µmol, 48% de FLP) 5'NH₂-NOX-A12 (**2** prePEG, sintetizado según el ejemplo 20) en 6 ml de agua, se añadieron 12 ml de DMSO seguido de 0,42 ml de DIPEA. En otro recipiente de reacción, se disolvieron 628 mg (15,7 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa "recuperado por IEX-HPLC" y secado (obtenido como en los ejemplos 15 y 16) en 2,55 ml de ACN. A la solución de PEG se le añadieron 5,96 mg (15,7 µmol) de HBTU en 50 µl de ACN seguido de 40 µl de DIPEA. La solución de PEG se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos antes de añadirla a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 29% de conversión. Una parte alícuota adicional de 0,5 eq. de PEG-COOH se preparó disolviendo 157 mg (1,97 µmol) de PEG-COOH de 40 kDa "recuperado por IEX" y secado en 0,7 ml de ACN. A la solución de PEG se añadieron 1,49 mg (1,97 µmol) de HBTU en 12,5 µl de ACN seguido de 10 µl de DIPEA. La solución de PEG se agitó completamente con agitador vortical durante 5 minutos y se añadió a la solución de oligonucleótidos. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 30 minutos. La reanudación del seguimiento de la reacción por RP-HPLC mostró 37% de conversión. Una segunda y tercera adiciones de 0,5 eq de PEG-COOH "recuperado por IEX" activado y secado condujo a una conversión de 45% y 52% después de 30 minutos adicionales. La reacción se detuvo por dilución en 500 ml de agua y se sometió a filtración de flujo tangencial usando una membrana de celulosa regenerada de MWCO de 30 kDa (Sartorius, Göttingen, D). La presión de la bomba se ajustó a 1 bar y se usaron 20 L de agua como alimentación. El retenido se recogió y se liofilizó para dar 5711 OD. El producto NOX-A12 bruto se purificó más por cromatografía de IEX-HPLC. El producto se cargó en una columna de IEX-HPLC TOSOH Super Q5PW de 12 ml (resina de 500 OD/ml, 50°C) y se eluyó a 50°C aplicando un gradiente del siguiente sistema tampón (tampón A: Tris 25 mM, pH 7,5, ACN al 10%; tampón B: Tris 25 mM, NaCl 2 M, pH 7,5, ACN al 10%; gradiente: 5% de B a 35% de B en 25 CV). Todas las fracciones que contenían producto (>75% de FLP por IEX-HPLC) se combinaron, se desalinizaron por UF usando una membrana de celulosa regenerada de MWCO de 2 kDa (Millipore, Bedford, MA) y finalmente se liofilizaron. Rendimiento: 1242 OD, 70% de FLP.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de una molécula de ácido nucleico modificada que comprende un resto de ácido nucleico y un resto no ácido nucleico haciendo reaccionar un primer reactante y un segundo reactante, en donde el primer reactante comprende el resto no ácido nucleico y un grupo carboxilo, y en donde el segundo reactante es una molécula de ácido nucleico modificada con amino que comprende el resto de ácido nucleico y una modificación amino que comprende un grupo amino que está unido al resto de ácido nucleico, en donde el método comprende las siguientes etapas:
- 5 a) activar el grupo carboxilo del primer reactante mediante un reactivo de condensación y una base no nucleófila en un disolvente orgánico miscible con agua, y
- 10 b) hacer reaccionar el grupo carboxilo activado del primer reactante de la etapa a) y el grupo amino de la modificación amino de la molécula de ácido nucleico modificada con amino que se ha disuelto en agua o una mezcla de un disolvente orgánico miscible con agua y agua, mediante lo cual se forma la molécula de ácido nucleico modificada, en donde
- 15 el primer reactante y/o el resto no ácido nucleico es un compuesto polialcoxi,
- 15 el agente de condensación se selecciona del grupo que consiste en
- 20 a) una sal de fosfonio seleccionada del grupo que consiste en BOP, PyBOP, PyBrop, AOP, PyAOP, BrOP y PyClOP,
- 20 b) una sal de uronio seleccionada del grupo que consiste en HCTU, TCTU, TBTU, HBTU, HATU, TOTU y COMU, y
- 25 c) una carbodiimida seleccionada del grupo que consiste en DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida), y
- 25 el disolvente orgánico miscible con agua se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, sec-butanol, terc-butanol, dimetilsulfóxido, dietilsulfóxido, metiletilsulfóxido, formamida, metilformamida, dimetilformamida, etilformamida, etilmethylformamida, dietilformamida, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidona, N-etylpirrolidona, acetonitrilo, acetona, etil metil cetona, metil propil cetona, dietil cetona, metil isopropil cetona, formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de isopropilo, acetato de metilo, acetato de etilo, propanoato de metilo, tetrahidrofurano y dioxano, preferiblemente dimetilformamida, acetonitrilo y dimetilsulfóxido.
- 30 2. El método según la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico modificada con amino se disuelve en una mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible con agua en presencia de una sal de amonio cuaternario y/o en donde el primer reactante activado de la etapa a) se añade a la molécula de ácido nucleico modificada con amino disuelta en agua o en una mezcla de un disolvente orgánico miscible con agua y agua, en donde el disolvente orgánico miscible con agua se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, sec-butanol, terc-butanol, dimetilsulfóxido, dietilsulfóxido, metiletilsulfóxido, formamida, metilformamida, dimetilformamida, etilformamida, etilmethylformamida, dietilformamida, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidona, N-etylpirrolidona, acetonitrilo, acetona, etil metil cetona, metil propil cetona, dietil cetona, metil isopropil cetona, formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de isopropilo, acetato de metilo, acetato de etilo, propanoato de metilo, tetrahidrofurano y dioxano, preferiblemente dimetilformamida, acetonitrilo y dimetilsulfóxido.
- 35 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la molécula de ácido nucleico modificada con amino se selecciona del grupo que comprende aptámeros modificados con amino, Spiegelmers modificados con amino, ácidos nucleicos inmunoestimuladores modificados con amino, ARNip modificado con amino, moléculas de miARN modificadas con amino y moléculas de ácido nucleico antisentido modificadas con amino, preferiblemente los aptámeros son aptámeros que consisten en nucleótidos L y/o D.
- 40 45 y/o en donde el resto de ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende aptámeros, Spiegelmers, ácidos nucleicos inmunoestimuladores, ARNip, moléculas de miARN y moléculas de ácido nucleico antisentido, preferiblemente los aptámeros son aptámeros que consisten en nucleótidos L y/o D.
- 50 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde en la etapa b) se usa un exceso de moléculas del primer reactante activado frente a las moléculas de ácido nucleico modificadas con amino, preferiblemente el exceso se expresa como una relación molar de moléculas del primer reactante activado y las moléculas de ácido nucleico modificadas con amino, en donde la relación molar es de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5.
- 55 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde para activar el primer reactante según la etapa a) el primer reactante se disuelve en el disolvente org formamida, dietilformamida, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidona, N-etylpirrolidona, acetonitrilo, acetona, etil metil cetona, metil propil cetona, dietil cetona, metil isopropil cetona, formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de isopropilo, acetato de metilo, acetato de etilo, propanoato de metilo, tetrahidrofurano y dioxano, preferiblemente dimetilformamida, acetonitrilo y dimetilsulfóxido.

condensación y la base, preferiblemente primero el agente de condensación y posteriormente la base, en donde el agente de condensación se disuelve en el disolvente orgánico miscible con agua.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la base se selecciona del grupo que consiste en diisopropiletilamina (DIPEA), trimetilamina y DBU, preferiblemente la base es diisopropiletilamina (DIPEA).

5 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el agente de condensación se selecciona del grupo que consiste en PyBOP, TBTU, COMU y HBTU, preferiblemente el agente de condensación es HBTU.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde después de completarse la etapa b) cualquier primer reactante que no ha reaccionado se separa de la reacción por ultrafiltración y/o cromatografía, preferiblemente por cromatografía de intercambio iónico.

10 9. El método según la reivindicación 8, en donde el primer reactante separado se recicla y se usa en la etapa a).

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto polialcoxi es un compuesto polialcoxi lineal o ramificado.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el compuesto polialcoxi se selecciona del grupo que comprende polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol y poliglicerol.

15 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el compuesto polialcoxi tiene un peso molecular de 5.000 Da a 100.000 Da, preferiblemente de 20.000 Da a 80.000 Da, más preferiblemente 40.000 Da.

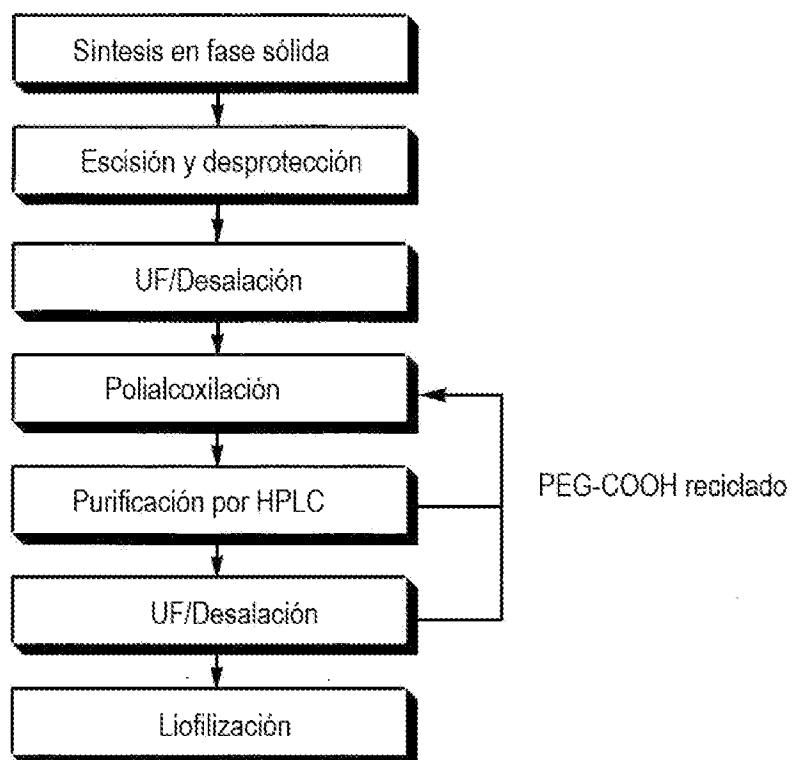


Figura 1

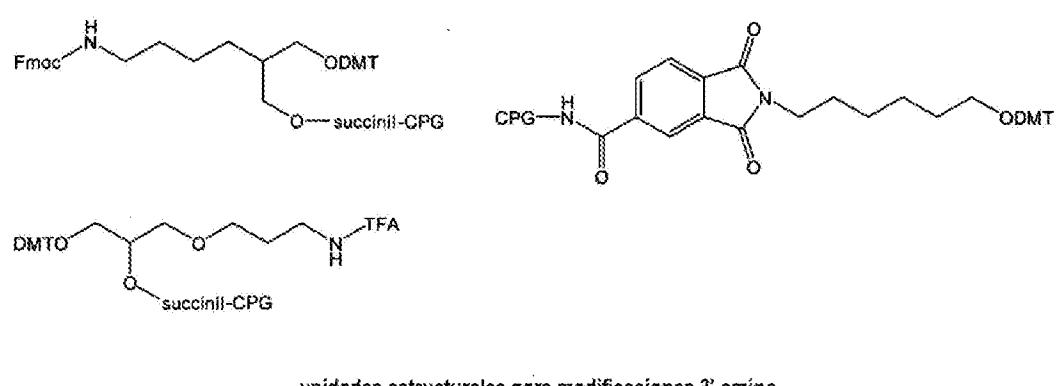
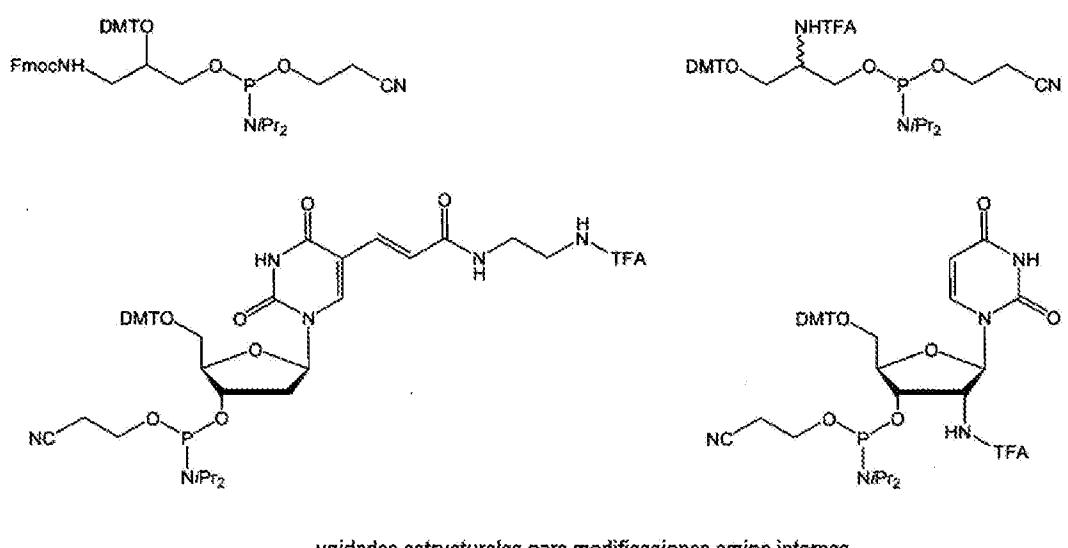
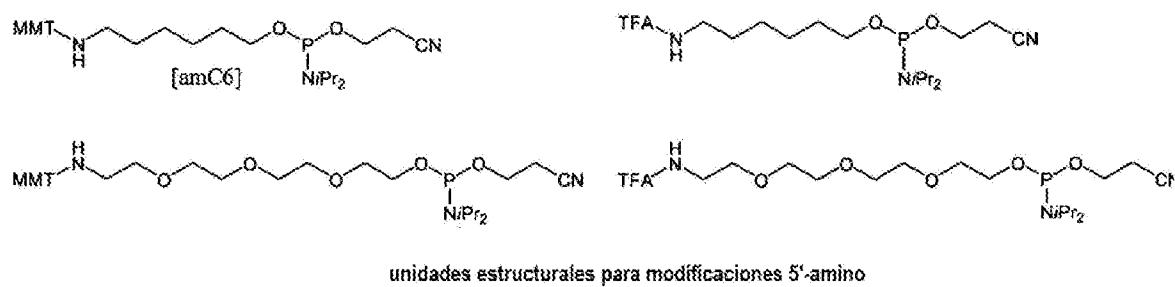
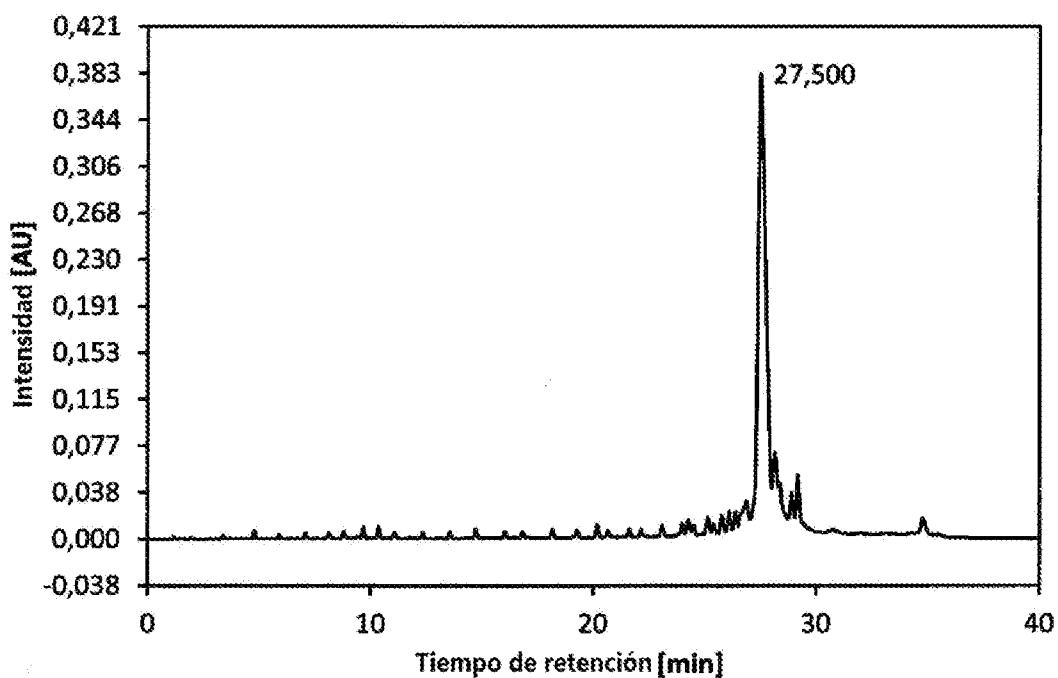


Figura 2

ES 2 975 373 T3

A)



B)

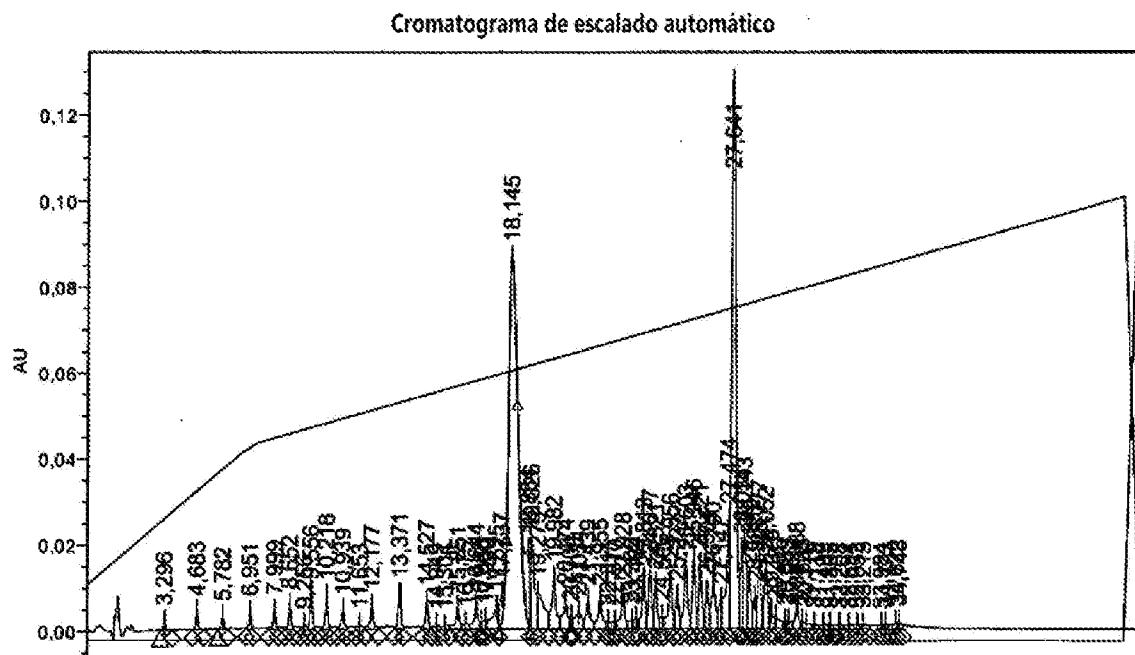
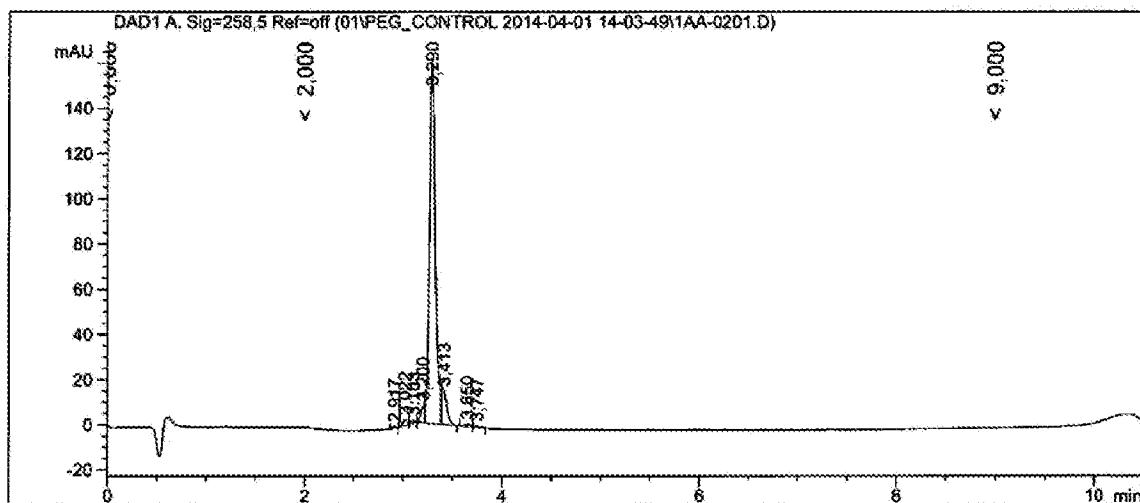


Figura 3

ES 2 975 373 T3

C)



D)

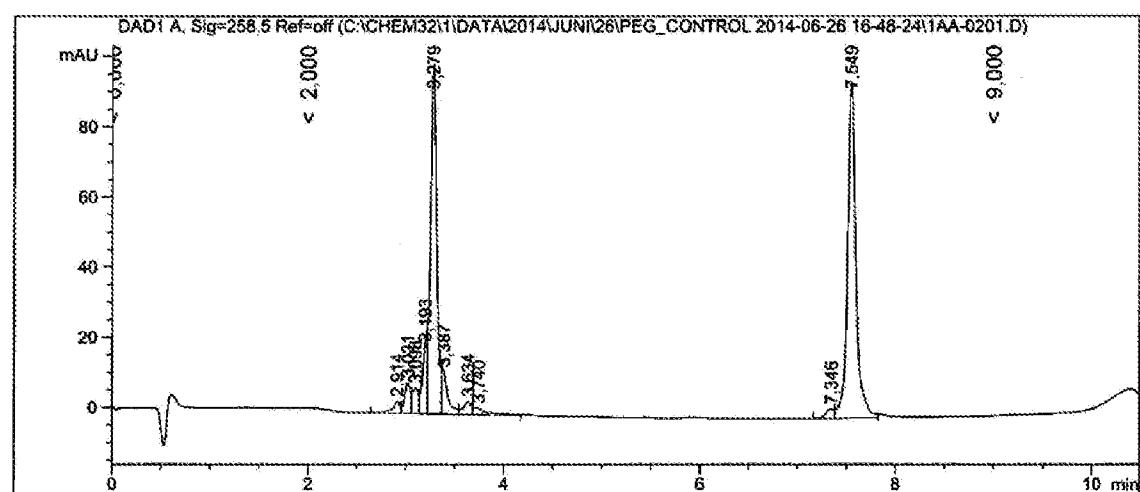
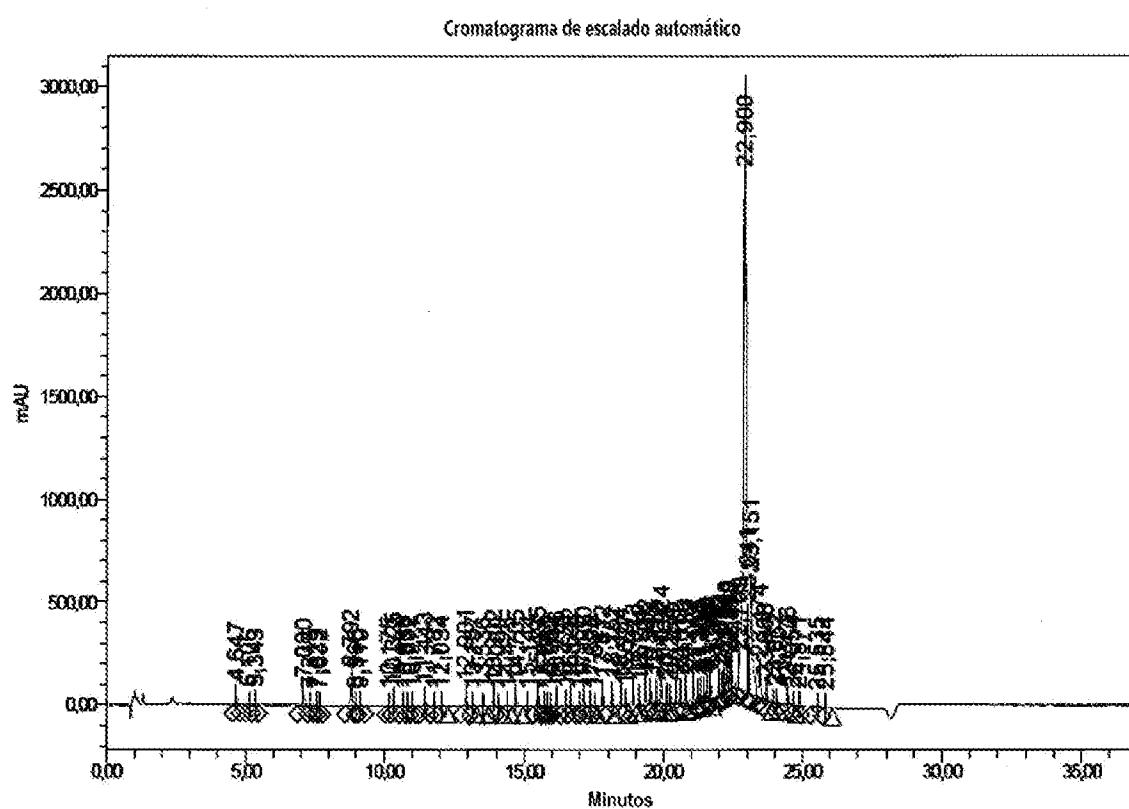


Figura 3 (continuación)

ES 2 975 373 T3

A)



B)

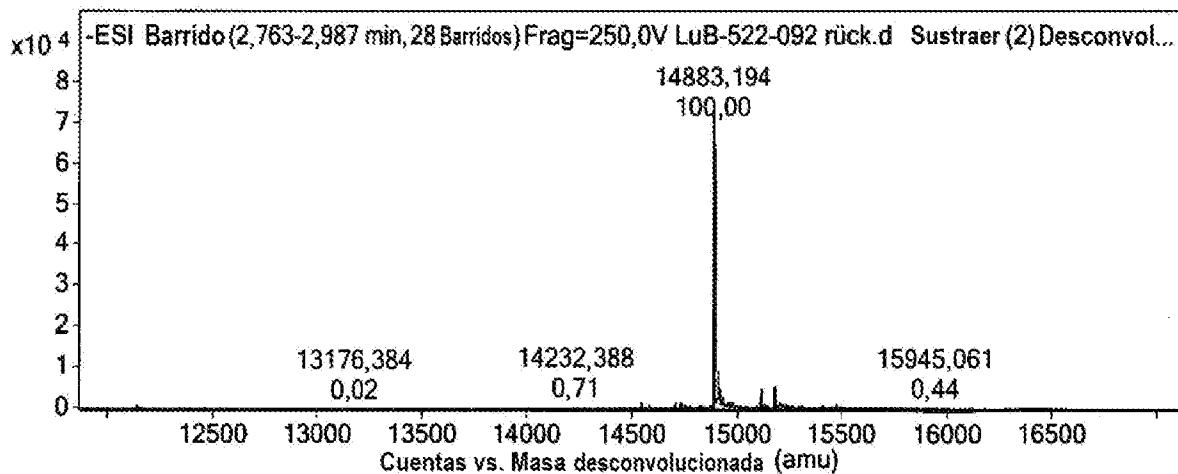


Figura 4

C)

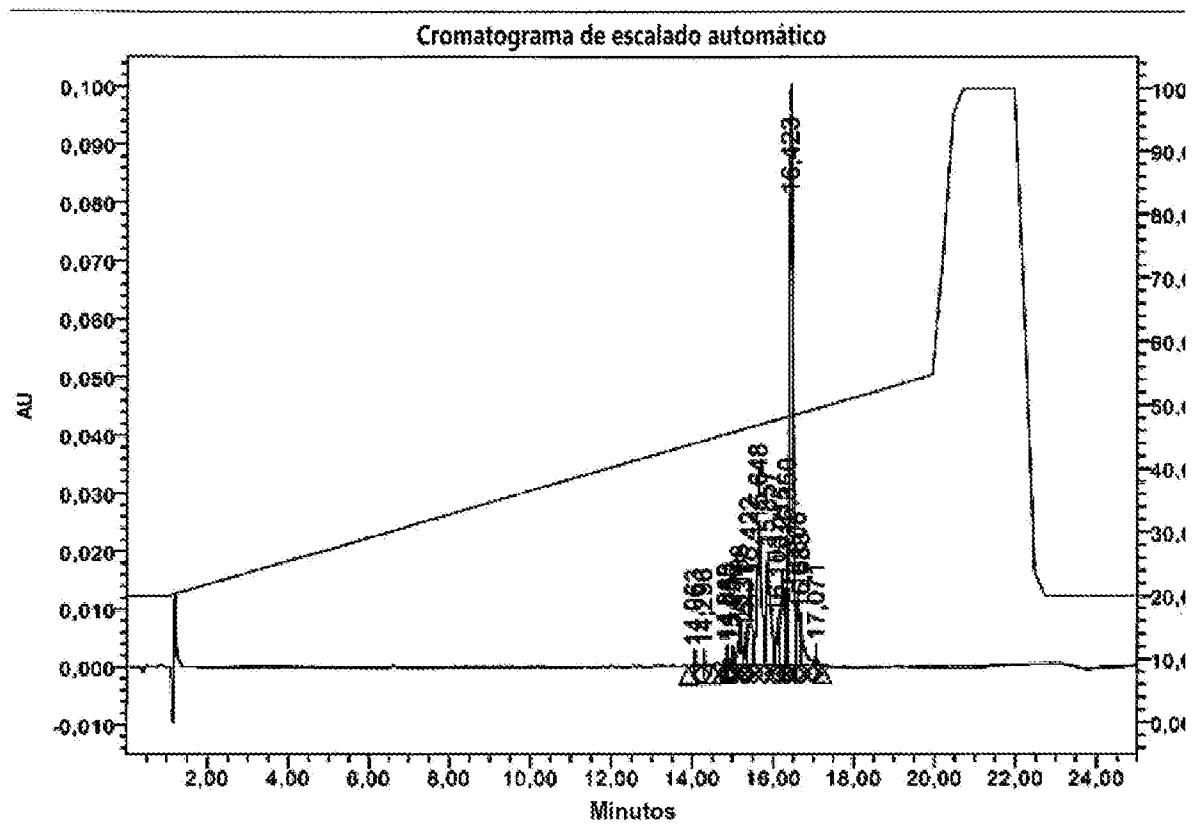
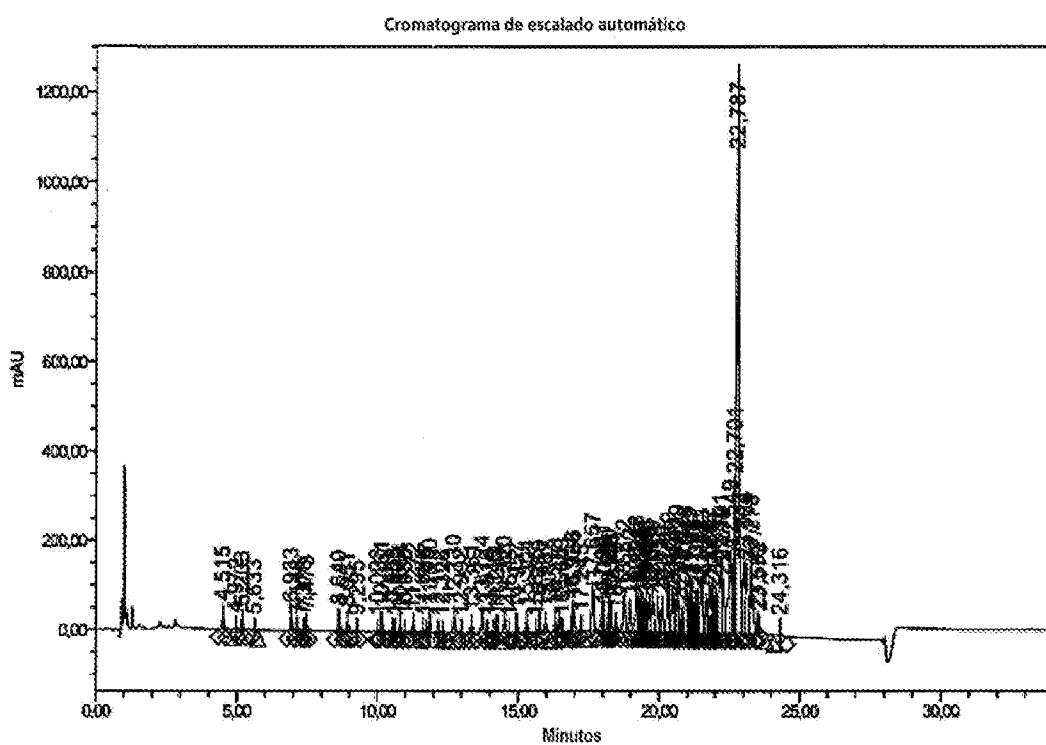


Figura 4 (continuación)

ES 2 975 373 T3

A)



B)

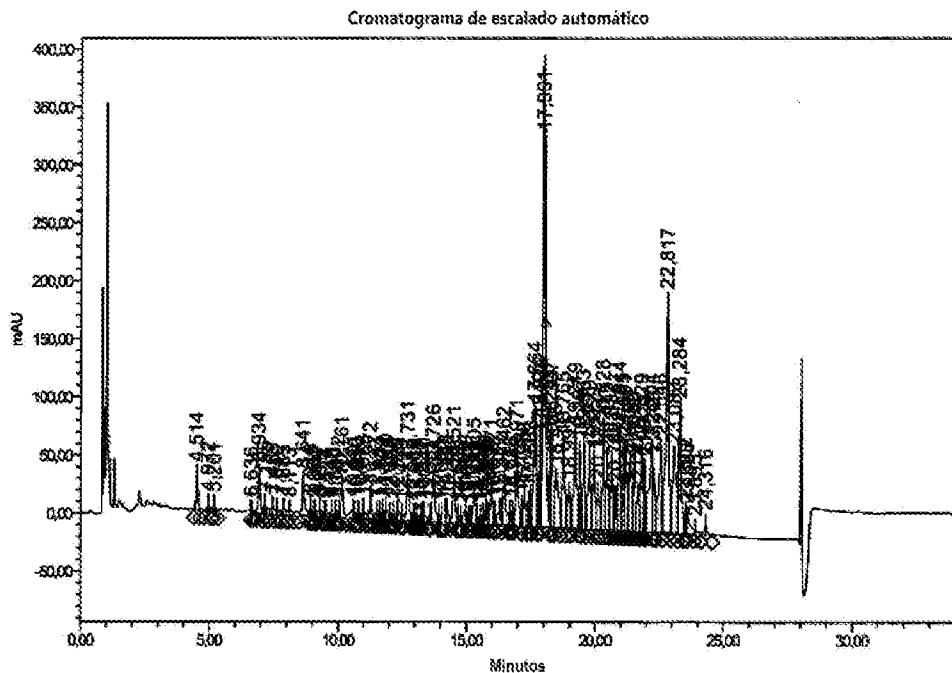
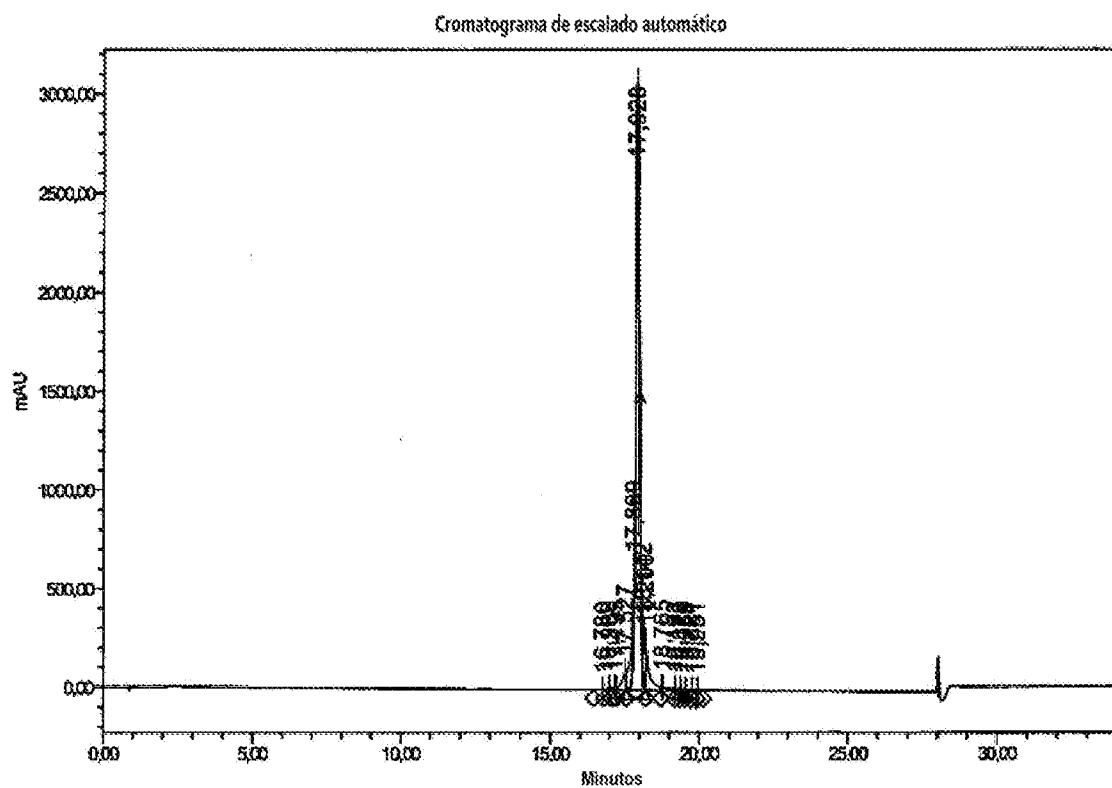


Figura 5

ES 2 975 373 T3

C)



D)

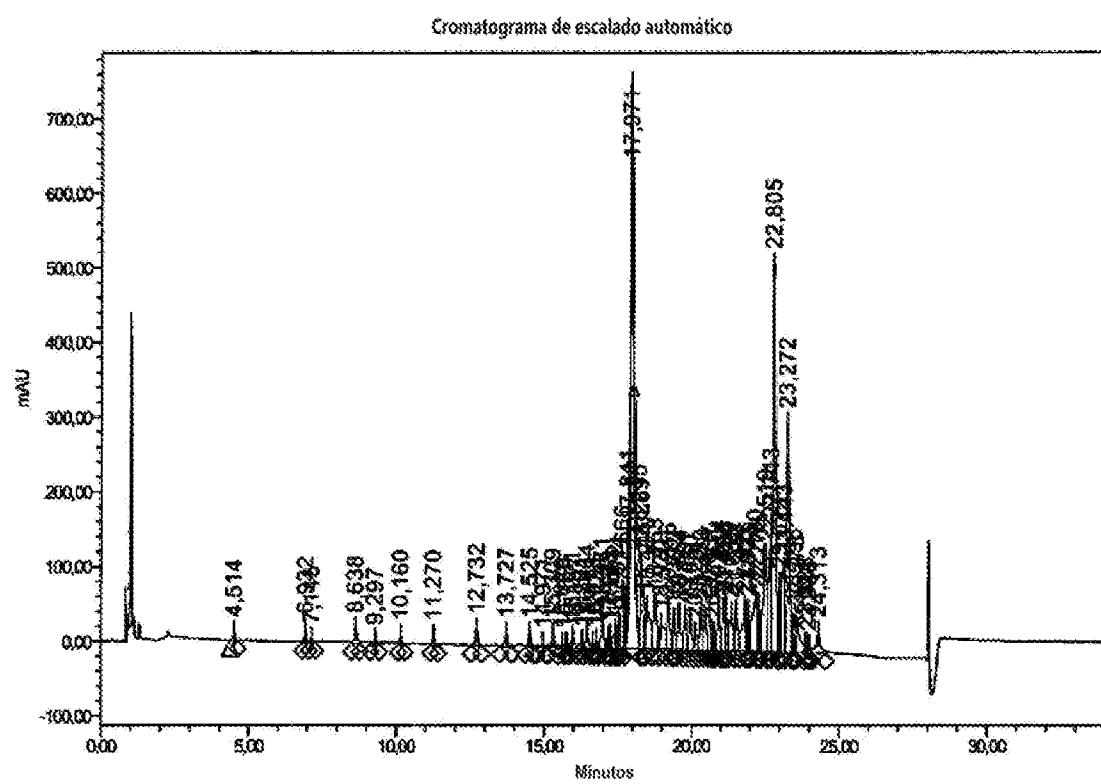


Figura 5 (continuación)

E)

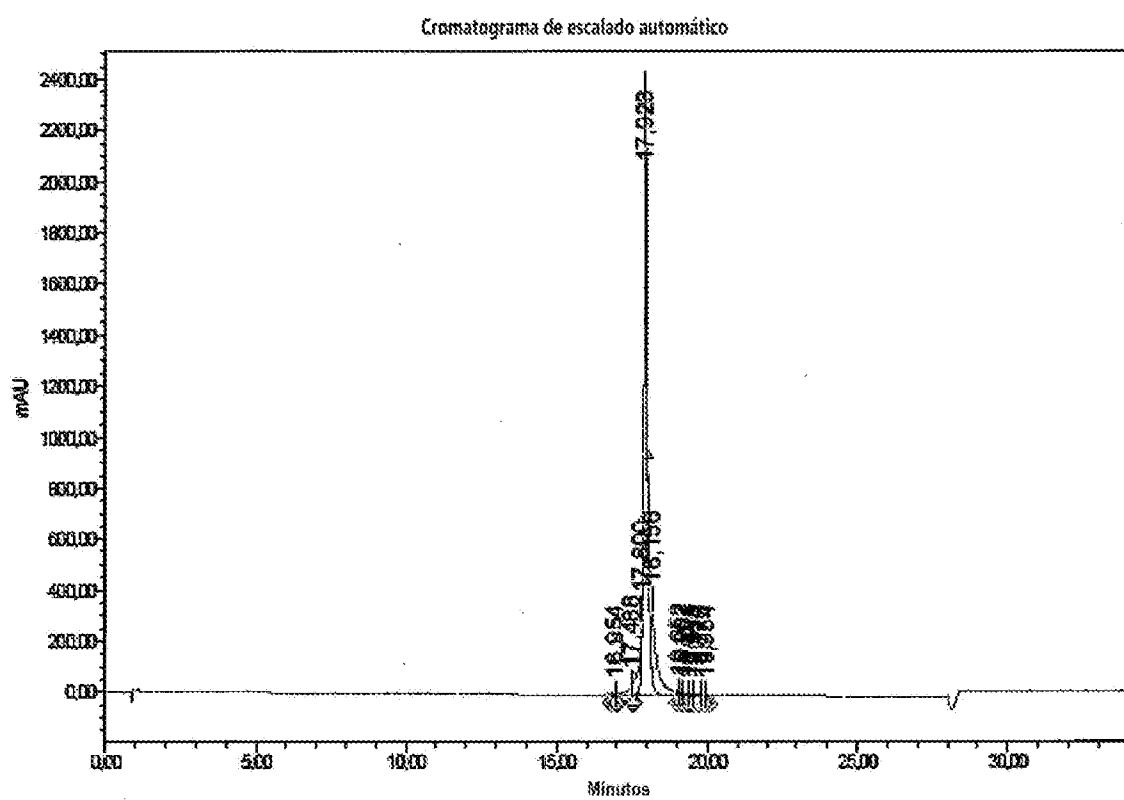


Figura 5 (continuación)