



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 442**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03010207 .3**
96 Fecha de presentación : **16.08.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **1340765**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2003**

54 Título: **Oligonucleótidos quiméricos e híbridos invertidos.**

30 Prioridad: **17.08.1995 US 516454**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **Idera Pharmaceuticals, Inc.**
167 Sidney Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Agrawal, Sudhir**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 315 442 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

Oligonucleótidos quiméricos e híbridos invertidos.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La invención se refiere a oligonucleótidos modificados que son útiles para el estudio de la expresión génica y para la estrategia terapéutica antisentido.

Sumario de la técnica relacionada

15 Las posibilidades de utilización de oligonucleótidos como inhibidores de la expresión de genes específicos en una estrategia terapéutica antisentido se sugirió en primer lugar en tres artículos publicados en 1977 y 1978. Paterson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 4370-4374 (1977) describe cómo la traducción del ARNm en medio exento de células puede inhibirse por la unión de un oligonucleótido complementario al ARNm. Zamecnik y Stephenson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 280-284 y 285-288 (1978) describen cómo un oligonucleótido sintético de 13 unidades
20 que es complementario a una parte del genoma del virus del sarcoma de Rous (VSR) puede inhibir la replicación del VSR en cultivos de células infectadas y puede inhibir la transformación, mediada por VSR, de fibroblastos primarios de pollo en células malignas de sarcoma.

25 Desde la realización de estos primeros estudios ha quedado firmemente demostrada la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la propagación de virus. La patente de Estados Unidos N° 4.806.463 describe la inhibición de la propagación del virus de la inmunodeficiencia humana por oligonucleótidos que son complementarios a cualquiera de las diversas regiones del genoma del VIH. La patente de Estados Unidos N° 5.194.428 describe la inhibición de la replicación del virus de la gripe por oligonucleótidos con enlaces fosforotioato complementarios al gen de la polimerasa 1 del virus de la gripe. Agrawal, hace una revisión, en Trends in Biotechnology 10: 152-158
30 (1992), de la utilización de oligonucleótidos antisentido como agentes antivíricos.

También se han desarrollado oligonucleótidos antisentido como agentes antiparasitarios. La publicación PCT N° WO93/13740 describe la utilización de oligonucleótidos antisentido para inhibir la propagación de parásitos de malaria resistentes a fármacos. Tao *et al.*, Antisense Research and Development 5: 123-129 (1995), describe la inhibición de
35 la propagación de un parásito de esquistosoma por oligonucleótidos antisentido.

Más recientemente, los oligonucleótidos antisentido han resultado ser candidatos prometedores en aplicaciones terapéuticas para enfermedades originadas por la expresión de genes celulares. La publicación PCT N° WO95/09236 describe la neutralización de las anomalías morfológicas, provocadas por beta-amiloide en líneas celulares neuronales, por oligonucleótidos que inhiben la expresión de beta-amiloide. La publicación PCT N° W094/26887 describe la neutralización del corte y empalme aberrante de un transcrito de un gen de globina por oligonucleótidos complementarios a ciertas porciones de dicho transcrito. La solicitud PCT N° PCT/US94/13685 describe la inhibición de la tumorigenicidad por oligonucleótidos complementarios al gen que codifica la ADN-metiltransferasa.
40

45 El desarrollo de varios oligonucleótidos antisentido como agentes terapéuticos y diagnósticos ha sido revisado recientemente por Agrawal e Iyer, Current Opinion in Biotechnology 6: 12-19 (1995).

Con el aumento del interés en la estrategia terapéutica antisentido, se han realizado diversos esfuerzos para mejorar las propiedades farmacocinéticas de los oligonucleótidos modificando la cadena principal de azúcar-fosfato. La patente de Estados Unidos N° 5.149.797 describe oligonucleótidos quiméricos tradicionales que tienen una región principal de fosforotioato interpuesta entre regiones flanqueantes de metilfosfonato o fosforamidato. La publicación PCT N° WO94/02498 describe oligonucleótidos híbridos tradicionales que tienen regiones de ribonucleótidos 2'-O-sustituídos
50 flanqueando una región principal de ADN.

55 En la actualidad se están haciendo muchos descubrimientos sobre las propiedades farmacodinámicas de los oligonucleótidos. Agrawal *et al.*, Clinical Pharmacokinetics 28: 7-16 (1995) y Zhang *et al.*, Clinical Pharmacology and Therapeutics 58: 44-53 (1995) describen la farmacodinámica de oligonucleótidos anti-VIH en pacientes humanos. Algunos de estos nuevos descubrimientos han permitido superar nuevos obstáculos para la optimización de oligonucleótidos como agentes terapéuticos. Por ejemplo, Kniep *et al.*, Nature 374: 546-549 (1995) describe el efecto mitogénico *in vivo* de oligonucleótidos que contienen el dinucleótido CG flanqueado por determinadas secuencias. Galbraith *et al.*, Antisense Research and Development 4: 201-206 (1994) describen la activación del complemento por oligonucleótidos. Henry *et al.*, Pharm. Res. 11: PPDM8082 (1994) describe la posible interferencia de oligonucleótidos con la coagulación sanguínea. Por consiguiente, se necesitan oligonucleótidos modificados que conserven las propiedades de inhibición de la expresión génica produciendo al mismo tiempo menos efectos secundarios que los
60 oligonucleótidos convencionales.

Breve resumen de la invención

La invención se refiere a oligonucleótidos modificados que son útiles para los estudios de la expresión génica y para la estrategia terapéutica antisentido. La invención proporciona oligonucleótidos modificados que inhiben la expresión génica y que producen menos efectos secundarios que los oligonucleótidos convencionales. En particular, la invención proporciona oligonucleótidos modificados que presentan mitogenicidad reducida, activación del complemento reducida y propiedades antitrombóticas reducidas, en comparación con los oligonucleótidos convencionales.

En un primer aspecto, la invención proporciona oligonucleótidos quiméricos invertidos y composiciones de material para la inhibición de la expresión de genes específicos con menos efectos secundarios. Dicha inhibición de la expresión génica puede utilizarse como un método alternativo al análisis de mutantes para determinar la función biológica de genes específicos. Dicha inhibición de la expresión génica también puede utilizarse para el tratamiento terapéutico de enfermedades causadas por la expresión de los genes de un virus o de un patógeno, o por la expresión inapropiada de genes celulares.

Según la invención, la composición de material comprende oligonucleótidos modificados que tienen una región oligonucleotídica no iónica entre dos regiones oligonucleotídicas con enlaces fosforotioato, una estructura que está “invertida” con respecto a los oligonucleótidos quiméricos tradicionales. En realizaciones preferidas, la región no iónica contiene enlaces internucleosídicos alquilfosfonato y/o fosforamidato y/o fosfotriéster.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para modular la expresión génica en un mamífero, con menos efectos secundarios. En el método según este aspecto de la invención, una composición de material según la invención se administra al mamífero, en la que el oligonucleótido es complementario a un gen que se expresa en el mamífero. En una realización preferida, tras la administración de la composición de material, se realizan una o más mediciones de efectos biológicos seleccionados entre el grupo formado por activación del complemento, mitogénesis e inhibición de la formación de coágulos por la trombina.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento terapéutico, con menos efectos secundarios, de una enfermedad causada por la expresión génica aberrante, comprendiendo el método administrar a un individuo que tenga la enfermedad una composición de material según el primer aspecto de la invención, en el que el oligonucleótido es complementario a un gen que se expresa de modo aberrante, en el que dicha expresión aberrante causa la enfermedad. En este contexto, la expresión génica aberrante significa expresión en un organismo huésped de un gen necesario para la propagación de un virus o de un patógeno procariótico o eucariótico, o la expresión inapropiada de un gen celular del huésped. Expresión génica inapropiada en la célula huésped incluye la expresión de un alelo mutante de un gen celular, o la infraexpresión o sobreexpresión de un alelo normal de un gen celular, estando causada dicha enfermedad por dicha expresión génica inapropiada en la célula huésped. En una realización preferida, tras la administración de la composición de material, se realizan una o más mediciones de efectos biológicos seleccionados entre el grupo formado por activación del complemento, mitogénesis e inhibición de la formación de coágulos por la trombina.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra por comparación los oligonucleótidos híbridos invertidos, oligonucleótidos híbridos y oligonucleótidos con enlaces fosfodiéster y fosforotioato utilizados en los presentes estudios. Los 2'-O-metilribonucleótidos aparecen perfilados y los nucleótidos con enlaces fosfodiéster aparecen subrayados; los restantes son nucleótidos unidos con enlaces fosforotioato.

La Figura 2 muestra los oligonucleótidos de cadena principal mixta, quiméricos y quiméricos invertidos utilizados en los presentes estudios. Los nucleótidos unidos por enlaces metilfosfonato están subrayados; todos los restantes son nucleótidos unidos con enlaces fosforotioato, y los oligonucleótidos reivindicados se marcan con “*”.

La Figura 3 muestra la captación de timidina por esplenocitos de ratón en función de la concentración de oligonucleótidos con enlaces fosforotioato o de cualquiera de los diversos oligonucleótidos híbridos invertidos.

La Figura 4 muestra el grado de inhibición de la hemólisis, mediada por el complemento, observada cuando se trata el suero con oligonucleótidos con enlaces fosforotioato o con cualquiera de los diversos oligonucleótidos híbridos invertidos.

La Figura 5 muestra la prolongación del TTPa obtenida cuando se trata el suero humano normal con oligonucleótidos con enlaces fosforotioato o con cualquiera de los diversos oligonucleótidos híbridos invertidos.

La Figura 6 muestra la captación de timidina por esplenocitos de ratón en función de la concentración de oligonucleótidos con enlaces fosforotioato o de cualquiera de los diversos oligonucleótidos quiméricos invertidos.

La Figura 7 muestra el grado de inhibición de la hemólisis, mediada por el complemento, observada cuando se trata el suero con oligonucleótidos con enlaces fosforotioato o con cualquiera de los diversos oligonucleótidos quiméricos invertidos.

La Figura 8 muestra la prolongación del TTPa obtenida cuando se trata el suero humano normal con oligonucleótidos con enlaces fosforotioato o con cualquiera de los diversos oligonucleótidos quiméricos invertidos.

5 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención se refiere a oligonucleótidos modificados que son útiles para los estudios de la expresión génica y para la estrategia terapéutica antisentido. La invención proporciona oligonucleótidos modificados que inhiben la expresión génica y que producen menos efectos secundarios que los oligonucleótidos convencionales. En particular, la invención proporciona oligonucleótidos modificados que presentan mitogenicidad reducida, activación del complemento reducida y propiedades antitrombóticas reducidas, en comparación con los oligonucleótidos convencionales.

En un primer aspecto, la invención proporciona oligonucleótidos quiméricos invertidos y composiciones de material para la inhibición de la expresión de genes específicos, con menos efectos secundarios. Dicha inhibición de la expresión génica puede utilizarse como un método alternativo al análisis de mutantes o a los experimentos de “desactivación” de genes para determinar la función biológica de genes específicos. Dicha inhibición de la expresión génica también puede utilizarse para el tratamiento terapéutico de enfermedades causadas por la expresión de los genes de un virus o de un patógeno, o por la expresión inapropiada de genes celulares.

Una composición de material para la inhibición de la expresión de genes específicos con menos efectos secundarios comprende, según este aspecto de la invención, un oligonucleótido modificado que es complementario a una porción de una región genómica o gen del que se desea inhibir la expresión, o a un transcrito de ARN obtenido a partir de dicho gen. Para los propósitos de la invención, el término oligonucleótido incluye polímeros de dos o más monómeros de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o ribonucleótidos 2'-O-sustituídos, o cualquier combinación de los mismos. El término oligonucleótido también engloba aquellos polímeros que tienen bases o azúcares químicamente modificados y/o que tienen sustituyentes adicionales, incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, grupos lipófilos, agentes intercalantes, diaminas y adamantano. Preferiblemente, dichos oligonucleótidos tendrán de aproximadamente 12 a aproximadamente 50 nucleótidos, lo más preferiblemente de aproximadamente 17 a aproximadamente 35 nucleótidos. El término complementario significa que tiene la capacidad de hibridarse con una región genómica o gen, o con su transcrito de ARN en condiciones fisiológicas. Dicha hibridación es normalmente el resultado de la unión mediante enlaces de hidrógeno específico de base entre cadenas complementarias, preferiblemente para formar pares de bases de Watson-Crick o de Hoogsteen, aunque también pueden dar lugar a la hibridación otras formas de unión mediante enlaces de hidrógeno, así como el apilamiento de bases. En la práctica, dicha hibridación puede deducirse observando la inhibición de la expresión de genes específicos. La secuencia del gen o la secuencia del transcrito de ARN, a la que es complementaria la secuencia del oligonucleótido modificado, dependerá del efecto biológico que se busca modificar. En algunos casos, la región genómica o gen, o su transcrito de ARN puede provenir de un virus. Los virus preferidos incluyen, sin limitarse a los mismos, virus de la inmunodeficiencia humana (de tipo 1 ó 2), virus de la gripe, virus herpes simple (de tipo 1 ó 2), virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus respiratorio sincicial, virus de la gripe, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y virus del papiloma. En otros casos, la región genómica o gen, o su transcrito de ARN puede provenir de un ADN cromosómico endógeno de mamífero (incluyendo seres humanos). Los ejemplos preferidos de dichas regiones genómicas, genes o de sus transcritos de ARN incluyen, sin limitarse a los mismos, secuencias que codifican el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), beta-amiloide, ADN-metiltransferasa, proteína-quinasa A, proteína ApoE4, glicoproteína p, proteína c-MYC, proteína BCL-2 y CAPL. Incluso en otros casos, la región genómica o gen, o su transcrito de ARN puede provenir de un patógeno procariótico o eucariótico, incluyendo, sin limitarse a los mismos, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale*, *Schistosoma spp.* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Además del oligonucleótido modificado según la invención, la composición de material para la inhibición de la expresión génica, con menos efectos secundarios, puede contener opcionalmente cualquiera de los excipientes o diluyentes bien conocidos, aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Esta composición de material puede contener además uno o más oligonucleótidos adicionales según la invención, pudiendo ser dicho oligonucleótido adicional un oligonucleótido híbrido invertido o un oligonucleótido quimérico invertido. Como alternativa, esta composición puede contener una o más oligonucleótidos antisentido tradicionales, tales como un oligonucleótido con enlaces fosforotioato, un oligonucleótido híbrido o un oligonucleótido quimérico, o puede contener cualquier otro agente farmacológicamente activo.

Según la invención, la composición de material comprende oligonucleótidos modificados que tienen una región oligonucleotídica no iónica entre dos regiones oligonucleotídicas con enlaces fosforotioato, una estructura que está “invertida” en comparación con los oligonucleótidos quiméricos tradicionales. En realizaciones preferidas, la región no iónica contiene enlaces internucleosídicos alquilfosfonato y/o fosforamidato y/o fosfotriéster. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos quiméricos invertidos. La región no iónica tiene de cuatro a 10 ó 12 nucleósidos unidos entre sí por enlaces no iónicos 5' a 3', preferiblemente enlaces alquilfosfonato, fosforamidato o fosfotriéster, y preferiblemente de cuatro a ocho de estos nucleósidos unidos no iónicamente. La región o regiones flanqueantes de fosforotioato tienen de cuatro a 46 nucleósidos unidos entre sí por enlaces fosforotioato 5' a 3', y preferiblemente de ocho a 26 de estos nucleósidos unidos a fosforotioato. Lo más preferiblemente, las regiones de fosforotioato tendrán de 5 a 15 nucleósidos unidos a fosforotioato. Los enlaces fosforotioato pueden ser enantiómeros R_p y S_p mezclados, o pueden ser estereorregulares o sustancialmente estereorregulares en forma R_p o S_p (véase Iyer *et al.*, Tetrahedron Asymmetry 6: 1051-1054 (1995)). En una realización aún más preferida, el oligonucleótido tiene una región no iónica

que tiene de 6 a 8 nucleósidos unidos a metilfosfonato, flanqueados en cualquier lado por regiones fosforotioato, que tienen cada una de 6 a 10 nucleósidos unidos a fosforotioato.

5 Los especialistas en la técnica reconocerán que los elementos de estas realizaciones preferidas pueden combinarse y el inventor contempla dicha combinación. Por ejemplo, las regiones no iónicas pueden tener de uno a todos los ribonucleótidos 2'-O-sustituidos. (Véase Nucleosides & Nucleotides 14: 1031-1035 (1995) para técnicas de síntesis pertinentes.

10 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para modular la expresión génica en un mamífero, con menos efectos secundarios. En el método según este aspecto de la invención, se administra una composición de material según la invención al mamífero, en la que el oligonucleótido es complementario a un gen que se expresa en el mamífero. Preferiblemente, dicha administración puede ser parenteral, oral, intranasal o intrarrectal. En una realización preferida, tras la administración de la composición de material, se realizan una o más mediciones de los efectos secundarios biológicos seleccionados entre el grupo formado por activación del complemento, mitogénesis e inhibición de la formación de coágulos por la trombina.

15 En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento terapéutico, con menos efectos secundarios, de una enfermedad causada por la expresión génica aberrante, comprendiendo el método administrar a un individuo que tenga la enfermedad una composición de material de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que el oligonucleótido es complementario a un gen que se expresa de modo aberrante, en el que dicha expresión aberrante causa la enfermedad. En este contexto, la expresión génica aberrante significa expresión en un organismo huésped de un gen necesario para la propagación de un virus o de un patógeno procariótico o eucariótico, o expresión inapropiada de un gen celular del huésped. La expresión génica inapropiada en la célula huésped incluye la expresión de un alelo mutante de un gen celular, o la infraexpresión o sobreexpresión de un alelo normal de un gen celular, de modo que la enfermedad se provoca por dicha expresión génica inapropiada en la célula huésped. Preferiblemente, dicha administración debería ser parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal o intrarrectal. La administración de las composiciones terapéuticas puede realizarse utilizando procedimientos conocidos con dosificaciones y durante períodos de tiempo eficaces para reducir los síntomas o marcadores indirectos de la enfermedad. Cuando se administra por vía sistémica, la composición terapéutica se administra preferiblemente en una dosificación suficiente para alcanzar un nivel sanguíneo del oligonucleótido de aproximadamente 0,01 micromolar a aproximadamente 10 micromolar. Para la administración localizada, pueden ser eficaces concentraciones mucho menores que éstas, y pueden tolerarse concentraciones mucho mayores. Preferiblemente, una dosificación total del oligonucleótido variará de aproximadamente 0,1 mg de oligonucleótido por paciente y día a aproximadamente 200 mg de oligonucleótido por kg de peso corporal y día. Puede ser deseable administrar de modo simultáneo o secuencial una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las composiciones terapéuticas de la invención a un individuo, como un episodio único de tratamiento. En una realización, tras la administración de la composición de material, se realizan una o más mediciones de efectos biológicos seleccionados a partir del grupo formado por activación del complemento, mitogénesis e inhibición de la formación de coágulos por la trombina.

40 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar de modo adicional ciertas realizaciones preferidas de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

45 *Síntesis, Desprotección y Purificación de los Oligonucleótidos*

Los oligonucleótidos con enlaces fosforotioato se sintetizaron utilizando un sintetizador automático de ADN (Modelo 8700, Biosearch, Bedford, MA.) utilizando técnicas de beta-cianoetilfosforamidito en una escala de 10 micromoles. Para generar los enlaces fosforotioato, el enlace fosfito intermediario obtenido después de cada acoplamiento se oxidó utilizando 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3H-ona (Véase Beaucage, en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties*, Agrawal (editor), Humana Press, Totowa, N.J., págs. 33-62 (1993).) Se realizó una síntesis similar para generar los enlaces fosfodiéster, con la excepción de que se realizó una oxidación convencional usando reactivo de yodo convencional. La síntesis del oligonucleótido quimérico invertido se realizó de la misma manera, con la excepción de que los enlaces metilfosfonato se unieron usando nucleósido de metilfosforamidita (Glen Research, Sterling, VA), seguido de oxidación con yodo 0,1 M en tetrahidrofurano/2,6-lutidina/agua (75:25:0,25) (véase Agrawal & Goodchild, *Tet. Lett.* 28: 3539-3542 (1987)). Los oligonucleótidos híbridos invertidos se sintetizaron de modo similar, con la excepción de que el segmento que contenía los 2'-O-metilribonucleótidos se preparó utilizando 2'-O-metilribonucleósidos con enlaces fosforamidito, seguido por la oxidación, hasta formar un enlace fosforotioato o fosfodiéster, como se ha descrito anteriormente. La desprotección y la purificación de oligonucleótidos se realizó según un procedimiento convencional (Véase Padmapriya *et al.*, *Antisense Res. & Dev.* 4: 185-199 (1994)), excepto para oligonucleótidos que contienen regiones que contienen metilfosfonato. Para estos oligonucleótidos, el oligonucleótido unido a CPG se trató con hidróxido de amonio concentrado durante 1 hora a temperatura ambiente, y el sobrenadante se retiró y se evaporó para obtener un residuo de color amarillo pálido, que después se trató con una mezcla de etilendiamina/etanol (1:1 v/v) durante 6 horas a temperatura ambiente y se secó de nuevo a presión reducida.

Ejemplo 2

Reducción de la Activación del Complemento In Vitro por Oligonucleótidos Híbridos Invertidos y Quiméricos Invertidos

5 Para determinar el efecto relativo de la estructura híbrida invertida o quimérica invertida en el agotamiento del complemento mediado por oligonucleótidos, se realizaron los siguientes experimentos. Se extrajo sangre venosa de voluntarios humanos adultos sanos. Se preparó el suero para el ensayo de la actividad hemolítica del complemento recogiendo la sangre en recipientes al vacío (Becton Dickinson #6430 Franklin Lakes, N.J.) sin aditivos comerciales. Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente durante 30 minutos, se enfrió en hielo durante 15 minutos y después se centrifugó a 4°C para separar el suero. El suero recogido se mantuvo en hielo, si el ensayo se realizaba el mismo día, o, como alternativa, se conservó a -70°C. A continuación se incubaron el tampón, el oligonucleótido con enlaces fosforotioato, el oligonucleótido híbrido invertido o el oligonucleótido quimérico invertido, con el suero. Se realizó un ensayo CH50 estándar (véase Kabat y Mayer (eds): Experimental Immunochimistry, 2ª Edición, Springfield, IL., C. C. Thomas (1961), p. 125) para la lisis, mediada por el complemento, de eritrocitos de oveja (Colorado Serum Co.) sensibilizados con anticuerpo contra eritrocitos de oveja (hemolisina, Diamedix, Miami, FL.), utilizando determinaciones duplicadas de al menos cinco diluciones de cada suero de ensayo, y midiendo después la liberación de hemoglobina en los sobrenadantes exentos de células por espectrofotometría a 541 nm.

20 Ejemplo 3

Reducción de la Mitogenicidad In Vitro de Oligonucleótidos Híbridos Invertidos y Quiméricos Invertidos

25 Para determinar el efecto relativo de la estructura híbrida invertida o quimérica invertida en la mitogenicidad mediada por oligonucleótidos, se realizaron los siguientes experimentos. Se extrajo el bazo de un ratón CD1 macho (4-5 semanas, 20-22 g; Charles River, Wilmington, MA.). Se prepararon suspensiones de células únicas picando el tejido cuidadosamente con los bordes esmerilados de un portaobjetos. Las células se cultivaron después en medio RPMI completo [medio RPMI enriquecido con suero bovino fetal (FBS) al 10%, 2-mercaptoetanol (2-ME) 50 micromolar, 100 U/ml de penicilina, 100 microgramos/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM]. Para reducir al mínimo la degradación de oligonucleótidos, el FBS se calentó primero durante 30 minutos a 65°C (oligonucleótidos con enlaces fosfodiéster) o a 56°C (todos los oligonucleótidos restantes). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo (volumen de 100 microlitros/pocillo). Se añadieron los oligonucleótidos en 10 microlitros de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) a cada pocillo. Después de 44 horas de cultivo a 37°C, se añadió un microcurio de timidina tritjada (Amersham, Arlington Heights, IL.) en 20 microlitros de medio RPMI durante un período de marcado de 4 horas. Después, las células se recogieron en un recolector automático de células (Skatron, Sterling, VA.) y se evaluaron los filtros con un contador de centelleo. En experimentos de control para valorar la mitogenicidad, las células se trataron de modo idéntico, con la excepción de que se añadió a las células medio (control negativo) o concanavalina A (control positivo), en lugar de los oligonucleótidos. Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 1. Todos los oligonucleótidos híbridos invertidos demostraron ser menos inmunogénicos que los oligonucleótidos con enlaces fosforotioato. Los oligonucleótidos híbridos invertidos que tenían enlaces fosfodiéster en la región 2'-O-metilo resultaron ser algo menos inmunogénicos que los que contenían enlaces fosforotioato en dicha región. No se observaron diferencias significativas en la mitogenicidad cuando la región de 2'-O-metilribonucleótidos se redujo de 13 a 11 o a 9 nucleótidos. Los oligonucleótidos quiméricos invertidos generalmente fueron también menos mitogénicos que los oligonucleótidos con enlaces fosforotioato. Además, estos oligonucleótidos resultaron ser menos mitogénicos que los oligonucleótidos quiméricos tradicionales, al menos en los casos en los que los oligonucleótidos quiméricos tradicionales tenían una cantidad significativa de enlaces metilfosfonato cerca del extremo 3'. El aumento del número de engarces metilfosfonato en el medio del oligonucleótido de 5 a 6 ó 7 no resultó tener un efecto significativo sobre la mitogenicidad. Estos resultados indican que la incorporación de la estructura híbrida invertida o quimérica invertida en un oligonucleótido puede reducir su mitogenicidad.

50 Ejemplo 4

Reducción de la Inhibición de la Coagulación In Vitro por Oligonucleótidos Híbridos Invertidos y Quiméricos Invertidos

55 Para determinar el efecto relativo de la estructura híbrida invertida o quimérica invertida en la mitogenicidad provocada por oligonucleótidos, se realizaron los siguientes experimentos. Se extrajo sangre venosa de voluntarios humanos adultos sanos. Se preparó el plasma para el ensayo del tiempo de coagulación recogiendo la sangre en recipientes al vacío siliconizados que contenían citrato de sodio (Becton Dickinson #367705), seguido por dos centrifugaciones a 4°C para preparar el plasma bajo en plaquetas. Se mantuvieron alícuotas de plasma en hielo, se les añadieron varios compuestos de ensayo y, o bien se analizaron inmediatamente o se congelaron rápidamente en hielo seco para su conservación posterior a -20°C antes del ensayo de coagulación. Se midió el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) por duplicado en un aparato Electra 1000C (Medical Laboratory Automation, Mount Vernon, N.Y.) de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante, utilizando Actin FSL (Baxter Dade, Miami, FL.) y calcio para iniciar la formación de coágulos, que se midió por fotometría. La prolongación del TTPa se consideró una indicación de la inhibición de la coagulación producida, como efecto secundario, por el oligonucleótido. Los resultados se muestran en la Figura 5, para los oligonucleótidos híbridos invertidos y en la Figura 8 para los oligonucleótidos quiméricos invertidos. Los oligonucleótidos tradicionales con enlaces fosforotioato producen la mayor prolongación del

ES 2 315 442 T3

TTPa, de entre todos los oligonucleótidos ensayados. Los oligonucleótidos híbridos tradicionales produjeron una prolongación algo reducida del TTPa. En comparación con los oligonucleótidos tradicionales con enlaces fosforotioato o con los oligonucleótidos tradicionales híbridos, todos los oligonucleótidos híbridos invertidos probados produjeron una prolongación significativamente reducida del TTPa. Los oligonucleótidos híbridos invertidos que tenían enlaces fosfodiéster en la región de ribonucleótidos 2'-O-sustituídos presentaron la máxima reducción en este efecto secundario, presentando uno de dichos oligonucleótidos que tenía una región de 2'-O-metil-ARN con enlaces fosfodiéster de 13 nucleótidos una muy escasa prolongación del TTPa, incluso a concentraciones de oligonucleótidos de 100 microgramos/ml. Los oligonucleótidos quiméricos tradicionales producen una prolongación mucho menor del TTPa que los oligonucleótidos con enlaces fosforotioato tradicionales. En general, los oligonucleótidos quiméricos invertidos conservan esta característica. Al menos un oligonucleótido quimérico invertido, que tiene una región metilfosfonato de 7 nucleótidos flanqueada por regiones fosforotioato de 9 nucleótidos, dio mejores resultados en este ensayo que los oligonucleótidos quiméricos tradicionales a todas las concentraciones de oligonucleótidos ensayadas excepto la más alta. Estos resultados indican que los oligonucleótidos híbridos invertidos y quiméricos invertidos pueden presentar ventajas en la reducción del efecto secundario de inhibición de la coagulación cuando se administran para modular la expresión génica *in vivo*.

Ejemplo 5

Reducción en la Activación del Complemento *In Vivo* por Oligonucleótidos Híbridos Invertidos y Quiméricos Invertidos

Se aclimatan monos Rhesus (4-9 kg de peso corporal) a las condiciones del laboratorio durante al menos 7 días antes del estudio. En el día del estudio, se administra sedación leve a cada animal con ketamina-HCl (10 mg/kg) y diazepam (0,5 mg/kg). Se induce la anestesia hasta el nivel quirúrgico y se mantiene durante el procedimiento por venoclisis continua de ketamina. El oligonucleótido con enlaces fosforotioato o el oligonucleótido híbrido invertido o quimérico invertido se disuelve en solución salina normal y se administra por infusión intravenosa con un catéter en la vena cefálica, utilizando una bomba de infusión programable a una velocidad de suministro de 0,42 ml/minuto. Para cada oligonucleótido, se administran dosis de oligonucleótidos de 0, 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/kg a dos animales durante un período de infusión de 10 minutos. Se toman muestras de sangre arterial 10 minutos antes de la administración de oligonucleótidos y 2, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos después del comienzo de la infusión, así como 24 horas después. Se utiliza el suero para determinar el complemento CH50, siguiendo el procedimiento convencional de lisis, dependiente del complemento, de eritrocitos de oveja (véase Kabat y Mayer, 1961, citado anteriormente). A la máxima dosis, el oligonucleótido con enlaces fosforotioato provoca un descenso en el complemento CH50 del suero comenzando en el plazo de 5 minutos tras el comienzo de la infusión. Se espera que los oligonucleótidos híbridos y quiméricos invertidos muestren, en estas condiciones, un descenso mucho más reducido, o indetectable, en el complemento CH50 del suero.

Ejemplo 6

Reducción de la Mitogenicidad *In Vivo* de Oligonucleótidos Híbridos Invertidos y Quiméricos Invertidos

Se inyecta a ratones CD1, por vía intraperitoneal, una dosis de 50 mg/kg de peso corporal de oligonucleótidos con enlaces fosforotioato, oligonucleótidos híbridos invertidos u oligonucleótidos quiméricos invertidos. Cuarenta y ocho horas después, se sacrifican los animales y los bazo se extraen y se pesan. Se espera que los animales tratados con oligonucleótidos híbridos invertidos u oligonucleótidos quiméricos invertidos no muestren un aumento significativo en el peso del bazo, mientras que se espera que aquellos tratados con oligonucleótidos con enlaces fosforotioato presenten aumentos leves en el peso del bazo.

Ejemplo 7

Reducción de la Inhibición de la Coagulación *In Vivo* por Oligonucleótidos Híbridos Invertidos y Quiméricos Invertidos

Se tratan monos Rhesus como en el ejemplo 5. A partir de las muestras de sangre completa extraídas se prepara el plasma para el ensayo de coagulación, que se realiza como se ha descrito en el ejemplo 4. Se espera que la prolongación del TTPa esté sustancialmente reducida tanto en el caso de los oligonucleótidos híbridos invertidos como en el de los oligonucleótidos quiméricos invertidos, en comparación con los oligonucleótidos tradicionales con enlaces fosforotioato.

Ejemplo 8

Efecto de la Estructura Híbrida o Quimérica Invertida Sobre la Actividad de la RNasa H

Con el objeto de determinar la capacidad de los oligonucleótidos híbridos invertidos y de los oligonucleótidos quiméricos invertidos para activar RNasa H cuando se unen a una molécula de ARN complementario, se realizaron los siguientes experimentos. Cada oligonucleótido con enlaces fosforotioato, oligonucleótido híbrido invertido u oligonucleótido quimérico invertido se incubó junto con una cantidad molar equivalente de oligorribonucleótido complementario (concentración de 0,266 micromolar de cada uno), en una cubeta que contenía un volumen final de 1 ml de tampón de RNasa H (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, KCl 0,1 M, glicerol al 2%, DTT 0,1 mM).

ES 2 315 442 T3

Las muestras se calentaron a 95°C y después se enfriaron gradualmente a la temperatura ambiente para permitir la hibridación y la formación de estructuras de cadena doble. Las estructuras de cadena doble hibridadas se incubaron durante 10 minutos a 37°C, después se añadieron 5 unidades de RNasa H y se inició la recogida de datos durante un período de tres horas. Los datos se registraron utilizando un espectrofotómetro GBC 920 (GBC Scientific Equipment, Victoria, Australia) a 259 nm. La degradación por la RNasa H se determinó por desplazamiento hipercrómico.

Los resultados se muestran en la Tabla I, a continuación.

TABLA I

Degradación de Oligonucleótidos por la RNasa H

Oligo nº (Características)	Semivida	Oligo nº (Características)	Semivida
GEM91 (todo PO)	8,8 s	Hyb115 (5' MP)	11,5 s
GEM91 (todo PS)	22,4 s	Hyb116 (quimérico)	9,7 s
GEM91H (híbrido)	32,7 s	Hyb117 (quimérico)	8,1 s
Hyb108 (híb. inv.)	15,4 s	Hyb118 (quim. inv.)	11,5 s
Hyb109 (híb. inv.)	7,9 s	Hyb119 (quim. inv.)	14,4 s
Hyb110 (híb. inv.)	10,4 s	Hyb120 (quim. inv.)	9,3 s
Hyb111 (híb. inv.)	12,9 s	Hyb121 (3' MP)	21,2 s
Hyb112 (híb. inv.)	12,5 s	Hyb122 (quimérico)	23,0 s
Hyb113 (híb. inv.)	10,9 s	Hyb123 (quimérico)	41,8 s
Hyb114 (híb. inv.)	20,3 s	Hyb124 (quimérico)	no detect.

Como se esperaba, los oligonucleótidos con enlaces fosfodiéster se comportaron como buenos cosustratos para la degradación de ARN, mediada por la RNasa H, con una semivida de degradación de 8,8 segundos. Los oligonucleótidos con enlaces fosforotioato produjeron un aumento en la semivida de 22,4 segundos. La introducción de un segmento de 2'-O-metilribonucleótido en cualquiera de los extremos del oligonucleótido empeoró aún más la actividad de la RNasa H (semivida = 32,7 segundos). En contraposición, la introducción de un segmento de 2'-O-metilo en medio del oligonucleótido (estructura híbrida invertida) siempre dio lugar a una mejora en la degradación mediada por la RNasa H. Cuando una región de 13 2'-O-metilribonucleósidos con enlaces fosfodiéster estaba flanqueada en ambos lados con ADN con enlaces fosforotioato, se observó la máxima actividad de la RNasa H, con una semivida de 7,9 segundos. La introducción de grandes bloques de nucleósidos unidos por enlaces metilfosfonato en el extremo 3' del oligonucleótido no produjo ningún efecto o provocó un deterioro adicional de la actividad de la RNasa H incluso cuando se encontraban en una configuración quimérica. Sin embargo, la introducción de nucleósidos unidos por enlaces metilfosfonato en el extremo 5' aumentó la actividad de la RNasa H, particularmente en la configuración quimérica con un solo conector de metilfosfonato en el extremo 3' (la mejor semivida = 8,1 segundos). Todos los oligonucleótidos quiméricos invertidos con regiones principales de metilfosfonato flanqueadas por regiones de fosforotioato dieron lugar a buenos resultados de la RNasa, con un intervalo de semivida de 9,3 a 14,4 segundos. Estos resultados indican que la introducción de la estructura híbrida invertida o quimérica invertida en oligonucleótidos que contienen fosforotioato puede restablecer parte o toda la capacidad del oligonucleótido para actuar como cosustrato de la RNasa H, una característica potencialmente importante para un agente antisentido eficaz.

Ejemplo 9

55 *Efecto de la Estructura Híbrida Invertida o Quimérica Invertida en la Temperatura de Fusión*

Para determinar el efecto de la estructura híbrida invertida o quimérica invertida en la estabilidad de la estructura de cadena doble formada entre un oligonucleótido antisentido y una molécula diana, se realizaron los siguientes experimentos. Se registraron los datos de desnaturalización térmica (T_m) utilizando un espectrofotómetro GBC 920, que tenía seis cubetas de 10 mm montadas en un carrusel doble. En los experimentos de T_m se ajustó y controló la temperatura por medio de un controlador de temperatura de efecto Peltier conectado a un ordenador, utilizando el software suministrado por GBC, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos de T_m se analizaron por el método de la primera derivada y por el método del punto medio, con ayuda del software. Los experimentos de T_m se realizaron en un tampón que contenía PIPES 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaCl 1 M. Se conectó un baño refrigerado VWR 1166 (VWR, Boston, MA.) al controlador de temperatura de efecto Peltier para absorber el calor. La concentración de cadenas de oligonucleótido se determinó utilizando los valores de absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta los coeficientes de extinción.

ES 2 315 442 T3

Los resultados se muestran en la Tabla II, a continuación.

TABLA II

Estabilidad de la Estructura de Cadena Doble de los Oligonucleótidos

5

10

15

20

25

30

Oligo nº (Características)	Tm (°C)*	Oligo nº (Características)	Tm (°C)*
GEM91 (todo PO)	72,0	Hyb115 (5' MP)	61,8
GEM91 (todo PS)	63,6	Hyb116 (quimérico)	61,0
GEM91H (híbrido)	67,0	Hyb117 (quimérico)	60,5
Hyb108 (híb. inv.)	76,4	Hyb118 (quim. inv.)	57,9
Hyb109 (híb. inv.)	80,0	Hyb119 (quim. inv.)	57,7
Hyb110 (híb. inv.)	74,2	Hyb120 (quim. inv.)	56,8
Hyb111 (híb. inv.)	76,9	Hyb121 (3' MP)	60,7
Hyb112 (híb. inv.)	72,1	Hyb122 (quimérico)	60,5
Hyb113 (híb. inv.)	74,3	Hyb123 (quimérico)	59,0
Hyb114 (híb. inv.)	71,3	Hyb124 (quimérico)	no detect.

*= con ARN complementario

Estos resultados demuestran que la conversión de un oligonucleótido con enlaces fosfodiéster a un oligonucleótido con enlaces fosforotioato se traduce en una reducción de la estabilidad de la estructura de cadena doble, y que la introducción de enlaces metilfosfonato reduce aún más la estabilidad de la estructura de cadena doble. La estabilidad de la estructura de cadena doble puede restablecerse añadiendo 2'-O-metilribonucleótidos, y puede superar a la del oligonucleótido con enlaces fosfodiéster cuando se utiliza una estructura híbrida invertida. A la inversa, la utilización de una estructura quimérica invertida se traduce en las mínimas temperaturas de fusión observadas para cualquiera de los oligonucleótidos con metilfosfonato que se hibridan, aunque se mantenía la estabilidad de la estructura de cadena doble incluso muy por encima de las temperaturas fisiológicas. En conjunto, estos resultados sugieren que la estructura híbrida invertida o la estructura quimérica invertida pueden utilizarse para el diseño a medida de oligonucleótidos para obtener estabilidades particulares deseadas de la estructura de cadena doble en aplicaciones experimentales o terapéuticas particulares.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un oligonucleótido quimérico invertido que comprende una región oligonucleotídica no iónica entre dos regiones de fosforotioato de oligonucleotídica, en el que las regiones de fosforotioato tienen de 4 a 46 nucleótidos unidos entre sí con enlaces fosforotioato 5' a 3', y en el que la región no iónica tiene de cuatro a doce nucleósidos unidos entre sí por enlaces no iónicos 5' a 3'.

10 2. El oligonucleótido quimérico invertido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido tiene de 12 a 50 nucleótidos.

3. El oligonucleótido quimérico invertido según la reivindicación 2, en el que la región oligonucleotídica no iónica es una región oligonucleotídica con enlaces alquilfosfonato que tiene de 4 a 12 nucleótidos.

15 4. El oligonucleótido quimérico invertido según la reivindicación 3, en el que la región oligonucleotídica con enlaces alquilfosfonato tiene de 4 a 10 nucleótidos.

20 5. Un oligonucleótido quimérico invertido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en la inhibición o modulación de la expresión génica.

25 6. Composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido quimérico invertido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para inhibir o modular la expresión génica.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 315 442 T3

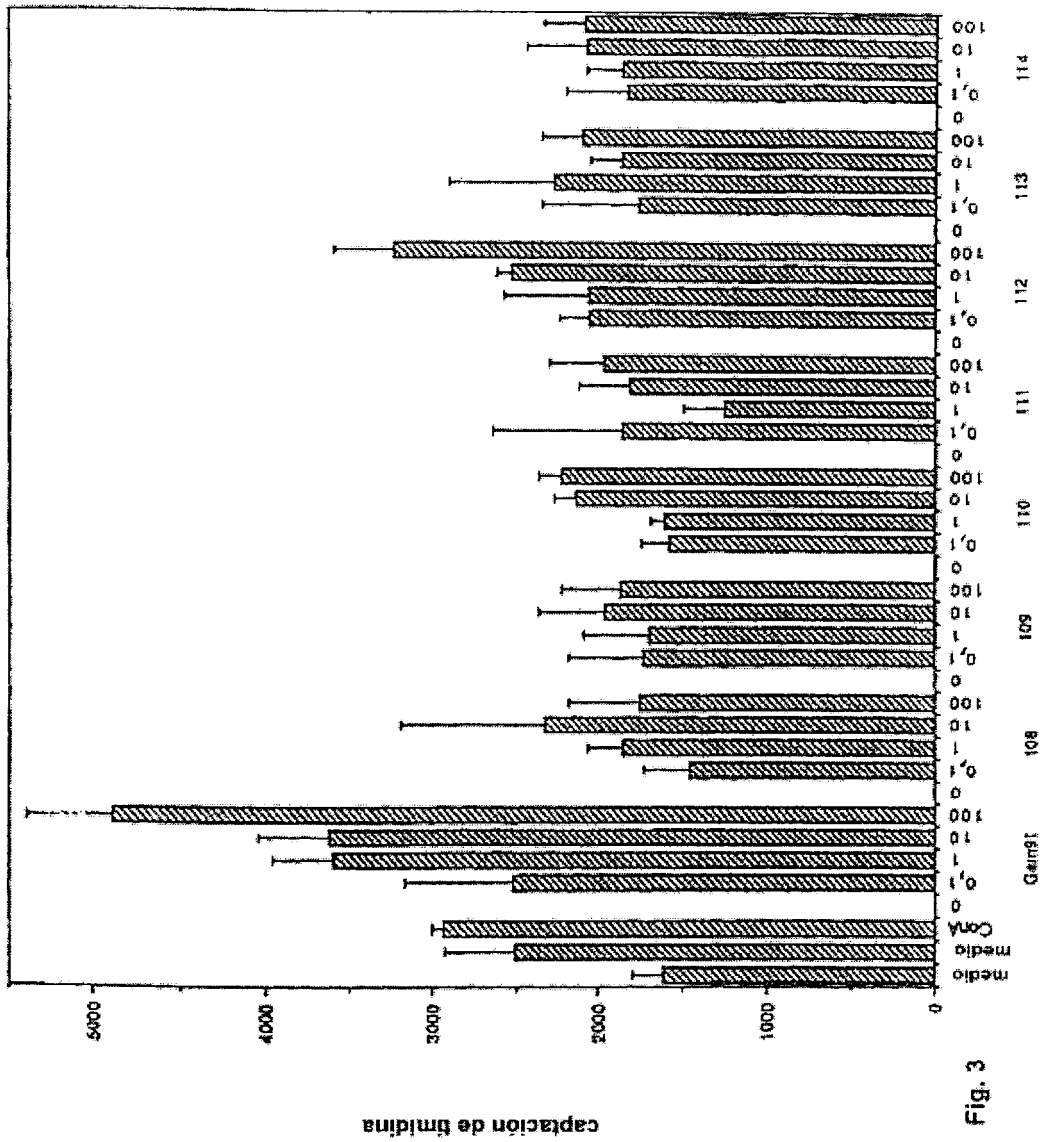
Hyb108	5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC UCC TTC T	[SEC ID n°:1]
Hyb109	5' CTC TCG <u>CAC CCA UCU CUC UCC</u> TTC T	[SEC ID n°:2]
Hyb110	5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC TCC TTC T	[SEC ID n°:3]
Hyb111	5' CTC TCG <u>CAC CCA UCU CUC</u> TCC TTC T	[SEC ID n°:4]
Hyb112	5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC TCC TTC T	[SEC ID n°:5]
Hyb113	5' CTC TCG <u>CAC CCA UCU CUC</u> TCC TTC T	[SEC ID n°:6]
Hyb114	5' CTC TCG CAC CCA UCU CTC TCC TTC T	[SEC ID n°:7]
Gem91-H	5' CUC UCG CAC CCA TCT CTC TCC UUC U	[SEC ID n°:8]
Gem91	5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T	[SEC ID n°:9]
Gem91PO	5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T	[SEC ID n°:10]

Fig. 1

ES 2 315 442 T3

Hyb115	5' <u>CTC TCG</u> CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3'	[SEC ID n°:11]
Hyb116	5' <u>CTC TCG</u> CAC CCA TCT CTC TCC <u>TTC T</u> 3'	[SEC ID n°:12]
Hyb117	5' <u>CTC TCG</u> CAC CCA TCT CTC TCC <u>TTC T</u> 3'	[SEC ID n°:13]
* Hyb118	5' CTC TCG CAC <u>CCA TCT</u> CTC TCC TTC T 3'	[SEC ID n°:14]
* Hyb119	5' CTC TCG CAC <u>CCA TCT</u> CTC TCC TTC T 3'	[SEC ID n°:15]
* Hyb120	5' CTC TCG CAC <u>CCA TCT</u> CTC TCC TTC T 3'	[SEC ID n°:16]
Hyb121	5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC <u>TCC TTC T</u> 3'	[SEC ID n°:17]
Hyb122	5' <u>CTC TCG</u> CAC CCA TCT CTC <u>TCC TTC T</u> 3'	[SEC ID n°:18]
Hyb123	5' <u>CTC TCG</u> CAC CCA TCT CTC <u>TCC TTC T</u> 3'	[SEC ID n°:19]
Hyb124	5' <u>CTT CCT</u> CTC TCT ACC ACA <u>GCT CTC T</u> 3'	[SEC ID n°:20]

Fig. 2



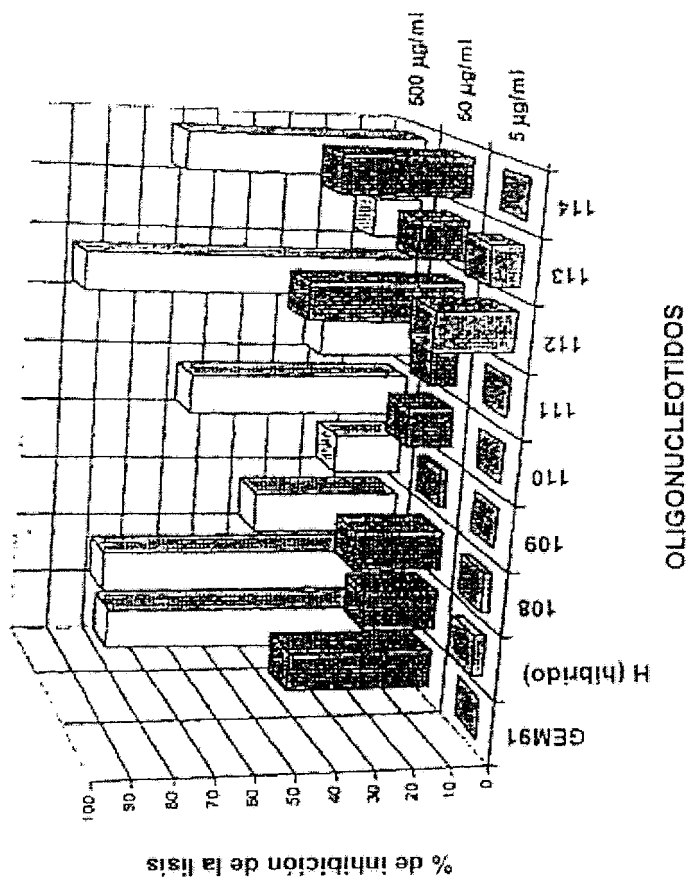


Fig. 4

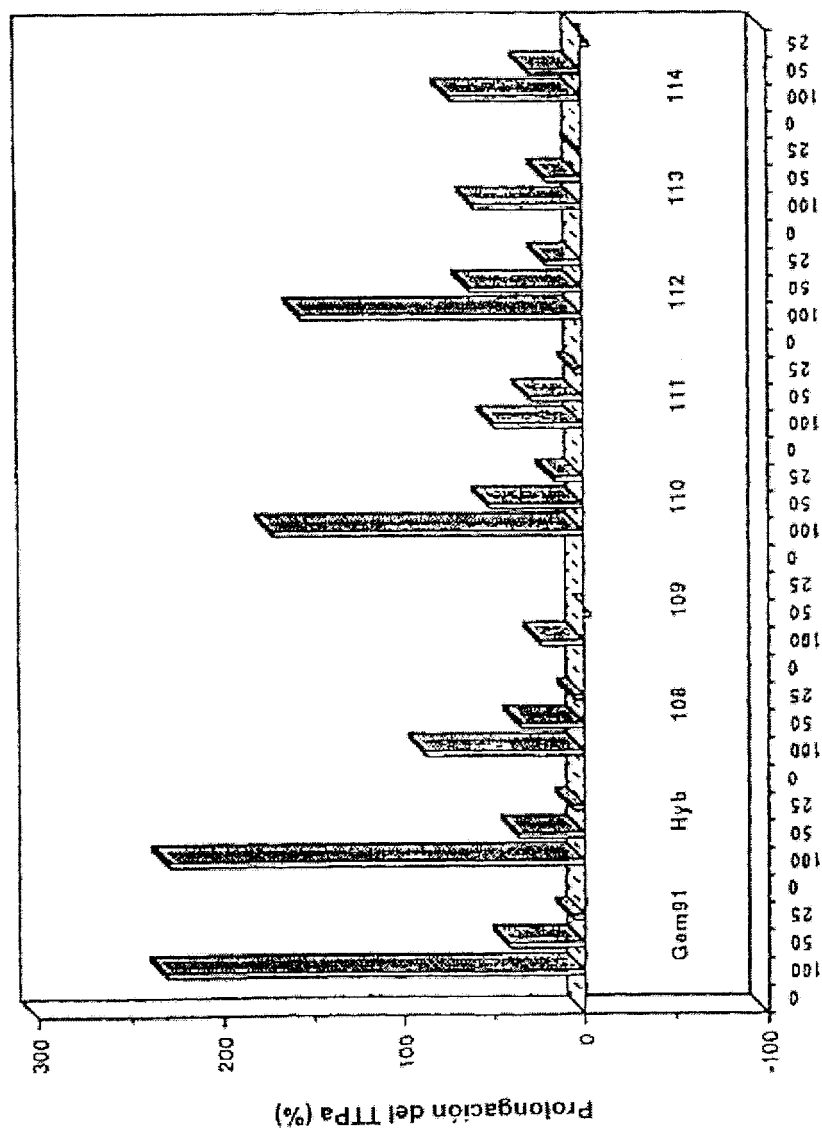


Fig. 5

Concentración (µg/ml)

Datos complementarios a los compuestos HYB0108-0124

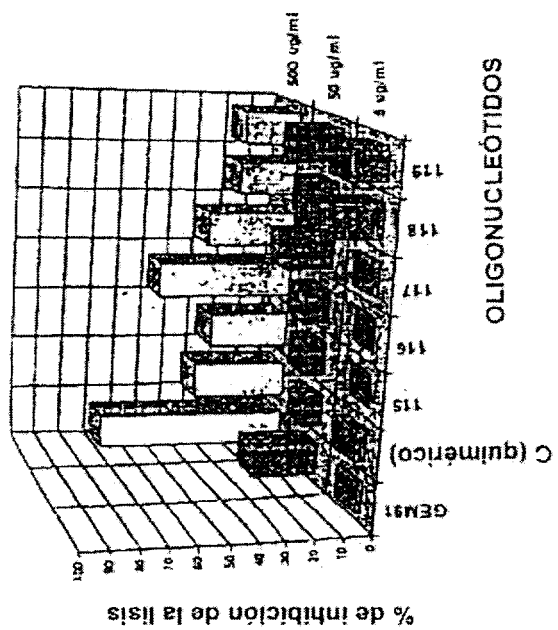
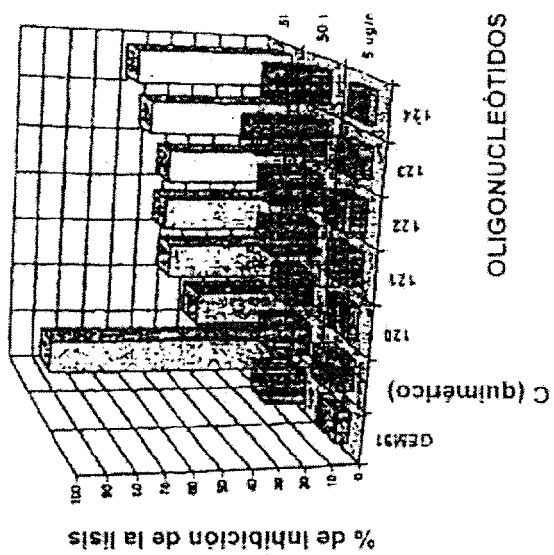
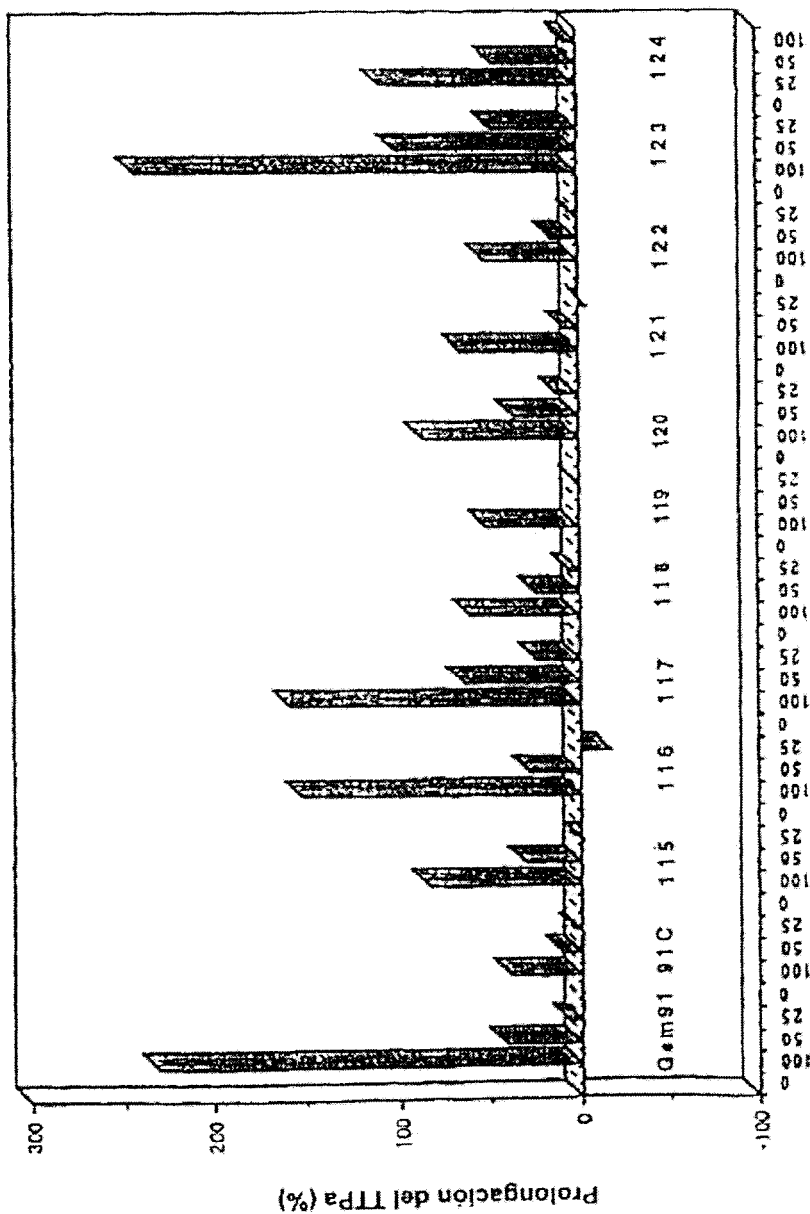


Fig. 7



Concentración (µg/ml)

Fig. 8