

380761



SECCION TECNICA
CLASIFICACION
CLASE <u>C08</u> <u>A61</u>
SUBCLASE <u>F</u> <u>K</u>

380761

PATENTE

DE

INVENCIÓN

por "UN METODO PARA SINTETIZAR POLINUCLEOTIDOS SINTETICOS",  
a favor de la corporación estadounidense THE BOARD OF TRUSTEES  
OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY, domiciliada en  
Stanford University, Stanford, California 94305 (EE.UU.)

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Extracto

Los polinucleótidos que tienen azufre reemplazando uno o más de los átomos de oxígeno enlazados al fósforo, se preparan al polimerizar un mononucleótido en el cual el fósforo está presente en la forma de un tioato de fósforo,

5. foro, que tiene uno o más átomos de azufre enlazados al fósforo. Se utiliza un biocatalizador apropiado para efectuar la polimerización y cuando es necesario, se utiliza asimismo un bioregulador, Los tio-análogos de polinucleótido resultantes tienen acción antivírica incrementada, propiedades incrementadas de inducción de interferencia y/o
- 10.



380761

un efecto beneficioso sobre los tumores.

Descripción

Esta solicitud es una continuación en parte de nuestra solicitud copendiente serial número 833.314, presentada en 14 de Junio de 1.969.

5.

Esta invención se refiere a polinucleótidos sintéticos en los cuales uno o más átomos de oxígeno enlazados a los átomos de fósforo del polinucleótido se sustituyen mediante azufre. La invención se refiere asimis-

10.

mo a los intermediarios utilizados en la síntesis de estos polinucleótidos, a los procedimientos de sintetización de los intermediarios y a la sintetización de los polinucleótidos, a las preparaciones que contienen los polinucleótidos que son útiles para propósitos médicos

15.

o para veterinaria, etc. y a los procedimientos de utilizar los polinucleótidos.

Es conocido que ciertos polímeros, entre ellos ciertos polímeros sintéticos no-nucleótidos (Merigan and Finkelstein Virology, 35, 363, (1.968)] y ciertos polinucleótidos [Lampson, Hilleman y otros, Proceedings National Academy of Sciences, 58, 782, 1.004, 1.719, 2.102, (1.967) y 61, 340 (1.968)] tienen actividad antivírica en razón de su estimulación de las células para producir interferencia. Sin embargo, la efectividad antivírica de tales polinucleótidos ha sido deficiente,

20.

25.

380761



- por ejemplo, ha sido solamente efectiva por cortos períodos de tiempo. Los no-nucleótidos sintéticos, por ejemplo, el pirano (que es un copolímero de ácido maléico de eter divinílico) han mostrado tener efectos antivíricos por
5. largo tiempo, pero no han sido sometidos a biodegradación suficientemente rápida.

Es un objeto de la presente invención proporcionar mejoras en el campo de agentes antivíricos y agentes efectivos para inducir la producción de interferencia.

10. Es un objeto ulterior de la invención proporcionar inertos análogos de polinucleótido sintético que tienen mayor y más actividad antivírica efectiva que los hasta ahora disponibles.

15. Es aún otro objeto de la invención proporcionar polinucleótidos sintéticos que tienen efectos terapéuticos incrementados sobre los tumores.

Los objetos anteriores y otros de la invención serán evidentes de la descripción que sigue y de las reivindicaciones anexas.

20. Descripción general

Lo siguiente servirá como una descripción general de la invención y establecerá asimismo cierta nomenclatura y definirá ciertos símbolos utilizados aquí a continuación.

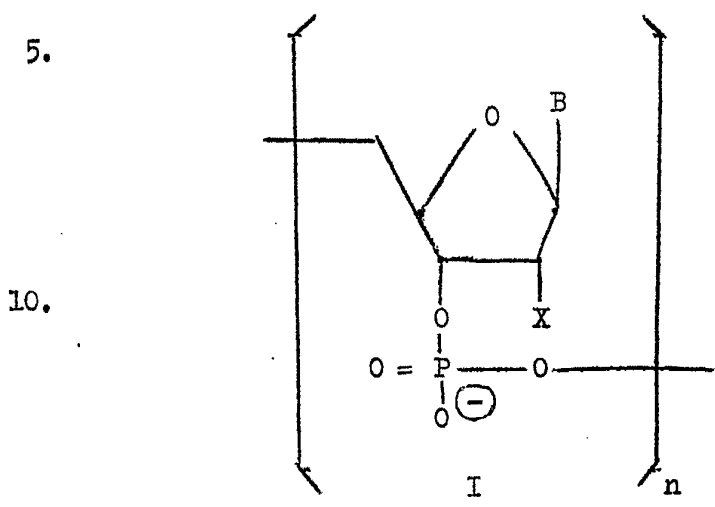
25. En general, los polinucleótidos distintos que

= 4 =

380761



los de la presente invención tienen una fórmula general que puede representarse como sigue:



15. en la que

- n es un número entero,
- X es hidroxilo (por ejemplo, la cantidad de azúcar es ribosa) o hidrógeno (por ejemplo, la cantidad de azúcar es deoxiribosa) y

20. B representa la entidad de base.

Típicamente n tiene un valor grande, por ejemplo, aproximadamente 50 o más. B puede ser cualquiera de las bases de purina o de pirimidina, tal como adenina, citosina, guanina, uracilo, timina, hipoxantina, etc. El polímero puede ser un homopolímero con respecto a la base, por ejemplo, la totalidad de las bases B son idénticas o pueden

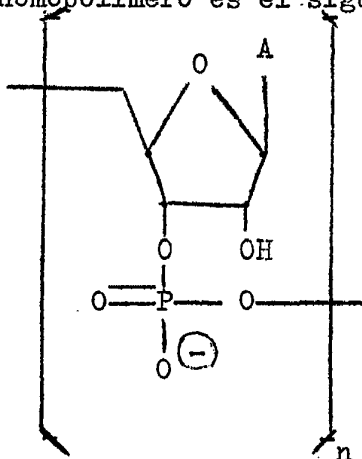
25.



380761

ser hetero con respecto a la base al tener dos o más bases diferentes unidas a la cadena central del polímero. Un ejemplo de un homopolímero es el siguiente:

5.  
10.



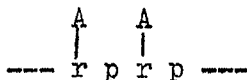
II

en la que

15.

A representa la adenina base. Este polímero puede representarse asimismo por una fórmula simplificada como sigue:

20.



III

en la que

25.

r representa la entidad de ribosa,  
A representa la entidad de adenina y  
p representa la entidad de fosfato.



380761

Esta fórmula puede acortarse ulteriormente de la forma siguiente:

Poli rA

IV

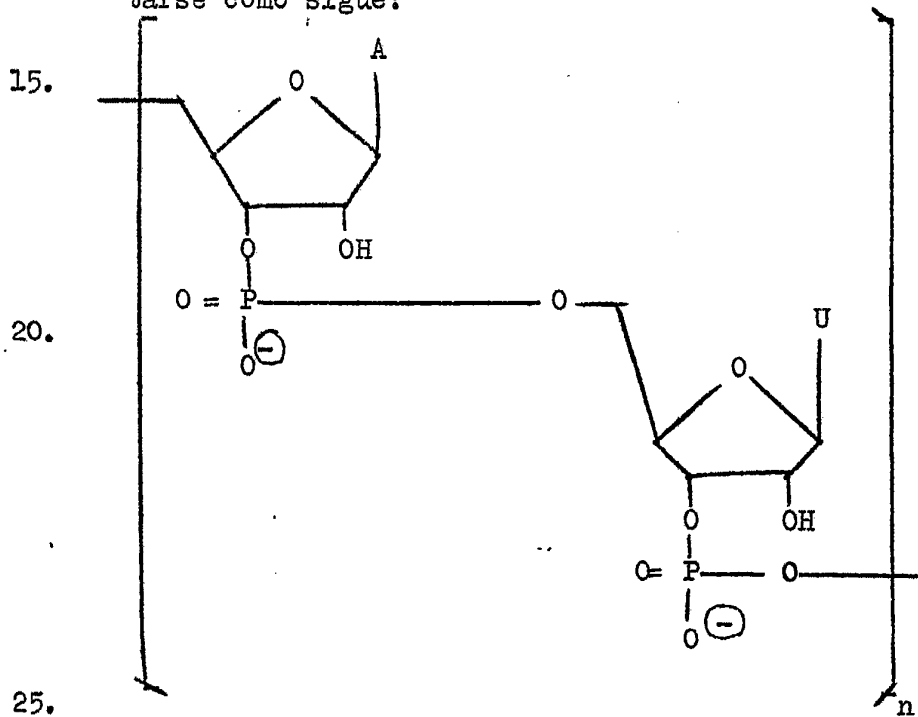
5.

en la que

A y r tienen la misma significación y el prefijo "poli" indica que se repite la unidad rA.

10.

Es de comprender que la entidad de fosfato está asimismo presente. Un heteropolímero en donde, por ejemplo, la adenina y el uracilo bases están enlazados a la cadena central del polímero, puede representarse como sigue:



380761

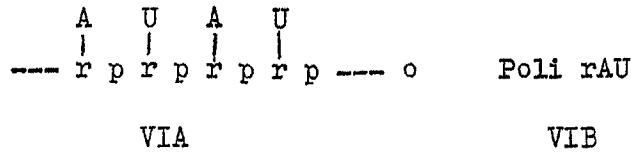


en la que

A y U significan respectivamente las entidades de adenina y uracilo.

Este polímero puede representarse asimismo por las

5. fórmulas:



10.

En las fórmulas I a VIB, la unidad de pentosa puede ser deoxiribosa (d) en lugar de ribosa y la cadena central del polímero puede ser heterogénea con respecto a las unidades de pentosa, por ejemplo, pueden estar presentes tanto unidades de ribosa (r) como de deoxiribosa (d). Asimismo otras unidades

15.

monosacáridas pueden reemplazar la ribosa y deoxiribosa, por ejemplo, xilosa y arabinosa.

20.

Bastante comunmente tales polinucleótidos se asocian como hélices múltiples de ramificación al emparejar base (por ejemplo al ligar hidrógeno) de dos o más ramificaciones de polímero. Así se verificará normalmente poli rAU cuando dos ramificaciones en la forma de una hélice con las unidades A de una ramificación emparejan con las unidades U de la otra, y viceversa. Si se asocian dos ramificaciones de homopolímeros,

25.

por ejemplo, poli rA y poli rU, la hélice se designará como

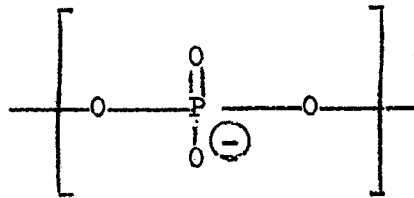
380761



poli rA/rU.

De acuerdo con la presente invención, un número sustancial (preferentemente la mitad o más y más preferentemente todas o sustancialmente todas) las entidades de fosfato.

5.

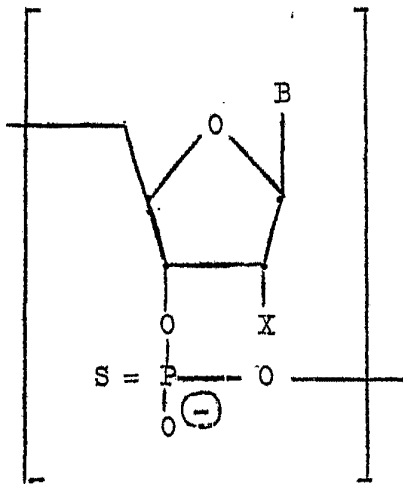


10.

VIIA

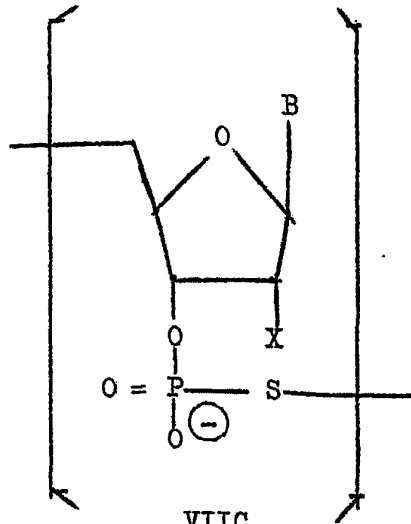
en la cadena polinucleótida se reemplazaran por tio-análogos, así:

15.



20.

VIIB



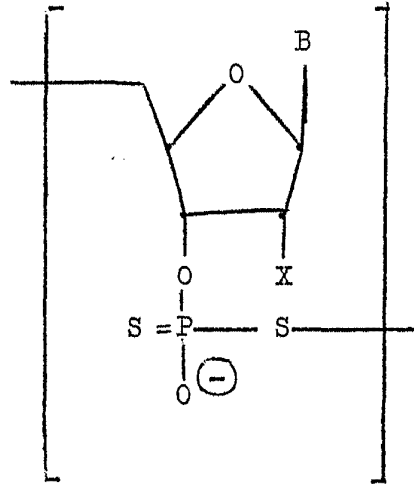
25.

VIIC

380761



5.



10.

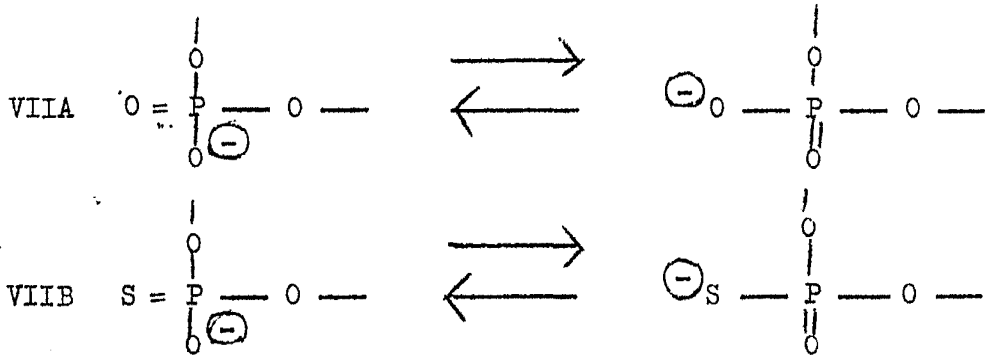
VIID

15.

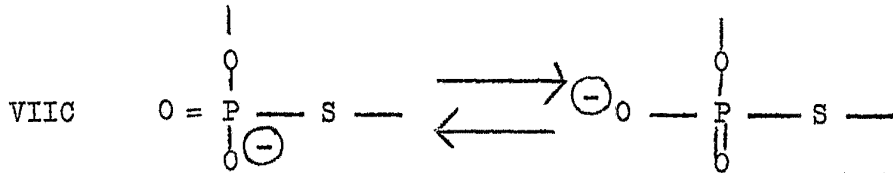
En las fórmulas VIIB, VIIC y VIID, B representa la base y X representa hidrógeno, hidróxilo o hidróxilo sustituido.

20.

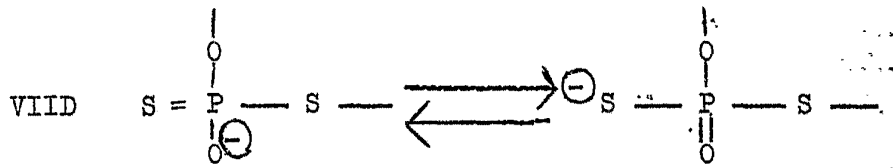
Con referencia a las fórmulas VIIA-VIIB, se comprenderá que el oxígeno doblemente enlazado (VIIA y VIIC) y el azufre doblemente enlazado (VIIB y VIID) están envueltos en tautomerismo como sigue:



380761



5.



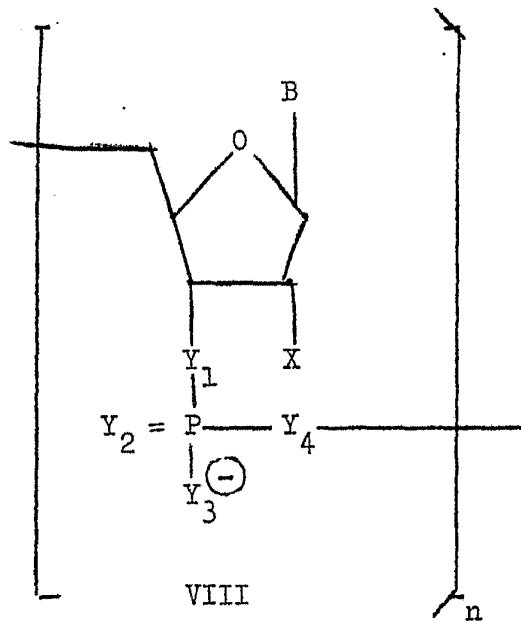
10.

Los polinucleótidos de la presente invención, en su amplio aspecto, comprenden polinucleótidos que tienen la unidad recurrente siguiente:

15.

20.

25.



380761



en la que

5. B es una base de purina o de pirimidina, X es hidrógeno o hidroxilo (o un hidroxilo sustituido), n. es un número entero, por ejemplo de 2 a 2.000, preferentemente de 10 a 1.000 para ramificaciones dobles (ver más abajo) o de 20 a 1.000 para ramificaciones simples.
10.  $Y_1, Y_2, Y_3$  e  $Y_4$  son oxígeno o azufre, siendo azufre por lo menos una de las Y. Se comprenderá que la asignación de un doble enlace a  $Y_2$  y de un simple enlace a  $Y_3$  es arbitraria y que existe un equilibrio tautomérico o una forma híbrida en
15. la que el doble enlace y la carga negativa son compartidos por  $Y_2$  e  $Y_3$ . La entidad de azúcar, ilustrada en VIII por ribosa y sus derivados 2'-hidroxi y deoxiribosa, puede ser reemplazada por otros
20. azúcares como se explica más abajo.
- Tales tio-análogos de polinucleótidos tienen actividad antivírica mejorada y/o capacidad mejorada para estimular células para producir efectos de interferencia y/o
25. efectos terapéuticos mejorados sobre tumores.

380761

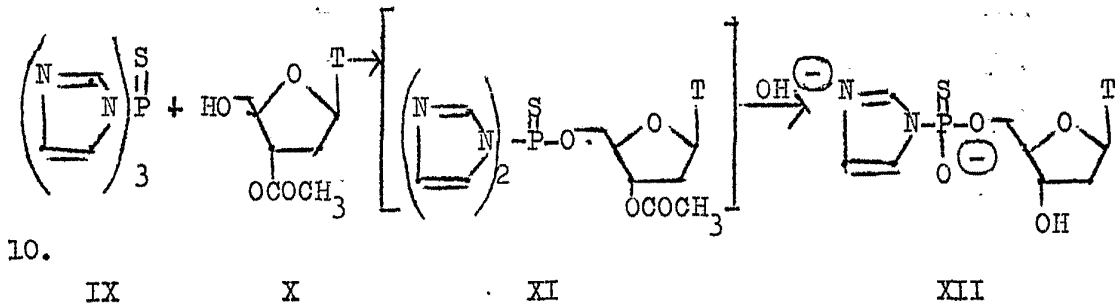


Síntesis de nucleótidos conteniendo S

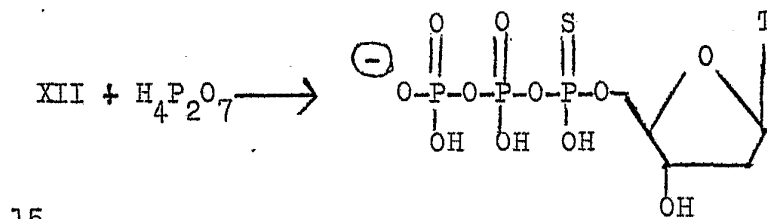
Tipo VIIB

Ejemplo 1

5. Tioato 5'-trifosfórico de 2'-dioxitimidina (XIII) (dTTPS)  
 Las reacciones envueltas son como sigue:



(1)



(2)

380761



En XIII, T significa el radical de timina. El intermediario XI no se separó: Omitida de la ecuación (1) existe una molécula de imidazol producida en la primera etapa reaccional. Omitida de la ecuación (2) existe una molécula de pirofosfato 5. de imidazol.

2 gramos de 3'-O-acetiltimidina (7 milimoles) se disuelven en 20 cc de piridina absoluta y se adiciona a una solución de 3,7 gramos de sulfuro de triimidazolil-fosfina (14 milimoles) disueltos en 150 cc de piridina absoluta. Después 10. de reposar durante la noche, se evapora la piridina y el residuo resultante se agita en 100 cc de amoníaco concentrado. Después de 2 horas se separa por destilación el disolvente y el residuo se sacude en 100 cc de agua (llevada a un pH de 8,5 mediante amoníaco). Después de la evaporación el residuo 15. se recoge en agua y se cromatografía en una columna de DEAE-celulosa. El producto se eluye con gradiente 0,07-0,08 M. Rendimiento: 39.700 A<sub>267m</sub>  $\mu$ -unidades (56%). El producto es homogéneo mediante cromatografía en papel (siendo el disolvente 7:1:2 proporciones en volumen de 2-propanol, amoníaco 20. concentrado y agua) y electroforesis (pH 7,5), donde es idéntico al fosfato de ditimidina (3'  $\rightarrow$  5'). De esto y la reacción descrita en el párrafo siguiente, determinamos que esta sustancia es el monoimidazolidato XII deseado. La timidina se puede utilizar en la reacción (1) en lugar de la 3'-O- 25. acetiltimidina.

380761



- 10.000 A<sub>267m</sub>  $\mu$ - unidades de XII (1 milimol) (sal de triatilemonio) secadas por evaporación con piridina absoluta (3 X), benceno absoluto (1 X) y dimetilformamida absoluta (1 X), se disuelven en 20 cc de dimetilformamida absoluta y
5. se adicionan 2,5 milimoles de ácido pirofosfórico (como sal de tri-n-butilamonio). Después de reposar durante la noche, se centrifuga la mezcla reaccional, el precipitado (pirofosfato de imidazolio) se lava con dimetilformamida y la solución de dimetilformamida se cromatografía sobre una columna de
10. DEAE-celulosa.

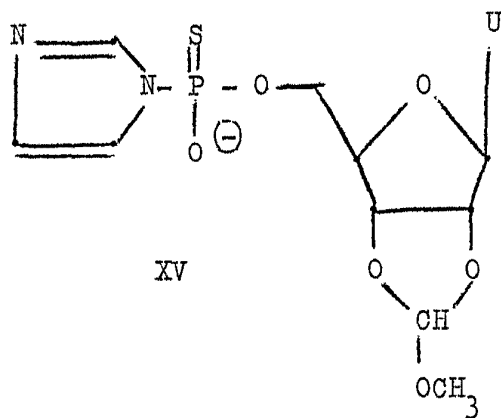
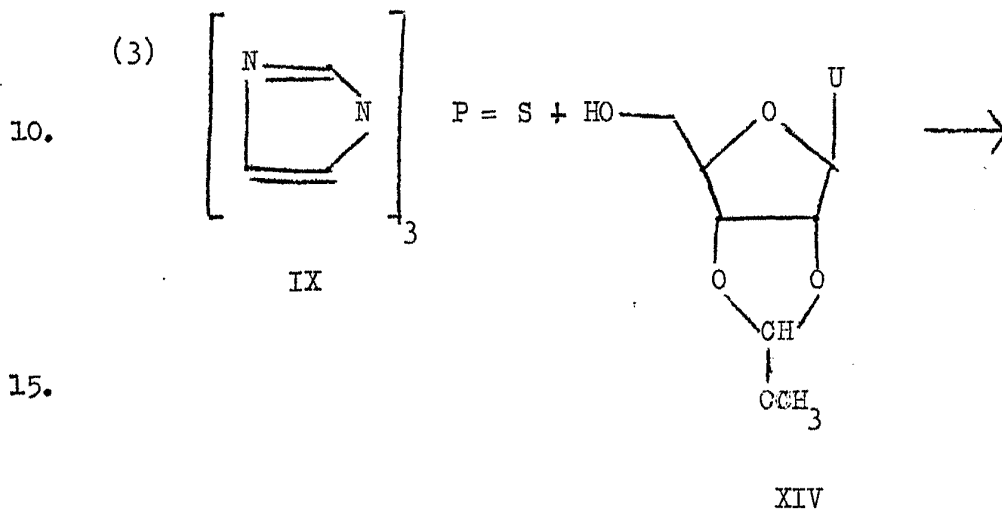
- El producto desecado se eluye con un gradiente de aproximadamente 0,3 M. Rendimiento: 1.700 A<sub>267m</sub>  $\mu$ - unidades (17%). El producto se transforma en la sal de sodio al pasar sobre una columna intercambiadora de iones Merck I
15. (Na + forma); es homogéneo por cromatografía en papel (siendo el disolvente 2:5 proporciones en volumen de acetato amónico 0,5 M llevado a un pH = 3,8 mediante ácido fórmico y etanol) y electroforesis (pH 7,5 y 3,5), en donde es idéntico al 5'-trifosfato de timidina. La determinación de fósforo (ver
20. King, Biochem. J., 93, 292 (1932) muestra timidina: P = 1:2,95. El máximo de absorción de luz en H<sub>2</sub>O a 267 milimicras ( $\epsilon_{267m} \dagger 9.600$ ). La degradación con fosfatasa alcalina E. Coli da tiocato 5'-fosfórico de timidina (aproximadamente 97%) y timidina (aprox. 3%).

380761

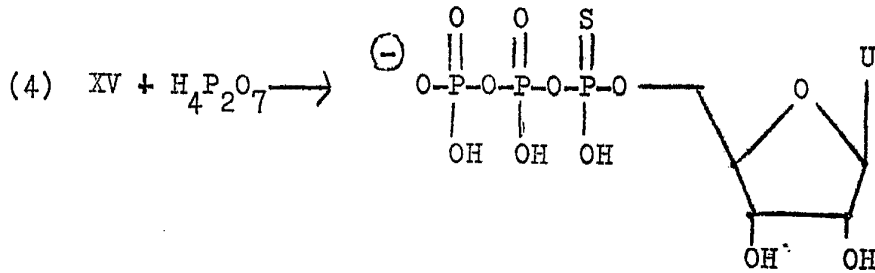
Ejemplo 2Tioato 5'-trifosfórico de uridina (XVI) (rUTPS)

Las reacciones (simplificadas) son como sigue:

5.



380761



5.

XVI

10.

El procedimiento es como en el ejemplo 1 excepto para la sustitución de 2', 3'-O-metoximetiliden uridina (XIV) en lugar de acetiltimidina (X).

Se omite el tratamiento con amoniaco concéntrado.

15. Rendimiento: 54.000  $A_{259 m}$   $\mu$ -unidades (77%). El producto es homogéneo mediante cromatografía en papel (el mismo disolvente que en el ejemplo 1) y electroforesis (pH 7,5), en donde es idéntico al fosfato de diuridina (3'→5').

20.

Los experimentos se realizan esencialmente como en el ejemplo 1. Antes de la cromatografía de intercambio iónico, se elimina el grupo metoximetilénico mediante tratamiento con ácido acético acuoso al 20% durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Rendimiento: 1.570  $A_{259 m}$   $\mu$ -unidades (15%)

25.

El producto es homogéneo mediante cromatografía en papel (disolvente como en el ejemplo 1) y electroforesis, en donde es idéntico al 5'-trifosfato de uridina). El máximo de absorción a la luz en  $H_2O$  a 259 m ( $\epsilon_m = 10.000$ ). (Hallado: C,



380761

15.01; H, 2,90; N, 3,65; P, 12,70; S, 4,02.  $C_9H_{12}O_{14}P_3SNa_3 \cdot 8H_2O$  requiere: C, 15,22; H, 3,97; N, 3,94; P, 13,08; S, 4,51).

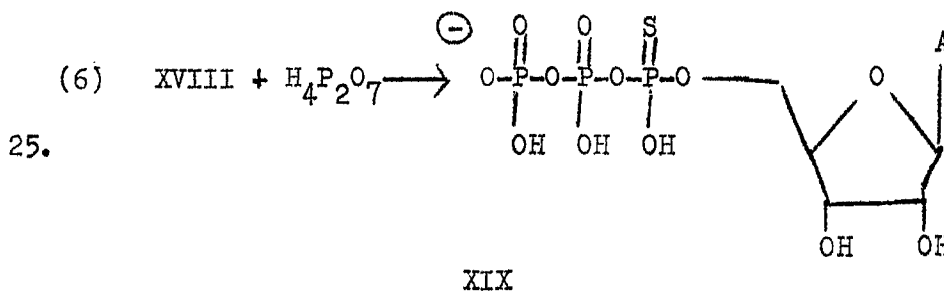
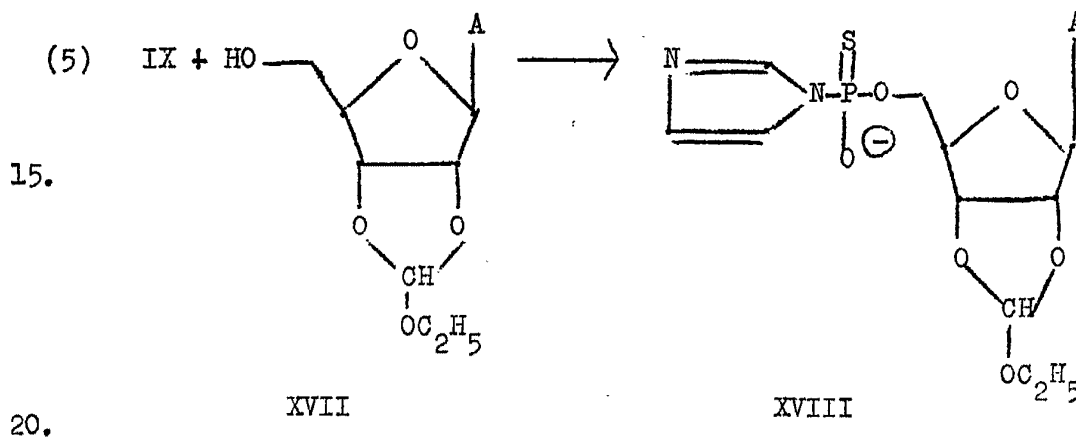
Se degrada mediante fosfatasa alcalina E. Coli para formar

5. tioato 5'-fosfórico de uridina (aproximadamente 97%) y uridina (aproximadamente 3%).

Ejemplo 3

Tioato 5'-trifosfórico de adenosina (XIX) (rATPS)

10. Las reacciones (simplificadas) son como sigue:





380761

La síntesis se realiza como en el ejemplo 2, sustituyendo la 2', 3'-O-etoximetiliden-adenosina (XVII) a la 2', 3'-O-metoximetiliden-uridina (XIV). XIX se purifica en una columna DEAE-Sephadex A25 con bicarbonato trietilamónico

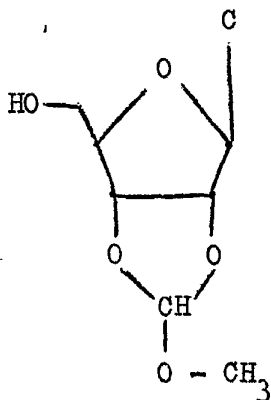
5. 0,3 M.

Ejemplo 4

Tioato 5'-trifosfórico de citidina (XXII) (rCTPS) y tioato 5'-trifosfórico de inosidina (XXIII) (rITPS)

10. Se emplea el procedimiento de los ejemplos 1 y 2 pero sustituyendo los respectivos nucleósidos, 2', 3'-O-metoximetiliden-citidina,

15.



20.

XX

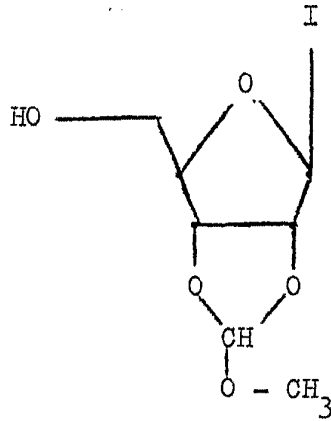
25.

y 2', 3'-O-metoximetiliden -inosina;



380761

5.



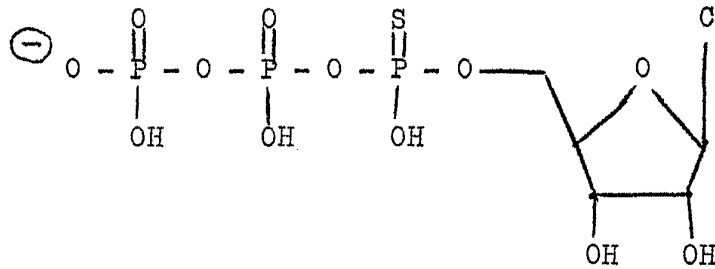
10.

a los nucleóidos de los ejemplos 1 y 2.

15.

Los tiotostriposfóricos resultantes tienen, respectivamente, las fórmulas estructurales siguientes:

20.



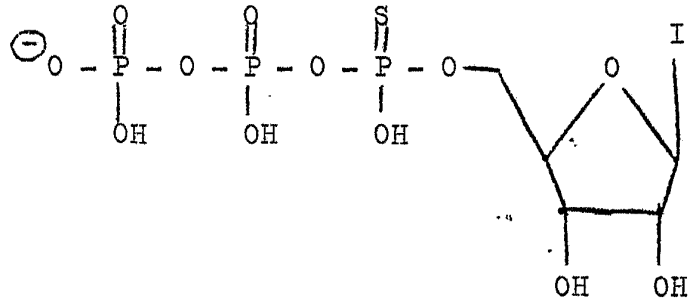
25.

380761



y

5.



10.

XXIII

Síntesis de nucleótidos conteniendo S- tipo VIIC

Ejemplo IA

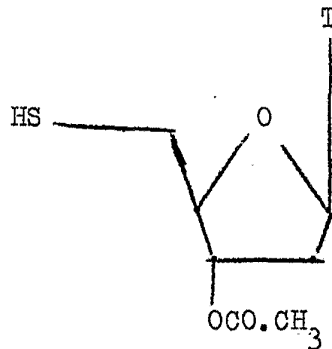
15.

5'-trifosfato de 5'-deoxi-5'-mercapto-2'-dioxitimidina

(VIII A)

Se prepara 5'-deoxi-5'-mercapto-3'-O-acetil-timidina

20.



25.

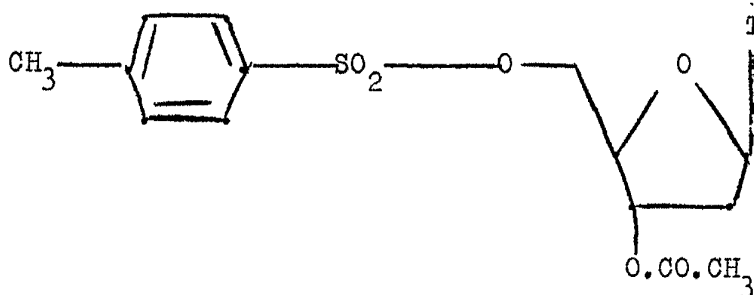
XA

380761



por el método de Baddiley y Kamison, J. Chem. Soc. (Londres), 1.955, pág. 1085, por reacción de 5'-deoxi-5'-p-toluen-sulfonil-3'-O-acetil timidina

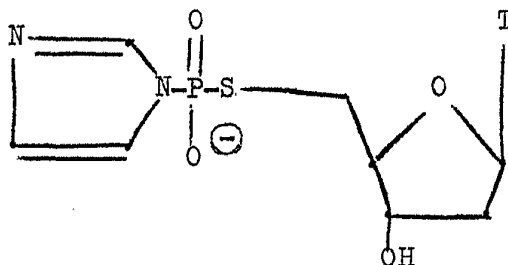
5.



10.

15. con acetato de tiol. XA sustituye a la 3'-O-acetil-timidina (X) y el óxido de triimidazolil-fosfina (IXA) sustituye al sulfuro de fosfina correspondiente; por otra parte, el procedimiento del ejemplo 1 se realiza como se ha descrito. El intermediario XHIA tiene la estructura

20.



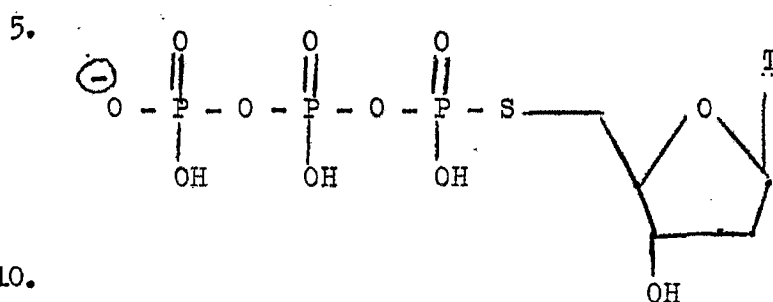
25.

XHIA

380761



El producto final tiene la estructura XIII A



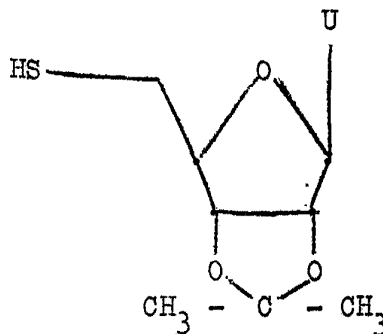
XIII A

Ejemplo 2A

15. 5'-trifosfato de 5'-deoxi-5'-mercapto-uridina (XVIA)

En este caso, se prepara 5'-deoxi-5'-mercapto-2',  
3'-isopropiliden-uridina por el método de Baddiley y Jamison,  
supra. Este tio derivado (XIVA) tiene la estructura

20.



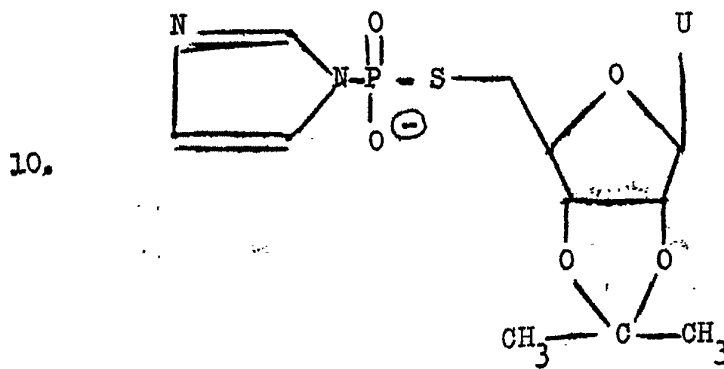
XIVA



380761

XIVA y el óxido de triimidazol-fosfina (IXA) sustituyen a XIV y IX respectivamente, en el procedimiento del ejemplo 2, conduciendo al intermedio XVA

5.

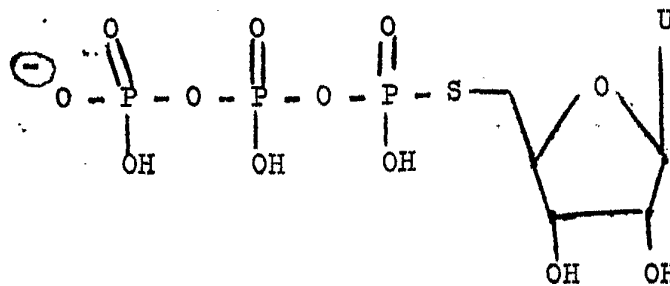


15.

XVA

y al producto final XVIA

20.



XVIA

380761

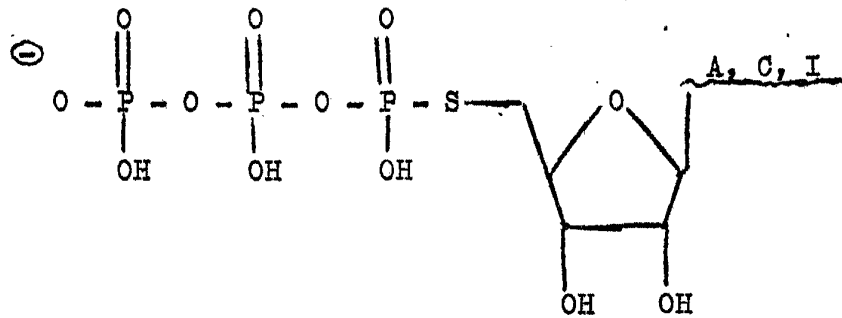


Ejemplos 3A y 4A

5-trifosfatos de 5'-deoxi-5'-mercapto-adenosina, -citidina, y -inosina

Estos tienen las estructuras

5.



10.

XIXA, XXIIA, XXIIIA

15.

donde

- 20.
- A significa adenina,
  - C significa citosina e
  - I significa hipoxantina

25. Se efectúan sustituciones apropiadas en los ejemplos 3 y 4, es decir, el óxido de fosfina IXA se utiliza en lugar del sulfuro de fosfina IX, y los derivados 2', 3'-isopropilidénicos de 5'-deoxi-5'-mercapto-adenina (XVIIIA), 5'-deoxi-5'-mercapto citidina (XXA) y 5'-deoxi-5'-mercapto-ino-



380761

- sina (XXIA) sustituyen a XVII, XX y XXI respectivamente. Los intermediarios correspondientes (es decir, compuesto XVA pero con A, C o I reemplazando U) y los productos finales correspondientes se producen, tal como productos finales
5. que tienen las estructuras anteriormente mostradas, XIXA, XXIIA y XXIIIA.

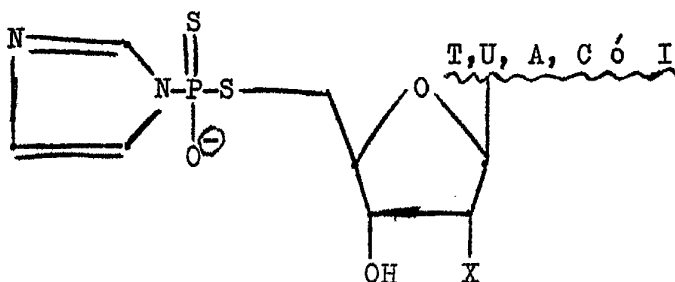
Síntesis de nucleótidos conteniendo S- tipo VIID

Ejemplos IB a 4B

10. En estos ejemplos, se repiten el procedimiento de los ejemplos 1, 2, 3 y 4 pero con las modificaciones siguientes: como en los ejemplos 1A, 2A, 3A y 4A se emplean los derivados 2', 3'-isopropilidénicos de los 5'-deoxi-5'-mercaptoneucleósidos XA, XIVA, XVIIIA y XXA, pero como en los ejemplos
15. 1, 2, 3 y 4 se utiliza sulfuro de triimidazolil-fosfina (IX). Por otra parte, se realizan los procedimientos de los ejemplos 1, 2, 3 y 4 como aquí se ha descrito.

Los derivados de mono-imidazolidato que corresponden a XII en el ejemplo 1 son como sigue:

20.



25.

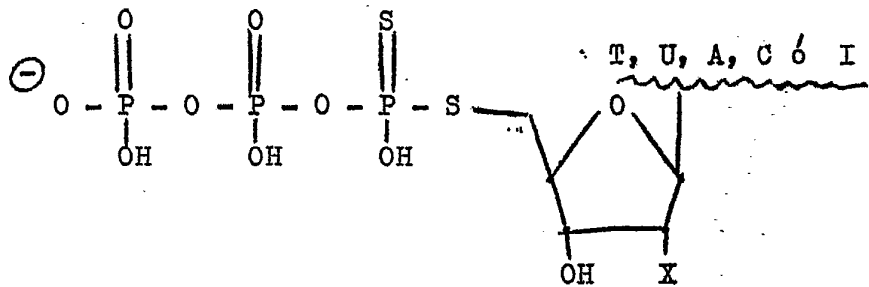
en donde X = H o OH.



380761

Los productos finales son como sigue:

5.



10.

(X = H u OH)

XIIB - tioato 5'-trifosfórico de 5'-deoxi-5'-mercapto-2'-deoxi-timidina

15.

XIVB - tioato 5'-trifosfórico de 5'-deoxi-5'-mercapto-uridina

XIXB - tioato 5'-trifosfórico de 5'-deoxi-5'-mercapto-adenosina

XXIIB - tioato 5'-trifosfórico de 5'-deoxi-5'-mercapto-citidina

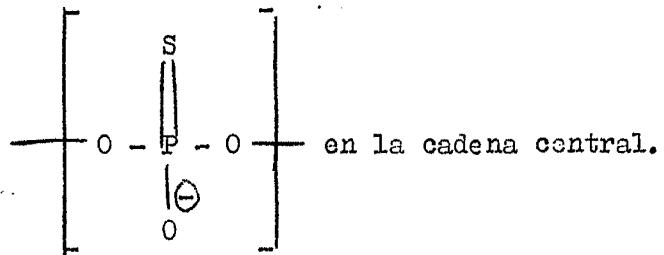
20.

XXIIIIB - tioato 5'-trifosfórico de 5'-deoxi-5'-mercapto-inosina

Polimerización de nucleótidos que contienen S para producir polinucleótidos que tienen



380761



5.

Ejemplos específicosEjemplo 5Poli rASUS (XXIV).

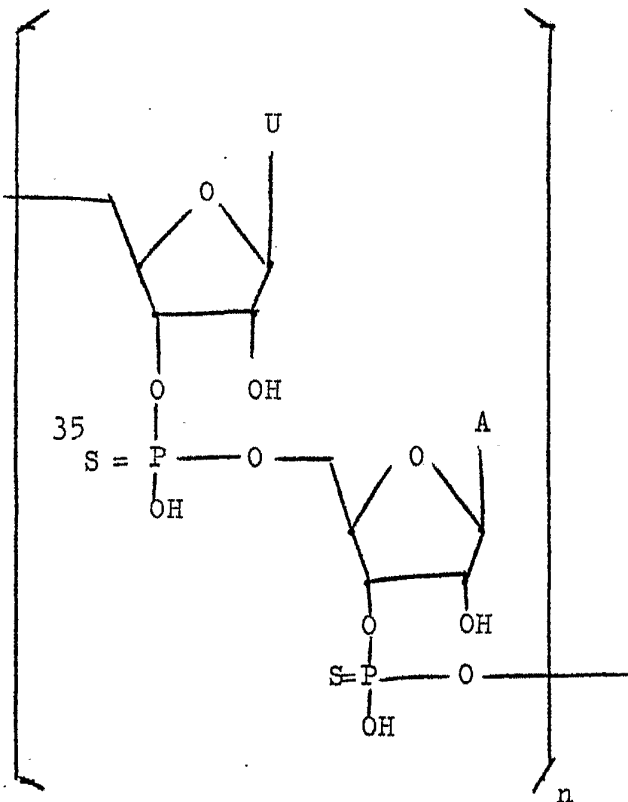
10. Los nucleótidos trifosfóricos XVI y XIX se copolimerizan así:

15.

XVI + XIX →

20.

25.





380761

en donde

n es un número entero, que puede ser, como por ejemplo, de 2 a 1.000.

5. El producto sintetizado tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 = aproximadamente 80 unidades de nucleótido y está doblemente ramificado. Una única ramificación tiene un peso molecular de aproximadamente 15.000 y aproximadamente 40 unidades de nucleótido.

10. Los nucleótidos XVI y XIX con el azufre designado (<sup>35</sup>S) en XIX) se polimerizan al incubarse con poli dAT como un regulador, y polimerasa RNA dependiente de DNA como el catalizador de polimerización.

La mezcla de polimerización consta de lo siguiente:

15. 68  $\mu$  litros de XVI (44  $\mu$  moles/cc) = 3  $\mu$  moles  
460  $\mu$  litros de XIX (6,5  $\mu$  moles/cc) = 3  $\mu$  moles  
600  $\mu$  litros de poli dAT (10 OD/cc) = 6 OD (unidades de densidad óptica)
20. 300  $\mu$  litros de polimerasa RNA dependiente de DNA (1 mg de proteína/cc, actividad específica 1.400) = 420 unidades  
240  $\mu$  litros de acetato magnésico (0,1 M)  
300  $\mu$  litros de medio tampón estándar (solución de tris-NH<sub>4</sub>Cl = 1,2 M de NH<sub>4</sub>Cl, 0,3 tris. HCl pH 7,9)
25. 1.032  $\mu$  litros de H<sub>2</sub>O  
3.000  $\mu$  litros total

380761



Esta mezcla se incubaba a 37°. Después de 11 horas se adiciona durante 10 minutos 600  $\mu$ litros de solución de DNase (aproximadamente 1 mg de DNase I (Worthinton, grado DPFF) en un cc de tampón de acetato 0,1 M, pH 4,0). Luego se separa la

5. proteína por extracción con cloroformo/alcohol iso-amílico. La capa acuosa se concentra a aproximadamente 0,5 cc y se cromatografía sobre una columna Sephadex G25.

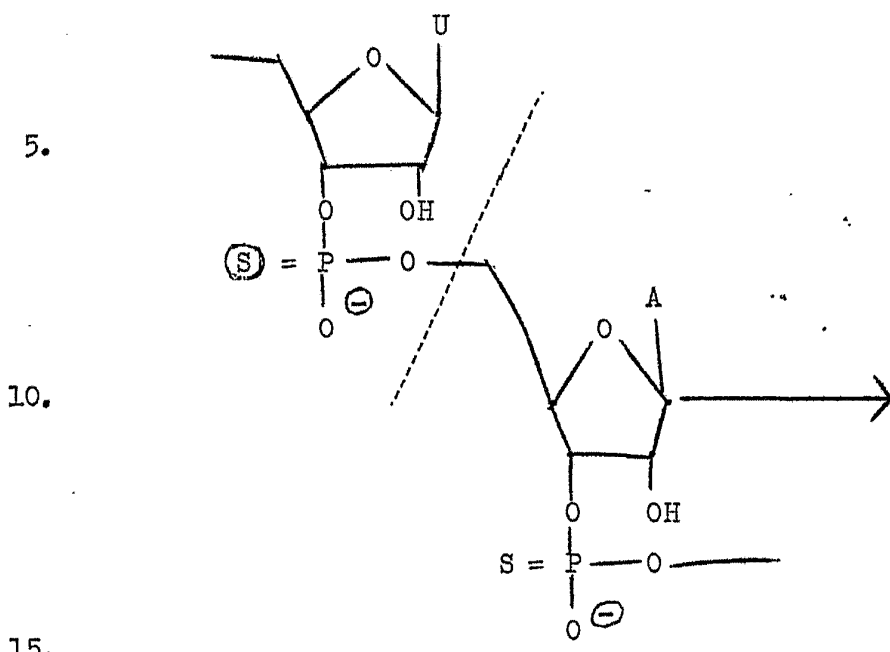
El material eluido con volumen a vacío se cromatografía sobre una columna Sephadex G100. El producto polimérico

10. eluido en el volumen a vacío se libera de la sal mediante cromatografía sobre una columna Sephadex G25. Rendimiento 6,93 OD de poli rAS<sup>35</sup>. US (XXIV).

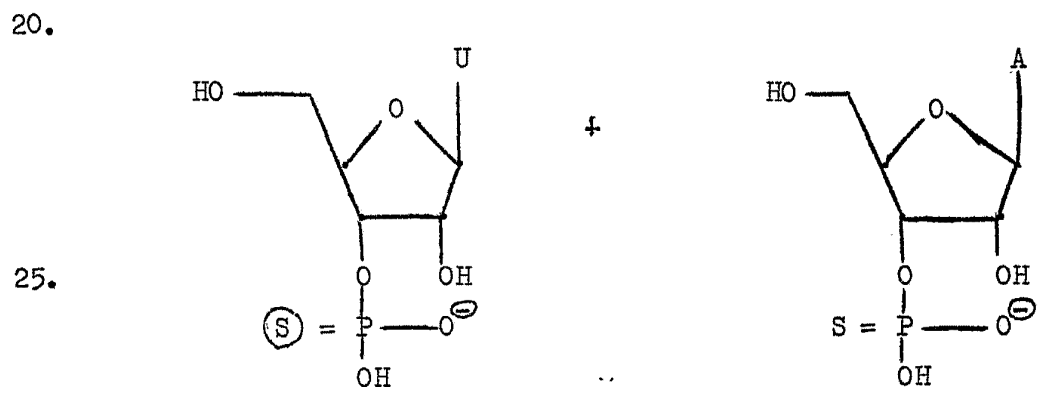
El poli rAS.US (XXIV) resultante tiene una  $\lambda_{max}$  (H<sub>2</sub>O, pH 6,5) = 259 milimicras,  $\lambda_{min}$  = 232 milimicras.

15. La T<sub>m</sub> es 49° en citrato sódico, 0,01 M, pH 7,5, que es idéntico con la T<sub>m</sub> para polirAU (48°) bajo estas condiciones. Un análisis más conciso por degradación alcalina de este poli rAS<sup>35</sup>.US muestra transferencia completa de la marca a 2' (3') - UMPS (XXI) así:

380761



XXIV



XXV

XXVI

3-5-77

380761



Además, se obtienen 2'-isómeros. En esta reacción, la línea de trazos indica el punto de separación y el azufre dentro de un círculo es el azufre marcado,  $^{35}\text{S}$ , que se deriva del tioato 5'-trifosfórico de adenosina (XIX) y termina en la uridina (XXIV) bajo degradación.

Una comparación de las cinéticas de degradación de poli rAU y de poli rAS. US se muestra en las figuras 1 a 5 de los dibujos para 5 nucleasas diferentes. Las cantidades por minuto (medidas por un contador de centelleo y producidas por el azufre radioactivo) son una medida de la cantidad de polímero no degradado. Ver Eckstein y Gindl, FEBS Letters, 2, 262 (1.969).

Ejemplo 6

Poli r CSIS (XXVII)

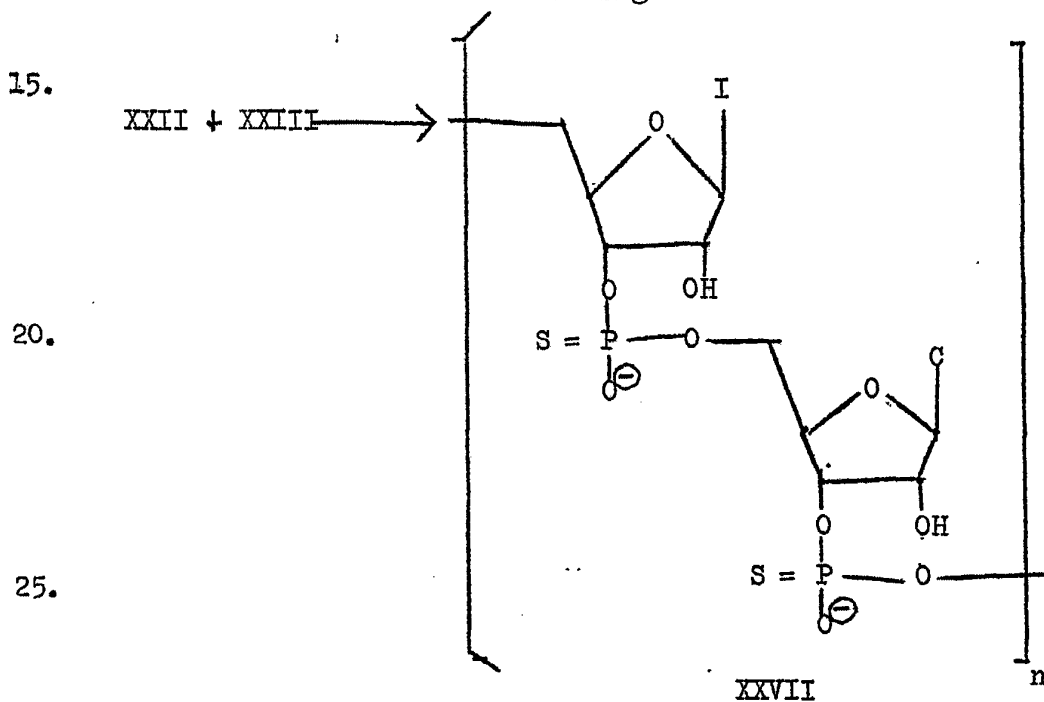
15. La mezcla de incubación consta de:  
 200  $\mu$  litros de tris-acetato (0,3 M, pH 7,9)  
 200  $\mu$  litros de acetato de manganeso (0,1 M)  
 450  $\mu$  litros de  $^{35}\text{S}$ -rITPS (XXIII) (20  $\mu$  moles/cc) =  
 9  $\mu$  moles
20. 257  $\mu$  litros de  $^{35}\text{S}$ -rCTPS (XXII) (35  $\mu$  moles/cc) =  
 9  $\mu$  moles  
 200  $\mu$  litros de polimerasa RNA (7,5 mg de proteína/cc,  
 actividad específica 1.140)  
 693  $\mu$  litros de  $\text{H}_2\text{O}$
25. 2.000  $\mu$  litros

380761



La mezcla se incubaba a 37°. Después se adiciona aproximadamente durante 66 horas, un cc de H<sub>2</sub>O, seguido por 2 cc de una solución al 2% de sulfato dodecil sódico en tris-acetato 0,01 M. (pH 7,4). Esta solución se extrae 5. (3 x) con cloroformo (alcohol isoamílico). Las capas acuosas combinadas se concentran a aproximadamente 0,5 cc, y se cromatografía sobre una columna Sephadex G-25. El material eluido con el volumen a vacío se cromatografía sobre una columna Sephadex G-200. Este material polimérico se libera de la sal por cromatografía sobre una columna 10. Sephadex G-25. Rendimiento aproximadamente 1,5 OD (252) poli rISCS.  $\lambda_{max}$  (X<sub>2</sub>O, pH 6,5) 262 milimicras, hombros a 252 milimicras,  $\lambda_{min}$  228 milimicras.

La reacción es como sigue:

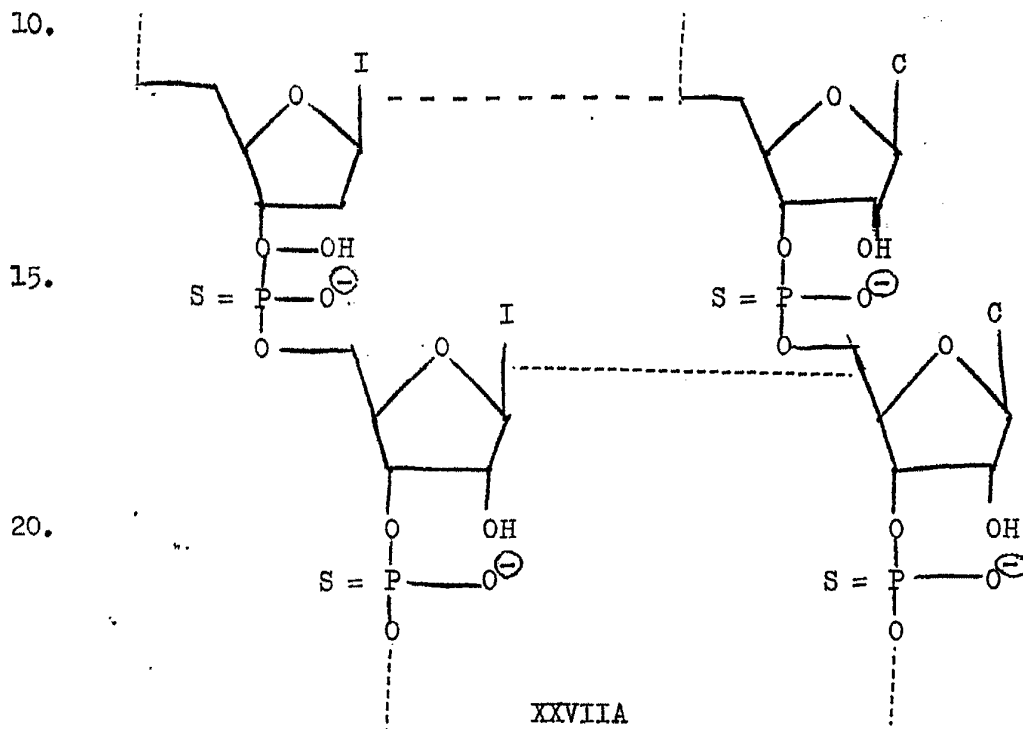




380761

Ejemplo 6APoli rCS/IS

- Puede prepararse poli rCS y poli rIS por polimerización de rCDPS o rIDPS respectivamente con fosforilasa de polinucleótido bacteriano sin regulador como se describe para el poli rUS por F. Eckstein y H. Gindl, FEBS-Letters 2 (1.969) 262. Los polinucleótidos de ramificación único así preparados pueden recocerse al polinucleótido rCS/IS doblemente ramificado.





380761

En la fórmula de XXVIIA (poli rCS/IS), las líneas de trazos entre las ramificaciones de poli rIS y poli rCS indican emparejamiento de base.

Ejemplo 6B

5. Preparación de poli rISC (XXVIIIB)
- La mezcla de incubación consta de lo siguiente:
- 120  $\mu$ litros de tris-acetato (aproximadamente 0,3 pH 7,9)
10. 120  $\mu$ litros de acetato de manganeso (aproximadamente 0,15 M)
- 540  $\mu$ litros de  $^{14}\text{C}$ -CTP (10  $\mu$ moles/cc) aproximadamente 5,4 cc
- 540  $\mu$ litros de ITPS (XXIII) (10  $\mu$ moles/cc) aproximadamente 5,4 milimoles
15. 120  $\mu$ litros de polimerasa RNA (3,75 mg de proteína/cc actividad específica 1.140)
- 1.440  $\mu$ litros total

Esta mezcla se incubaba a 37°. Después de aproximadamente 43 horas se adiciona un cc de H<sub>2</sub>O, seguido por 2 cc de una solución al 2% de dodecilsulfato sódico en tris-acetato 0,01 M (pH 7,4). Esta solución se extrae (3 x) con cloroformo/alcohol isoamílico. Las capas acuosas combinadas se concentran aproximadamente a 0,5 cc y se cromatografía sobre una columna Sephadex G. 25. El material eluido con el volumen a vacío se recromatografía sobre una columna Sephadex G.100. Este material polimé-

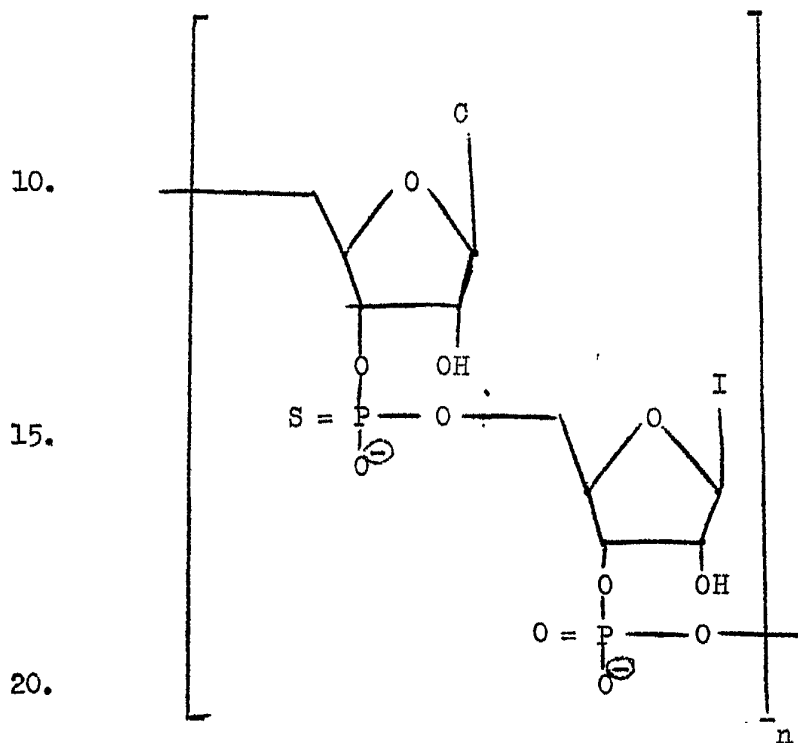


380761

rico se libera de la sal por cromatografía sobre una columna Sephadex G.25. Rendimiento 6,040D(252) de poli rISC.

Lamda<sub>max</sub> (H<sub>2</sub>O, pH 6,5) 252 milimicras, lamda<sub>min</sub> 228 milimicras. La T<sub>m</sub> es aproximadamente 57° en citrato sódico 0,1

5. M, pH 7,5. La estructura es como sigue:



Ejemplos 5A, 5B, 5C y 5D

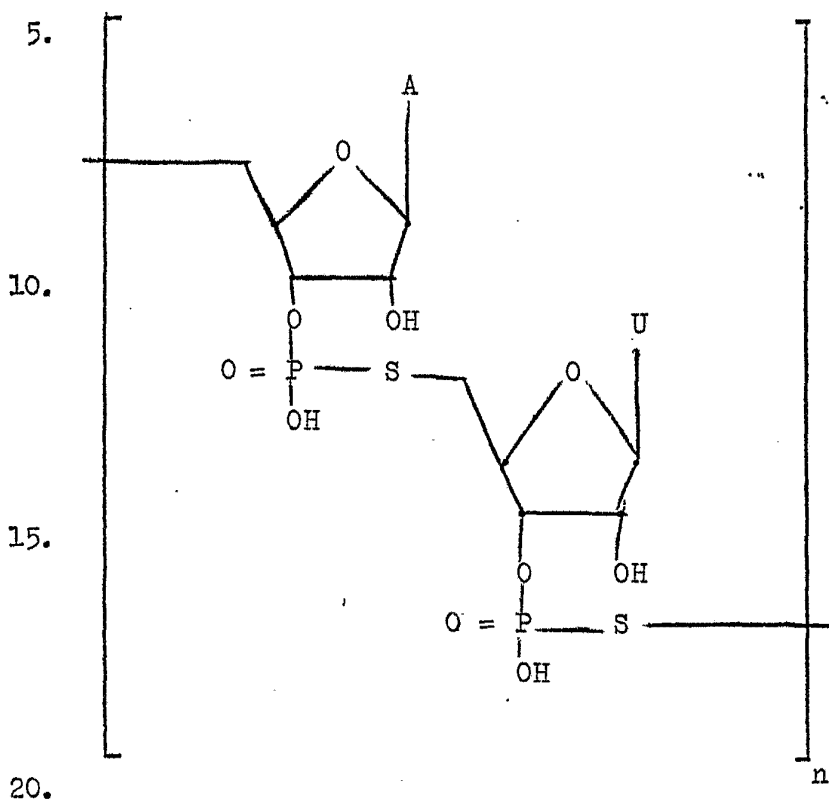
En estos ejemplos se efectúan sustituciones en el procedimiento del ejemplo 5, como sigue:



380761

Ejemplo 5A

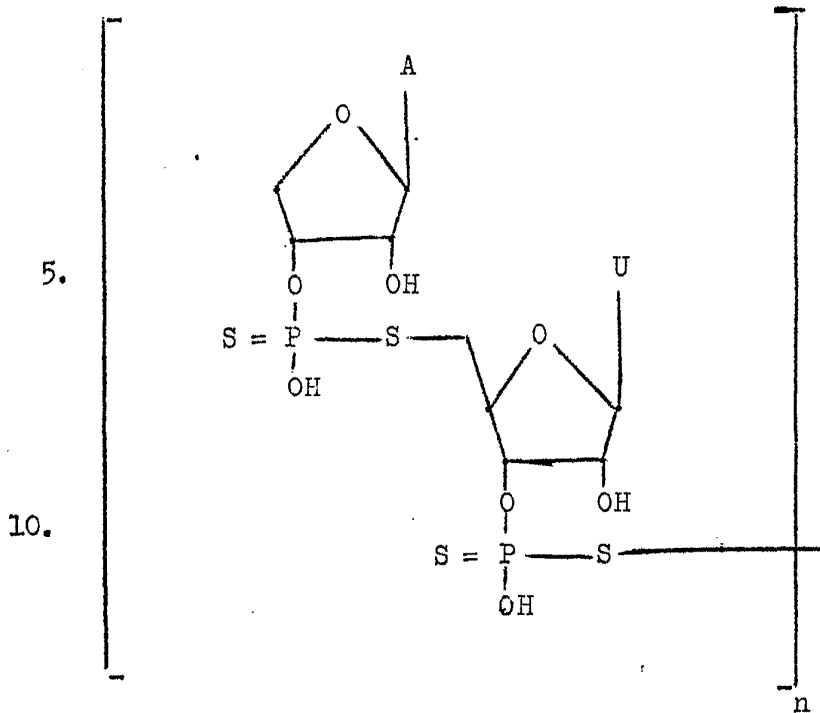
XVIA y XIXA sustituyen a XVI y XIX, respectivamente, conduciendo a lo siguiente:



Ejemplo 5B

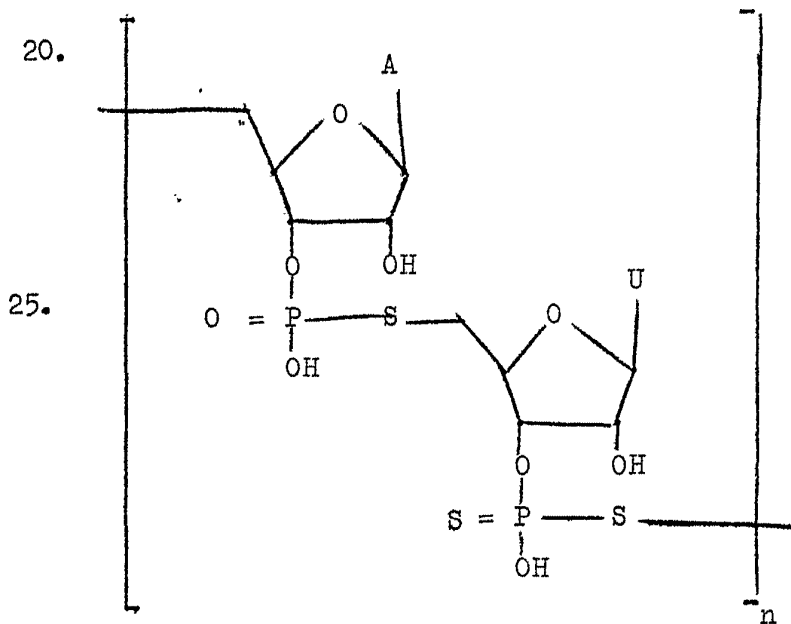
XVIB y XIXB sustituyen a XVI y XIX, respectivamente, conduciendo a lo siguiente:

25.



15. Ejemplo 5C

XVIA y XIXB se utilizan en lugar de XVI y XIX respectivamente, conduciendo a lo siguiente:

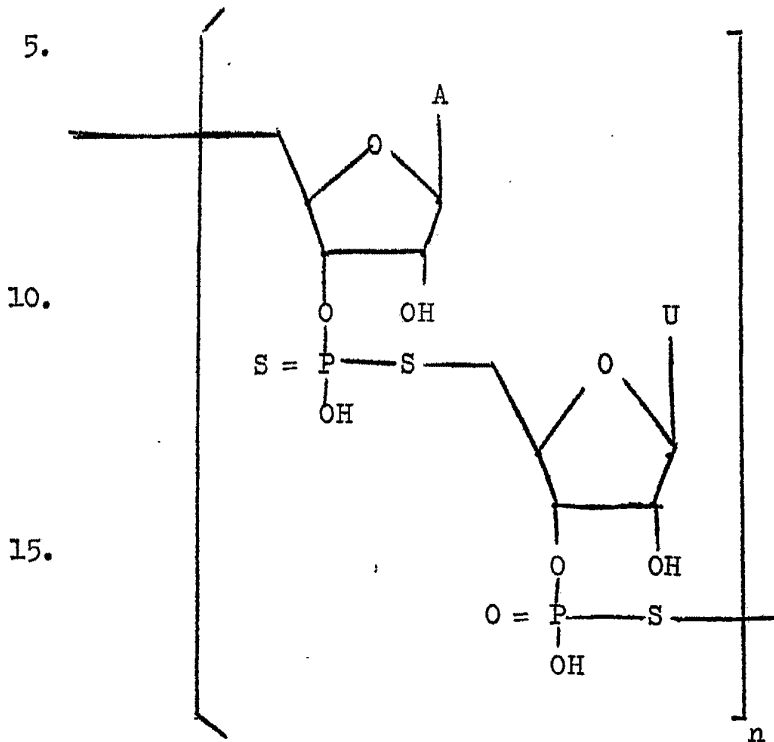




380761

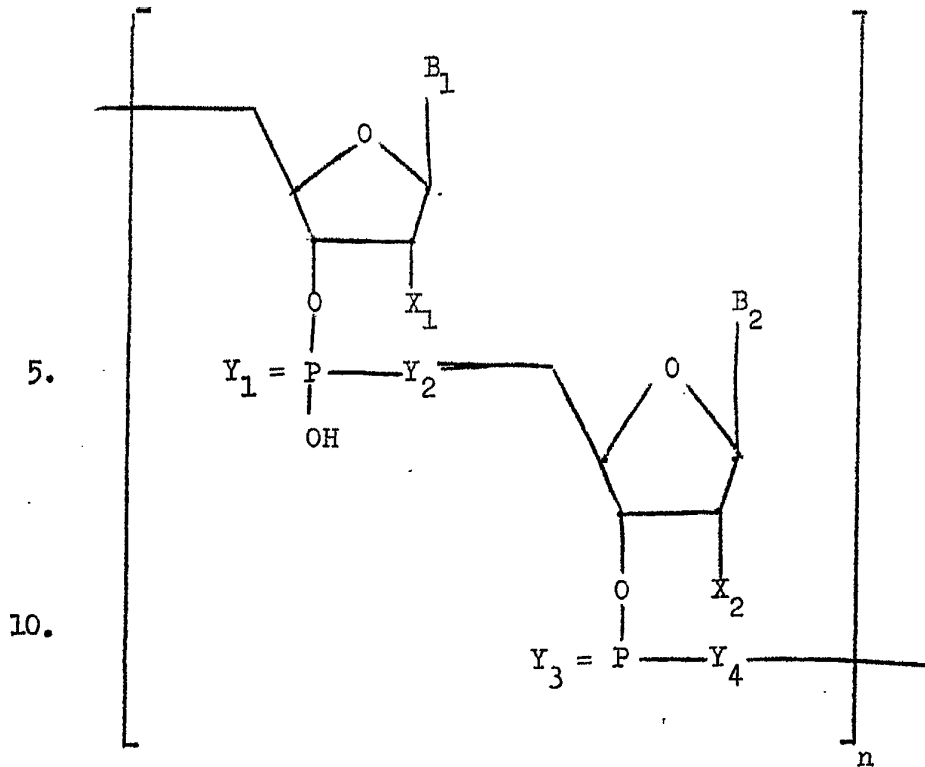
Ejemplo 5D

XVIB y XIXA se utilizan en lugar de XVI y XIX, respectivamente, conduciendo a lo siguiente:



Será evidente de lo anterior que son utilizables una gama de polímeros que pueden producirse por varias combinaciones de los fosfatos y tioatos fosfóricos XIII, XIII A, XIII B, XVI, XVI A, XVI B, XIX, XIX A, XIX B, XXII, XXII A, XXII B, XXIII, XXIII A, y XXIII B. Tales combinaciones conducen a una clase de polímeros caracterizada como sigue:

380761



15. en la que
- B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son las mismas bases de purina o pirimidina o diferentes,
- X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son hidrógeno, hidroxilo o hidroxilo sustituido (X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes), e
20. Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> e Y<sub>4</sub> son oxígeno o azufre siendo azufre por lo menos una de las Y.

Por analogía con la terminología poli rASUS (ejemplo 5) poli rCSIS (ejemplo 6) y poli rCS/IS (ejemplo 6A) puede utilizarse una terminología modificada como sigue:

25.

380761



- poli r AOSUOS = polímero de XVIA y XIX A
- poli r ASSUSS = polímero de XVIB y XIXB
- poli r COSIOS = polímero de XXIIA y XXIIIA
- poli r CSSISS = polímero de XXIIB y XXIIIB
- 5. poli r COS/IOS = ramificación doble de polímero de XXIIA y polímero de XXIIIA
- poli r CSS/ISS = ramificación doble de polímero de XXIIB y polímero de XXIIIB

- En la lista anterior de polímeros, donde quiera que un átomo de oxígeno o de azufre esté subrayado así, O o S, significa que el átomo de oxígeno o el átomo de azufre forman una parte de la cadena central del polímero (es decir, entra en formación de éster) y conecta un átomo de fósforo a la posición 5' de la entidad de azúcar. Aquellos átomos de oxígeno y de azufre que no están subrayados, son átomos ligados al fósforo pero que no forman una parte de la cadena central del polímero (es decir, no entrar en formación de éster). Por ejemplo análogos de poli r CI y poli rC/rI de acuerdo con la presente modificación y con referencia al ejemplo 6 (poli r CSIS) y 6A (poli rCS/rIS) se preparan y tienen estructuras como sigue:
- 10.
  - 15.
  - 20.

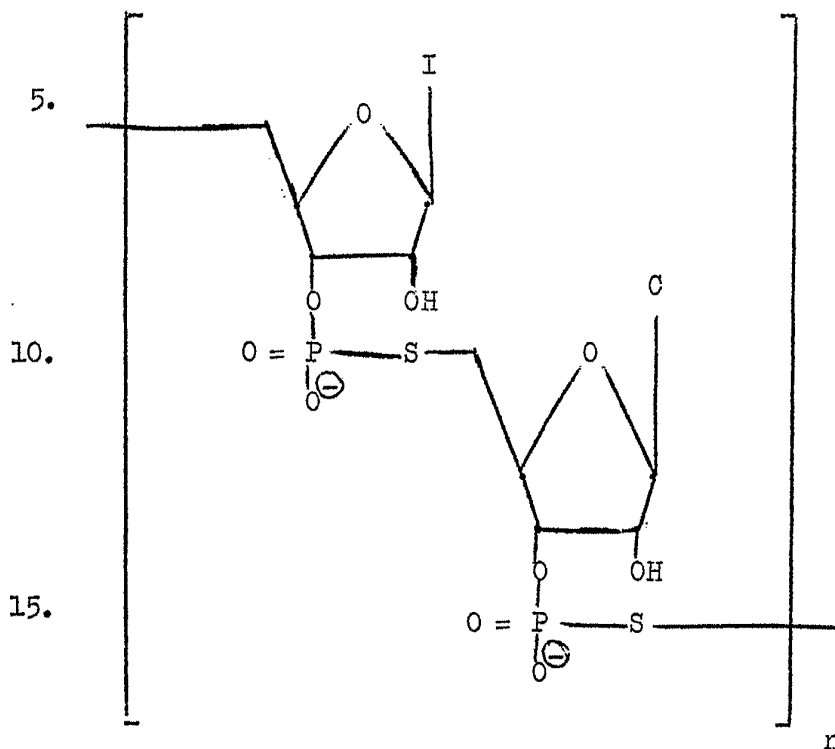
Poli rCOSIOS

- En el procedimiento del ejemplo 6, 5'-trifosfato de 5'-deoxi-5'-mercapto-citidina sustituye al rCTPS y el 5'-trifosfato de 5'-deoxi-5'-mercapto-inósina sustituye al rITPS. La es-
- 25.

380761



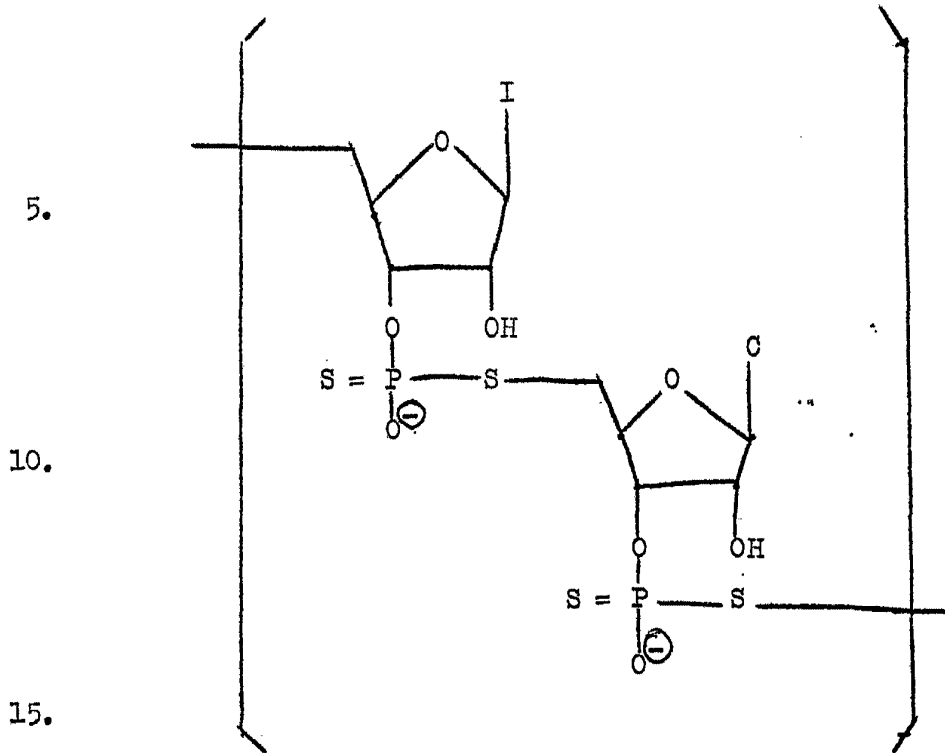
estructura de r COSIOS es como sigue:



20. Poli rCSSISS

En el procedimiento del ejemplo 6, el tioato 5'-trifosfórico de 5'-deoxi-5'-mercapto-citidina sustituye al rCTPS y el tioato 5'-trifosfórico de 5'-deoxi-5'-mercapto-inosina sustituye al rITPS. La estructura del poli rCSSISS es como sigue:

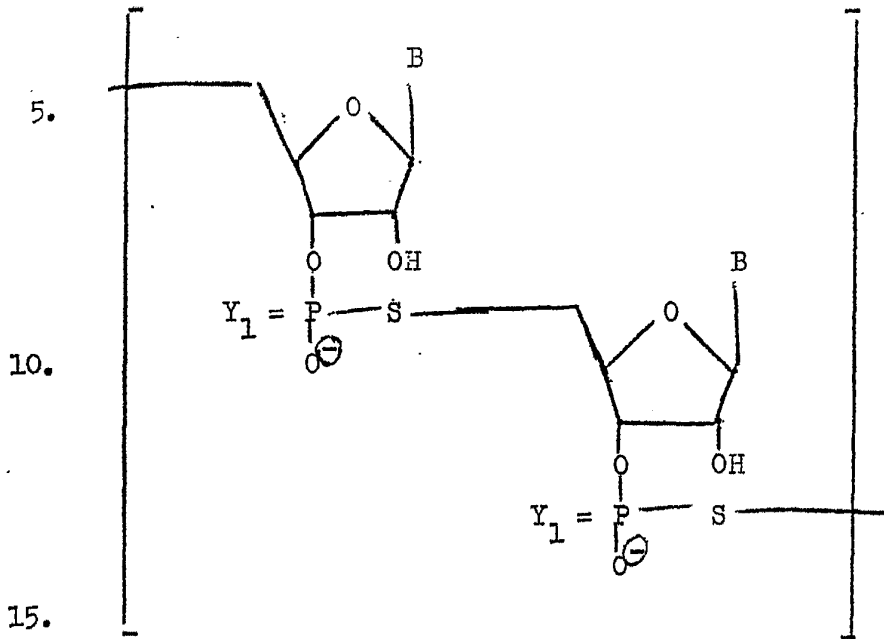
380761



Poli rCOS/IOS y poli RCSS/ISS

20. Se sigue el procedimiento del ejemplo 6 al sustituir (en el caso de poli rCOS/IOS) el 5'-trifosfato de 5'-deoxi-5'-mercapto-citidina al rCTPS para preparar poli rCOS y el 5'-trifosfato de 5'-deoxi-5'-mercapto-inosina al rITPS. En el caso de poli rCSS/ISS, se utilizan los tioatos 5'-mercapto-
25. 5'-trifosfóricos correspondientes. Las estructuras de poli rCOS, poli rIOS, poli rCSS y poli rISS son como sigue:

380761



- 20.
- poli rIOS - B = hipoxantina, Y<sub>1</sub> = oxígeno
  - poli rCOS - B = citosina, Y<sub>1</sub> = oxígeno
  - poli rISS - B = hipoxantina, Y<sub>1</sub> = azufre
  - poli rCSS - B = citosina, Y<sub>1</sub> = azufre

25.

Al recoger pueden prepararse pares que constan de (1) poli rIOS + poli rCOS, (2) poli rISS + poli rCSS, (3) poli rIOS + poli rCSS y (4) poli rISS + poli rCOS. Estos tendrán la estructura general de XXVII anterior pero con sustitución apropiada de oxígeno por azufre.

Ensayos In Vitro

Ejemplo 7

Resistencia celular a vesicular

380761



Virus de estomatitis (VSV)

Se emplean fibroblastos de piel humana (HSP) como el huesped. Los polinucleótidos son poli rASUS (polímero XXIV del ejemplo 5) y poli rAU, es decir, el análogo de oxígeno de poli rASUS. El poli rAU se prepara exactamente a como se describe en el ejemplo 5 para el poli rASUS pero utilizando ATP en lugar de ATPS y UTP en lugar de UTPS..

El procedimiento es como sigue: Las células huesped se cultivan idénticamente en MEM (medio de Eagle mínimo) y una monocapa de este cultivo se forma en un disco de Petri y se mantiene a 37°C. El polímero se disuelve en tampón PDS, 100 microgramos de polímero, por cc de tampón y se almacena a 4°C. En el momento de utilización, esta solución de polímero se usa en diluciones (en MEM) de 40, 4, 0,4, 0,04 y 0,0004 microgramos de polímero por mililitro de MEM. La monocapa resultante de células cultivadas se cubre con 4 cc de solución de polímero y se incuba durante 24 horas a 37°C. Luego se elimina la solución de polímero. Luego el virus retado (VSV) propagado en fibroblastos en forma embrionaria se aplica a la monocapa impregnada con el polímero. Se prevén controles sin el polímero aplicado. Las láminas se mantienen a 37°C durante 48 horas y se examinan para el número de plaquetas, cada una de las cuales se produce por un virus que tiene infectada una célula, se multiplica en la célula y re- vienta la célula. Como es bien conocido, el medio similar

380761



al empleado inmoviliza los virus que se multiplican en y emergen de una célula, y una cantidad de las plaquetas resultantes es una medida de la efectividad del virus. Los resultados se exponen en la segunda columna de la tabla I que sigue, en la

5. que los números representan la concentración de polímeros requerida para reducir la formación de plaqueta VSV por un 50%, en comparación a un control. (El tampón PDS es una solución salina tamponada de fosfato descrita por R. Dulbecco y M. Vogt, J. Exp. Medicine, 99, 1.953, pág. 167),

10. Ejemplo 8

Producción de interferencia - Monocapas de HSF

Monocapas de cultivo de células en placas de Petri preparadas como en el ejemplo 7, se cubren cada una con una cc de una solución de 40 u 8 microgramos de los polímeros de la

15. tabla 2 (por cc) de MEM y se incuba durante 3 horas a 37°C. Se elimina el medio y se lava la monocapa seis veces con MEM. Luego se adiciona 4 cc de MEM y se incuba la monocapa durante 21 horas a 37°C. El fluido supernadante se colecta y se diluye serialmente con diluciones de MEM a 1:3, 1:10, 1:30 y 1:100.

20. Cada dilución se aplica a una monocapa de HSF cultivada, preparada como en el ejemplo 7 e incubada durante 24 horas a 37°C. El medio se elimina y se aplica VSV como en el ejemplo 7. El título de interferencia se determina como la recíproca de la dilución más elevada de muestra que reduce la formación de

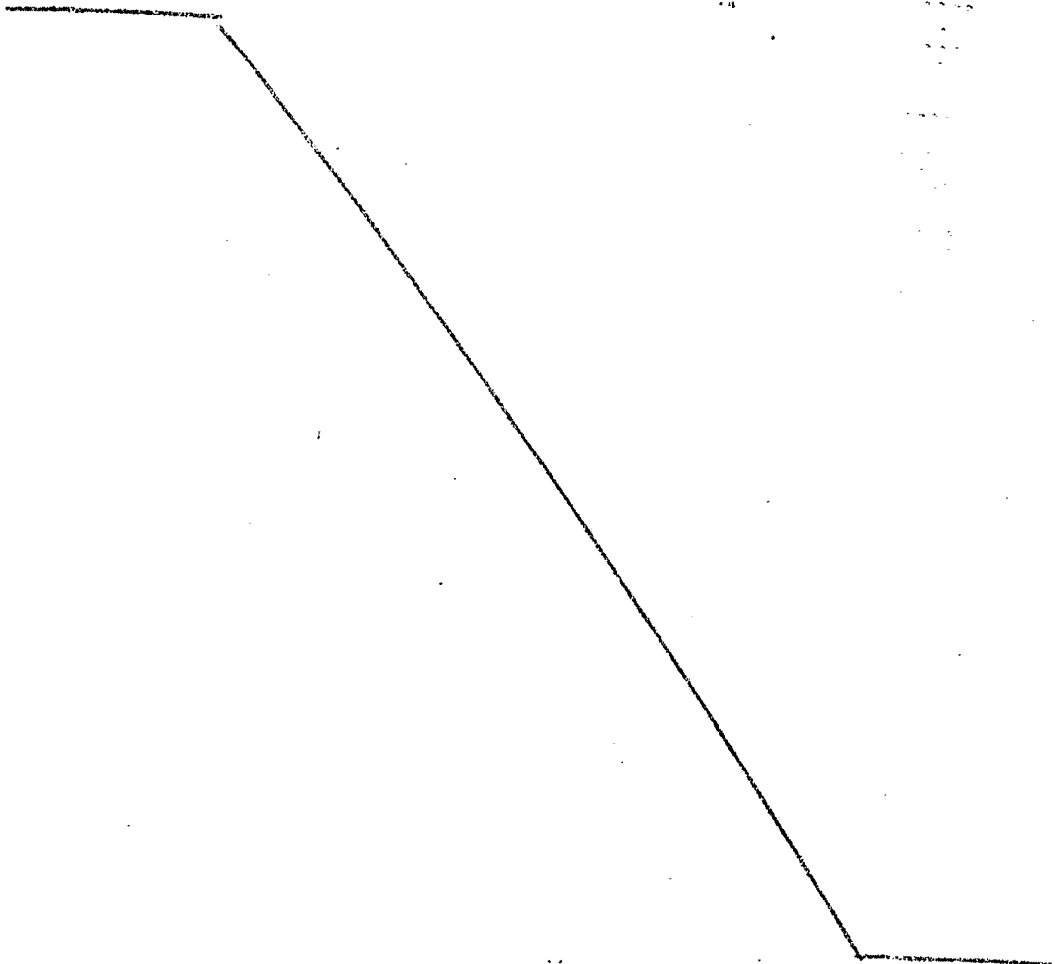
25. plaqueta por un 50% en comparación a un control. La interfe-

380761



rencia se caracteriza por su sensibilidad a la tripsina y resistencia a la ribonucleasa; asimismo por su falta de actividad en celulas heterólogas.

Los resultados se exponen en la tercera columna  
5. de la tabla 1ª que sigue para dos preparaciones diferentes.





380761

TABLA I

Polímero	Resistencia celular. Concentración inhibidora mínima <sup>1</sup> (microgramo/cc).		Producción de interferencia <sup>2</sup> (unidades/4 cc)		Estabilidad térmica - Tm (°C)		
	Prep. 1	Prep. 2.	Prep. 1	Prep. 2.	En solución salina (Na + 0,15 M)	En tampón de citrato de sodio (Na + 0,1 M)	En solución salina (Na + 0,1 M)
poli rASUS (XXIV)	0.001	0.0001	62	24	-	48	-
Polí rAUS	-	0.01	-	14	69	-	-
poli rA <sup>W</sup>	0.1	1.0	26	< 1	69.5	48	-
poli rA/rU	0.2	-	< 1	-	57.5	38	-
poli rISC (XXVIIIB)	-	0.0002	-	57	-	-	56
poli rIC	-	≥ 1.0	-	< 1	-	-	47
poli rI/rC	-	0.01	-	5-18	62	-	-

1. Concentración de polímero requerida para reducir formación de plaqueta VSV por un 50%.
2. De 3 a 24 horas después de exposición de monocapas de células confluentes en 60 milímetros de discos Petri para 40 microgramos por cc del polímero para la preparación 1; 8 microgramos por cc de polímero para la preparación 2. Las células se liberan del polímero después de 3 horas, se lavan exhaustivamente con MEM (medio de Eagle esencialmente mínimo) y posteriormente se incuban con 4 cc de MEM por disco de Petri.

380761



La última columna de la tabla I expone la estabilidad térmica cuando se mide al seguir la absorción ultravioleta de una solución del polímero respectivo. El polímero, poli rA/rU, es una hélice múltiple de ramificación formada a partir de los homopolímeros poli rA y rU. Los heteropolímeros, poli rASUS (XXIV) y poli rAU son asimismo en la forma de hélices múltiples de ramificación, y  $T_m$  representa la temperatura a la que la estructura de hélice doble se empieza a disociarse en ramificaciones individuales de polímeros como se refleja por la absorción ultravioleta incrementada.

$T_m$  no se mide para el poli rASUS (XXIV) en solución salina, que reproduce más cuidadosamente el fluido en células que el tampón de citrato. Al comparar los valores de solución salina y de citrato de poli rAU y poli rA/rU, se concluye que la  $T_m$  del poli rASUS en la solución salina es de aproximadamente 69°C.

#### Ensayos In Vivo

##### Ejemplo 9

##### Inyecciones en ratones

Una cepa estandar de laboratorio de ratones blancos Swiss se utilizan como huéspedes. Los ratones (macho o hembra) tienen cada uno un peso de aproximadamente 25 gramos. Cada ratón se inyecta intraperitonealmente con 0,5 cc de solución de PDS que contiene 10 microgramos de polímero XXIV. Después de 6 horas se mueren los ratones y la sangre

380761



- se extrae por aspiración desde detrás del ojo. La sangre se deja a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se recoge el suero y se titula para células de interferencia vsL929 como en Merigan y Finkelstein, *Virology*, 35, 363-374 (1.968). Los resultados son como sigue: El suero de ratones inyectados con polímero XXIV tiene un título de interferencia de 25 unidades/cc, mientras que el suero de ratones inyectados con poli RAU no tiene cantidad detectable de interferencia.
10. Ejemplo 10  
Inyecciones en conejos
15. Conejos albinos (macho o hembra), que pesan aproximadamente de 1,5 a 2,0 kilogramos, se inyectan intravenosamente con 0,5 cc de solución de PDS, que contiene 20 microgramos de poli RAU o polímero XXIV (preparación 2 de la tabla I). Se toman muestras de sangre por punción en el corazón, 2 y 4 horas después de la inyección. La sangre se deja a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se recoge el suero y se titula para interferencia en células
20. RK13 con virus de estomatitis vesicular (técnica de reducción de plaqueta como se describe por Merigan y Finkelstein *Virology*, 35 363-374 (1.968) para las células L 929 con virus de estomatitis vesicular). La interferencia se caracteriza a como se ha descrito en el ejemplo 8. Los resultados son como sigue: El poli RAU estimula la producción de
- 25.

380761



5 unidades cc/ (2 horas) y 15 unidades/cc (4 horas) de interferencia de circulación en las que se encuentran 1.000 unidades/cc (2 horas) y 600 unidades/cc (4 horas) de interferencia en el suero de conejos inyectados con polímero XXIV.

5. Descripción general de substratos, reguladores y biocatalizadores.

10. El reactivo o reactivos en la producción de polímeros de la presente invención consta de una o más especies de tioanálogos o de di- o tri-fosfatos de nucleósidos en que por lo menos uno de los átomos de oxígeno enlazados al fósforo es sustituido por azufre. Donde deben sinterizarse polímeros tio-oxo mixtos, el substrato contendrá las especies
15. 0 normales de di- o tri-fosfatos de nucleósido en adición a las especies S. El substrato puede ser homogéneo (solamente una especie de tio-análogo) o heterogéneo (dos o más especies de di- o tri-fosfato de nucleósido, por lo menos uno de los cuales es de la especie S). Como será evidente, el substrato puede ser homogéneo o heterogéneo con respecto
20. al tio-análogo. Pueden estar presentes en el substrato bases diferentes, entidades de azúcar diferentes y/o situación y cantidades diferentes de átomos de azufre. La unidad de azúcar será ordinariamente una pentosa pero asimismo se pueden utilizar hexosas, por ejemplo, d-glucosa. Pentosas apropiadas son la ribosa, la dioxiribosa, la arabinosa, la xilosa,
25. y las pentosas modificadas como pentosa metilada, por ejemplo,

380761



2'-O-metil-ribosa, etc.

El componente de base del di- o tri-fosfato de nucleósido puede ser cualquiera de las bases de purina o de pirimidina (que se presentan naturalmente o sintéticas).

5. A continuación se dan ejemplos de bases que se pueden emplear:
- Adenina,  
Citosina,  
2,6-diamino-4-hidroxi-5-N-metil-formamidopirimidina
10. Dihidrouracilo  
N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-dimetiladenina  
1-(gamma gamma- dimetilalil) adenina  
N<sup>6</sup>-(gamma gamma-dimctilalil) adenina
15. 2-dimetilamino-6-hidroxipurina, comprende N<sup>2</sup>, N<sup>2</sup>-dimetilguanina,  
6-dimetilaminopurina, comprende N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-dimetilamina,  
N<sup>2</sup>, N<sup>2</sup>-dimctilguanina  
Guanina
20. 6-hidroxi-2-metilaminopurina, comprende N<sup>2</sup>-metilguanina,  
N<sup>6</sup>-(trans-4-hidroxi-3-metilbut-2-enil)-adenina,  
comprende zeatina,
25. 6-(trans-4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purina,  
comprende zeatina,



380761

- 5-hidroxi metilcitosina,
- 5-hidroxi metiluracilo,
- 5-hidroxiuracilo,
- hipoxantina,
- 5. 1-( $\Delta^2$ -isopentenil) adenina,
- $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenil) adenina,
- 1-metiladenina,
- 2-metiladenina,
- 7-metiladenina,
- 10. 6-metilaminopurina, comprende  $N^6$ -metiladenina,
- 4-metilaminopirimidin-2-ona, comprende  $N^4$ -metilcitosina,
- 6-(3-metil-2-butenilamino) purina, comprende  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenil)adenina,
- 3-metilcitosina,
- 15.  $N^4$ -metilcitosina,
- 5-metilcitosina,
- 1-metilguanina,
- $N^2$ -metilguanina,
- S-metilguanina,
- 20. 1-metilhipoxantina,
- 3-metilhipoxantina,
- 7-metilhipoxantina,
- 1-metil- $N^6$ -metiladenina,
- 1-metil-6-metilaminopurina,
- 25. 1-metiluracilo,



380761

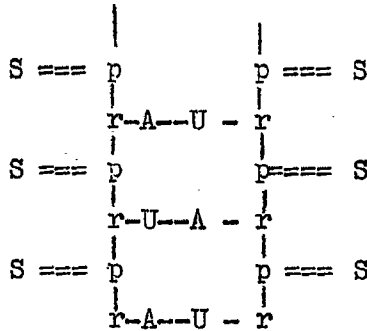
- 3-metiluracilo,  
5-metiluracilo, comprende timina,  
7-metilxantina,  
Acido orótico,  
5. 4-tiouracilo (o 2-tiouracilo)  
Timina,  
Uracilo,  
Xantina,  
Zeatina,  
10. 5-bromouracilo,  
5-iodouracilo,  
8-bromoguanina,  
8-iodoguanina,  
4-tiotimina (o 2-tiotimina)  
15. 2-amino-purina,  
2-zeto-purina,  
7-amino-pirazol [4,3-d] pirimidina,  
Pirazol [4,3-d] pirimidina

20. La selección de la base en el substrato puede ser homogénea (solamente una sola base) o heterogénea (dos, tres, cuatro o más bases diferentes. Los polímeros resultantes pueden permanecer como ramificaciones únicas o pueden experimentar emparejamiento de base por ramificaciones del mismo polímero (donde se seleccionan dos o más bases complementarias) o con ramificaciones de un polímero di-
- 25.

380761

ferente. Así, un polímero en el que solamente está presente la base de adenina, formará una estructura múltiple de ramificación con un polímero que tiene solamente la base de timina. Los polímeros que tienen hipoxantina emparejarán con polímeros que tienen citosina. El emparejamiento de base de heteropolímeros debe ilustrarse como sigue, siendo de comprender que otras bases pueden ser sustituidas por adenina y uracilo y que los átomos de azufre pueden situarse variadamente.

10.



15.

20.

25.

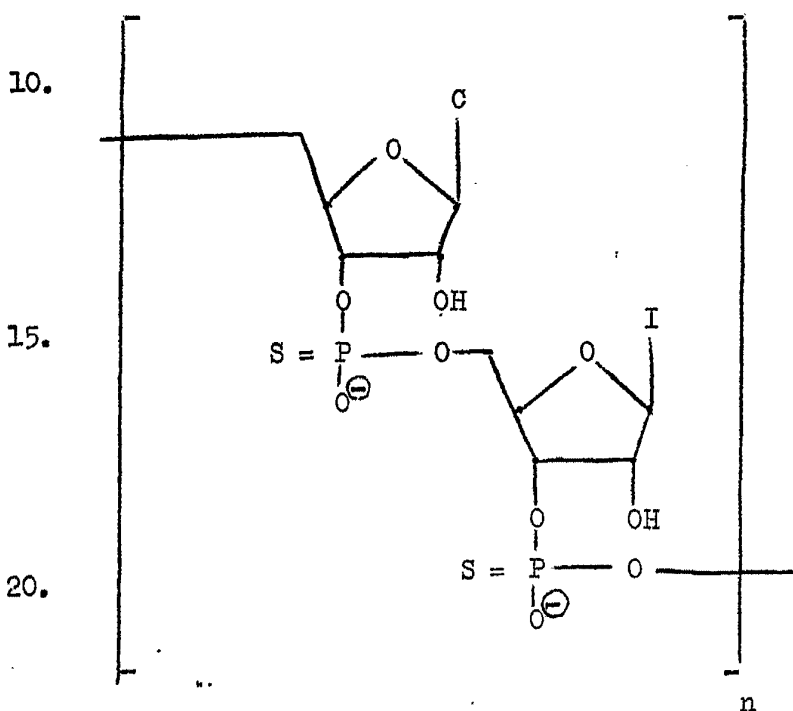
Un sustrato seleccionado puede requerir y a menudo requerirá un regulador para orientar apropiadamente los nucleótidos. Si debe prepararse un homopolímero (homo en el sentido de que tiene una base única), el regulador puede ser un polinucleótido sintético que es igualmente homogéneo con respecto a su base pero en el cual la base es capaz de emparejar con la base del sustrato. Así, para producir poli rAS, el sustrato será el nucleótido XIX o

380761



un polímero inferior del mismo y el regulador puede ser poli dT (o  $\text{--p-d-p-d--}$ ). Si debe producirse poli r CSIS (C=

ácido citidílico e I = ácido inosínico, significando S el azufre análogo con azufre enlazado doblemente a fósforo que tiene la fórmula:

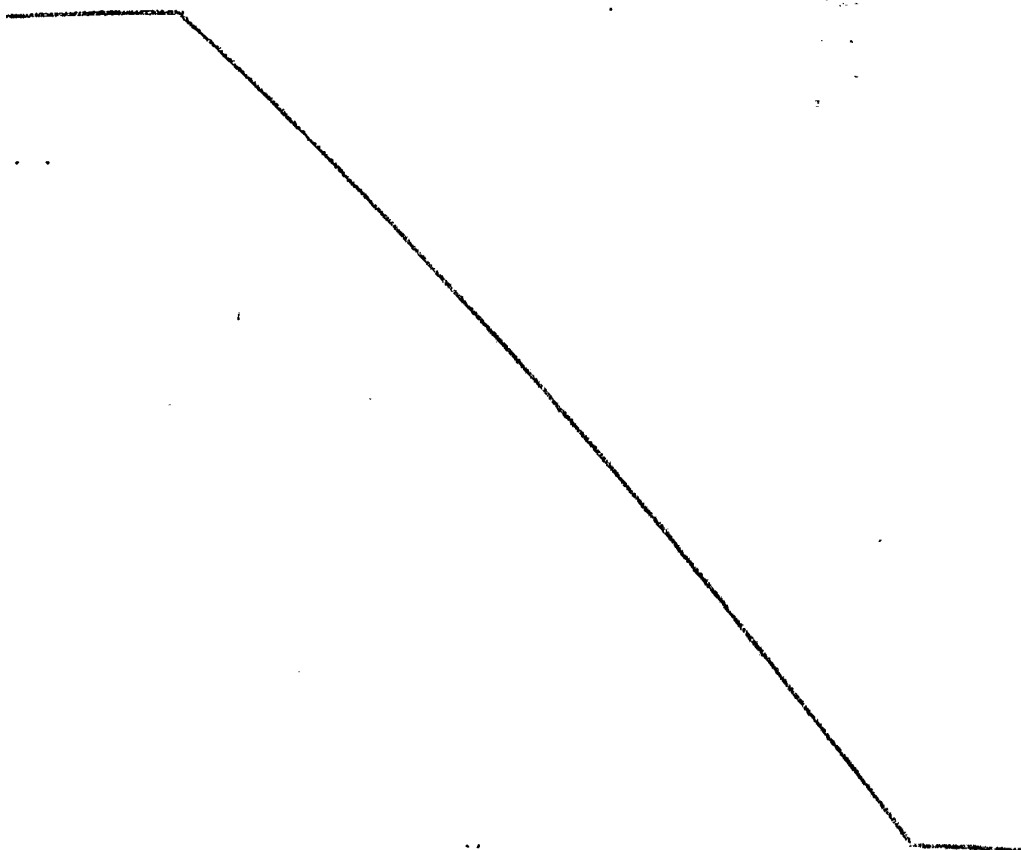


25. el regulador puede ser por ejemplo, poli dIC.

380761



El biocatalizador empleado para polimerizar los nucleótidos dependerá de la naturaleza del sustrato. En la tabla II inferior se relacionan, en la primera columna, nucleótidos y mezclas de nucleótidos apropiados; en la 5. segunda columna, biocatalizadores apropiados; en la tercera columna reguladores apropiados (donde se precisen o prefieran); y en la cuarta columna, los polinucleótidos resultantes.



380761



TABLE II

(a) Substrato (nucleóti- do o nucleó- tidos)	(b) Biocatalizador	(c) Regulador	(d) Polinucleó- tido resul- tante
(1) rATPS	Polimerasa RNA de- pendiente de DNA, por ejemplo, poli- merasa RNA <u>E. Coli</u>	poli dT	poli rAS
(2) rATPS + rUTPS	" " " "	poli dAT	poli rASUS
(3) rGTPS + rCTPS	" " " "	poli dGC	poli rGSCS
(4) rUTPS	" " " "	poli dA	poli rUS
(5) rITPS	" " " "	poli dC	poli rIS
(6) rCTPS	" " " "	poli dI	poli rCS
(7) rCTPS	" " " "	poli dG	poli rCS
(8) rITPS + rCTPS	" " " "	poli dIC	poli rISCS
(9) rITPS + rCTPS	" " " "	poli dGC	poli rISCS
(10) rATPS + rCTPS	" " " "	poli dIT	poli rASCS
(11) mezclas de tres o más de los nu- cleótidos ante- riores.	" " " "	polideoxiribo nucleótidos con tres o más nu- cleótidos dife- rentes en secuen- cia alternante	poliribonucleó- tidos (tio aná- logos) con tres o más nucleóti- dos en secuen- cia alternante
(12) r $\overline{\text{B}}$ UTPS	" " " "	poli dA	poli r $\overline{\text{B}}$ US
(13) rUTPS	polimerasa, RNA, por ejemplo, po- limerasa RNA <u>azotobacter vi-</u> <u>nelandii</u> ; poli- merasa RNA <u>mi-</u> <u>crococcus lisodeik-</u> <u>ticus</u> ; polimerasa RNA <u>E. Coli</u>	poli rA	poli rUS

380761



TABLA II (Continuación)

(a) Substrato (nucleóti- do o nucleó- tidos)	(b) Biocatalizador	(c) Regulador	(d) Polinucleóti- do resultante
(14) rATPS	Polimerasa RNA, por ejemplo, polimerasa RNA <u>azotobacter vine-landii</u> ; polimerasa RNA <u>micrococcus li-sodeikticus</u> ; polimerasa RNA <u>E. Coli</u>	Poli rU	poli rAS
(15) rGTPS	" " " "	poli rC	poli rGS
(16) rATPS + rUTPS	" " " "	poli rAU	poli rASUS
(17) rGTPS + rATPS	" " " "	poli rUC	poli rGSAS
(18) rATPS	" " " "	poli rT	poli rAS
(19) rCTPS	" " " "	poli rG	poli rCS
(20) rCTPS	" " " "	poli rI	poli rCS
(21) rCTPS + rITPS	" " " "	poli rIC	poli rISCS
(21a) rCTP + rITPS	" " " "	poli rIC	poli rCIS
(21b) rCTPS + rITP	" " " "	poli rIC	poli rCSI
(22) Mezclas de tres o más de los nucleóti-dos anteriores	" " " "	Poliribonucleó-tidos con tres o más nucleóti-dos diferentes en secuencia alternante	Homopolímeros de poliribonu- cleótido .



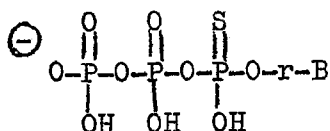
TABLA II (Continuación)

(a) Substrato (nucleóti- do o nu- cleótidos)	(b) Biocatalizador	(c) Regulador	(d) Polinucleó- tido resul- tante
(23) rITPS + rCTPS	Polimerasa RNA, por ejemplo, po- limerasa RNA <u>azo- tobacter vine- landii</u> y Polime- rasa RNA <u>E. Coli</u>	Ninguno	poli rISCS
(23a) rITP + rCTPS	" " " "	"	poli rICS
(23b) rITPS + rCTP	" " " "	"	poli rISC
(24) Cualquiera de los varios tio- atos difosfó- ricos de nu- cleósidos, por ejemplo, rUDPS, rADPS, rADPS + rUDPS, rCDPS, rCDPS + rIDPS, rIDPS	Fosforilasa de polinucleótido, como por ejem- plo, fosforila- sa de polinu- cleótido, <u>azo- tobacter vine- landii</u> o <u>E. Coli</u> o fosforilasa de polinucleótido micrococcus li- sodeictisus	Sin regulador pero se utili- za preferente- mente con un primario tal como un oligo- nucleótido que tiene un OH li- bre en la posi- ción C3'	Polinucleóti- dos correspon- dientes, como por ejemplo, poli US, poli AS, poli ASUS, poli CS, poli CSIS, poli IS.

380761



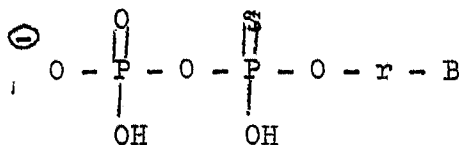
Haciendo ahora referencia a la tabla II, están a disposición las explicaciones siguientes. Todos los nucleótidos numerados de (1) a (24) son los trifosfatos (tio-análogos) que tienen la fórmula general



en la que

r indica la entidad de ribosa y  
B indica la entidad de base.

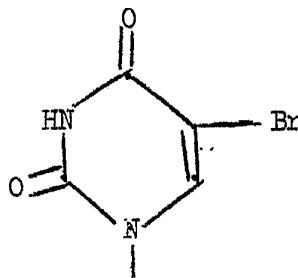
El punto (25) se refiere a difosfatos de nucleósido que tienen la fórmula general



en la que

r y B son como se ha referido anteriormente.

En el punto (12) el nucleótido en la columna (a) es un ribonucleótido de la base de uracilo en donde el bromo sustituye al hidrógeno en la posición 5 de la base, así



380761



- La base se une a la entidad de ribosa en la posición 1 mostrada con una valencia colgante. La fórmula  $r\overline{BUTPS}$  significa el ligado de bromo (B) a la base (U). Otros nucleótidos halo sustituidos se pueden emplear, por ejemplo,  $r\overline{IUTPS}$  que
5. significa yodo en la posición 5 del uracilo,  $r\overline{ClUTPS}$  que significa cloro en esta posición, etc. En general, la sustitución de hidrógeno sobre anillos de carbono por halógeno (Cl, Br, I) tiene un efecto estabilizante.
- Aquellos sistemas tal como (23) y (24) que no requie-
10. ren un regulador, son ventajosos ya que se evita el coste de un regulador.
- En el punto (25), es innecesario un regulador pero el sistema se utiliza de preferencia con un primario o activador tal como un oligonucleótido que tiene un hidroxilo C3', es decir, un grupo hidroxílico libre en la posición 3 de la
15. entidad de azúcar.
- En la columna (c) poli dT significa polideoxitimidina, poli dAT significa un polideoxinucleótido que tiene unidades de adenosina y timidina alternantes, etc. Donde apa-
20. rece "r" significa ribosa y "d" significa deoxiribosa.
- Todos los nucleótidos de substrato [y difosfatos de nucleósido, punto (25)] de la tabla II se muestran como tioatos trifosfóricos de ribonucleósido o tioatos difosfóricos de ribonucleósido. Los poliribonucleótidos resultan-
25. tes [columna (d)] son en general más efectivos como induc-

380761



tores de interferencia que los polideoxiribonucleótidos correspondientes. No obstante, los últimos (polideoxiribonucleótidos, en su forma tioanáloga) están dentro del objeto de la presente invención y pueden prepararse al utilizar sistemas tal como los mostrados en la tabla IIa.

TABLA IIa

	(a)	(b)	(c)	(d)
10.	dATPS	Polimerasa DNA dependiente de DNA.	poli dT	poli dAS/dT
	dTTPS	" " "	poli dA	poli dA/dTS
	dATPS + dTTPS	" " "	poli dAT o nada	poli dASTS
15.	dITPS + dCTPS	" " "	poli dIC o nada	poli dISCS
	dITPS + dCTP	" " "	poli dIC o nada	poli dISC
	dCTPS + dITP	" " "	poli dIC o nada	poli dICS
20.	dATPS + dTTP	" " "	poli dAT o nada	poli dAST
	dTTPS + dATP	" " "	poli dAT o nada	poli dATS
	dITPS + dCTPS	" " "	dI/dC	dIS/dCS (poli)
25.	dITP + dCTPS	" " "	dI/dC	dI/dCS " "
	dITPS + dCTP	" " "	dI/dC	dIS/dC " "

380761



TABLA IIa (Continuación)

5.	(a)	(b)	(c)	(d)
	dATPS	Transferasa deoxi nucleotidílica terminal utilizando un oligodeoxinucleótido, por ejemplo, d(pTpTpT) como primario	Sin regulador	poli dAS
10.	dTTPS	" " " " " " " "	" " " "	poli dTS
	dGTPS	" " " " " " " "	" " " "	poli dGS
	dCTPS	" " " " " " " "	" " " "	poli dCS
15.	dITPS	" " " " " " " "	" " " "	poli dIS
	Con una mezcla de cualquiera de los nucleótidos anteriores	" " " " " " " "	" " " "	Hetero-poli-deoxinucleótido
20.	Con una mezcla de cualquiera de los nucleótidos anteriores más cualquiera de los <u>tri</u> fosfatos normales	" " " " " " " "	" " " "	Polímero mixto con respecto a la base así como también <u>tio-sus</u> titución
25.	les			

380761



Los polinucleótidos híbridos, tal como poli rASDAS, poli rASdUS, poli dASrUS, poli dArUS, poli rASdU, etc., pueden prepararse de forma que unidades de ribonucleótidos alternan con unidades de deoxiribonucleótido en cadena de polí-

5. mero. Tales polinucleótidos híbridos pueden designarse en general por la fórmula poli  $rpX_1dpX_2$ , en donde r y d representan las entidades de ribosa y deoxiribosa, respectivamente, p representa la entidad de ligazón del fosfato (siendo por lo menos alguna de las p de las especies tío aquí descritas),  $X_1$  representa una base y  $X_2$  representa la misma base o una base diferente. Con un sistema catalizador apropiado, tal polinucleótido híbrido puede formarse a partir de un substrato que consta de  $rX_1TPS$  y  $dX_2TPS$ , junto con un regulador apropiado, por vía de ejemplo.
- 10.

15. Asimismo se pueden preparar ramificaciones múltiples híbridas al templar ramificaciones de un poliribonucleótido con ramificaciones de polideoxiribonucleótido, como por ejemplo al preparar una solución acuosa en PDS o NaCl 0,15 molar de poli rAS, al preparar una solución equimolar similar de poli dUS, al mezclar las soluciones y al mantener la temperatura ambiente durante un período de tiempo, por ejemplo, de unas pocas horas, formando con ello poli rAS/dUS. Otros de tales homopolímeros híbridos de ramificación múltiple serán evidentes, como por ejemplo, poli rIS/dCS y poli dIS/rCS. La barra de partición
- 20.
- 25.

3-8-75

380761

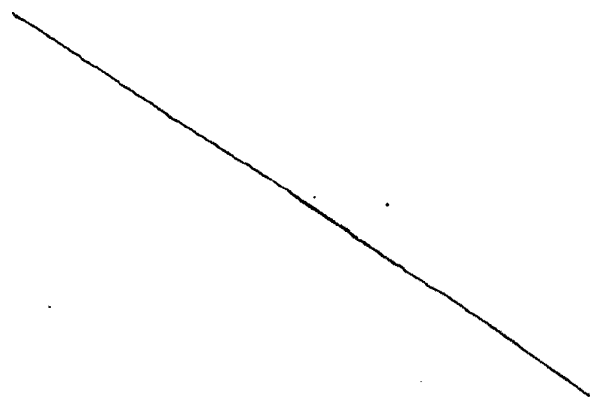


indica una ramificación múltiple en la que una ramificación consta de un homopolímero y la otra consta de un homopolímero diferente).

- 5. Además de las variables de la tabla II anteriormente descritas y las indicadas en la tabla IIa, serán evidentes otras variantes con respecto a posición diferente de los átomos de azufre. Así, pueden construirse otras tablas que son idénticas a la tabla II pero en las cuales, en la columna (A) se reemplaza cada uno de los nucleótidos por un azufre análogo en donde el átomo de azufre se conecta en la posición 5' de la entidad de ribosa y la entidad de fosfato no tiene azufre. Similarmente, puede construirse una
- 10. tabla en la cual los átomos de azufre se indican como en la tabla II, pero los átomos de azufre están asimismo conectados en la posición 5' de la entidad de ribosa. Ejemplo detalles tablas reconstruidas son como sigue [con referencia al punto (1) de la tabla II]:
- 15.

TABLA IIb

20.	(a)	(b)	(c)	(d)
	(1") <u>rATPS</u>	Polimerasa RNA dependiente de DNA	Poli dT	Poli <u>rAS</u>



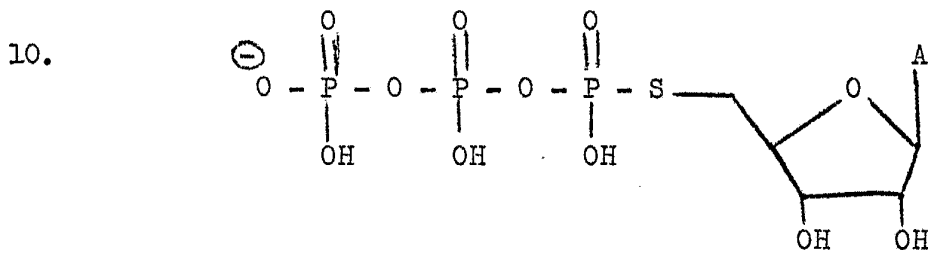
380761



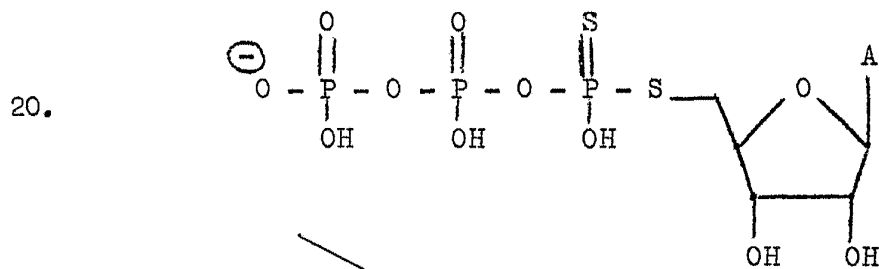
TABLA IIc

	(a)	(b)	(c)	(d)
5.	(1'') <u>rATPSS</u>	Polimerasa RNA dependiente de DNA	Poli dT	Poli rASS

En la tabla IIb, dATPS significa el nucleótido



15. y en la tabla IIc, rATPSS significa el nucleótido





380761

La estructura de los polinucleótidos en la columna (d) de las tablas IIb y IIc será evidente. Las mismas modificaciones se aplican a la tabla IIIa.

Usos de veterinaria y medicina

5. Los polinucleótidos de la presente invención tienen un amplio espectro como agentes antivíricos, tanto como agentes profilácticos para prevenir infecciones víricas como agentes terapéuticos para tratar infecciones víricas. Entre los usos veterinarios están la queratoconjuntivitis en cojenos, moquillo y rabia en perros, enfermedad Aleutiana en visones, leucosis en polluelos, y pasteurelosis y glosopeda en el ganado. En el tratamiento de los humanos, estos polinucleótidos son útiles en el tratamiento de herpes simplex en el ojo, mixovirus, enfriamiento común, infecciones rinovíricas del tracto respiratorio, vaccinia, variola, infecciones de herpes zoster de la piel, meningoencefalitis vírica y hepatitis. Estos polinucleótidos son asimismo efectivos contra virus oncogénicos que inducen malignidades que incluyen tanto tumores sólidos como leucemias. En general, los polinucleótidos de la presente invención son efectivos contra infecciones víricas que son susceptibles a profilaxis de terapia por interferencia. Discusiones de la actividad de interferencia se encontrarán en varias publicaciones recientes tal como Interferon, Ciba Foundation Symposium, editada por G. E. W. Wols-  
tenholme et al, 1.968 (Little, Brown & Company, publishers);

380761



The interferons, An International Symposium, editada por N.B. Finter, 1.966 (W. B. Saunders & Co.); Interferon 1.968), M.S. Finkelstein y T.C. Merigan, California Medicine, 109, 24 (1.968); Interferon Induction and Utilization, M.R.

5. Hilleman, J. Cellular Physiology 71, 43 (1.968) y Interferon and Interferon Inducers: The Clinical Outlook, T.C. Merigan, Hospital Practice, March, 1.969, 42-49.

- Además, los polinucleótidos de la presente invención son útiles contra infecciones bactericas tal como infecciones de listeria y estafilococos y de protozoos tal como toxoplasma y malaria. Asimismo son efectivos contra el grupo clamidia (psitacosis, tracoma y linfogranuloma). Los polinucleótidos de la presente invención son asimismo útiles en condiciones patológicas no víricas, tal como ciertos tumores.
- 10.
  - 15.

- Las formas en la que y el modo en que pueden administrarse los polinucleótidos de la presente invención varían considerablemente. Pueden administrarse tópicamente, por ejemplo, a lesiones de la piel, a la mucosa y al ojo;
20. intravenosamente, intradérmicamente, intramuscularmente y (en animales) intraperitonealmente; por inhalación o gargarismo; oral, rectal e intravaginalmente; etc. Pueden incorporarse en polvos para la aplicación tópica o inhalación;
  25. en cremas y ungüentos para la aplicación tópica a la piel; en solución (por ejemplo solución acuosa) para inyección o

380761



- para aplicación tópica, por ejemplo, como gotas para los ojos o los oídos, o para gargarismos; como emulsiones disueltas en aceite y emulsionadas en agua para aplicación tópica a la piel, por ejemplo, como loción de calamina, en ungüentos y
5. pastas, etc.

- Puede utilizarse el medio usual en formular y preparar estas formas de medicamento, por ejemplo, solución acuosa isotónica, no pirogénica, o solución PDS en el caso de soluciones; óxido de cinc, talco o dióxido de titanio para polvos; lanolina, aceite de oliva, aceite mineral y vaselina amarilla para emulsiones, ungüentos y pastas (teniendo las últimas por ejemplo, óxido de cinc como espesador); polietilenglicol para cremas, etc.
- 10.

- Además, estas preparaciones pueden contener otros editivos y/o materias activas terapéuticamente, tal como sulfóxido dimetílico, dextrano dietilaminoetílico y albumina metilada para promover la aplicación y absorción por las células de los polinucleótidos; antibióticos tal como neomicina, etc.
- 15.

- Las dosificaciones se pueden variar ampliamente, por ejemplo, de tan pequeñas como un miligramo de material activo (polinucleótido) a un gramo. Para humanos adultos, se recomiendan dosificaciones de 1 a 100 mg de polinucleótido con dosificaciones correspondientemente más pequeñas
- 20.
25. para niños. Para infecciones suaves, por ejemplo de la piel,

380761



pueden ser suficientes dosificaciones de 100 microgramos. Para animales grandes tal como caballos y ganado, se recomiendan dosificaciones de aproximadamente 10 mg a un gramo y para animales más pequeños dosis correspondientemente más pequeñas.

5. Las concentraciones de los polinucleótidos se pueden variar ampliamente por ejemplo de 0,1 a 90% preferentemente aproximadamente de 1 a 5% en peso de la composición. Los concentrados de los polinucleótidos que contienen por ejemplo de 20 a 60% en peso de polinucleótido, pueden preverse para dilución subsiguiente a concentraciones apropiadas para la administración.

10. A continuación se indican ejemplos de preparaciones útiles para propósitos médicos y veterinarios.

15. Ejemplo 10

Gotas para los ojos, como por ejemplo, para tratar infecciones de herpes simplex en la córnea:

	<u>2% en peso</u>
Polinucleótido, por ejemplo poli ASUS o poli ISCS	
20. Metilcelulosa (4.000 centipoises de viscosidad)	1 %
Etanol fenílico	0.5 "
NaCl	0.5 "
Antígeno exento de agua	96 "

Esta solución puede prepararse por procedimientos estandar  
25. aceptados.

380761



Ejemplos apropiados para inyección - intravenosa,  
intramuscular, intradérmica, subcutánea, intratecal  
(intrapleural, intraarticular, intraarterial)

5. Ejemplo 11
- |                |                                    |
|----------------|------------------------------------|
| Polinucleótido | 1-100 mg, preferentemente<br>10 mg |
| Agua destilada | 1 ml                               |
- Ejemplo 12
10. Polinucleótido 0.1-10%
- |                        |            |
|------------------------|------------|
| NaCl                   | 0.9%       |
| Polietilenglicol 4.000 | 3%         |
| Polisorbato 80         | 0.2%       |
| Agua destilada         | hasta 100% |
15. Ejemplo 13
- |                      |                                 |
|----------------------|---------------------------------|
| Polinucleótido       | 0.1 - 10% preferentemente<br>1% |
| Alcohol bencílico    | 0.5%                            |
| Citrato sódico       | 1.5"                            |
| 20. Bisulfato sódico | 0.2"                            |
| Polisorbato 80       | 0.02"                           |
| Agua destilada       | hasta 100%                      |
- Ejemplo 14
25. Polinucleótido 0.1 - 10% preferentemente  
1%
- |                             |            |
|-----------------------------|------------|
| Tween 80                    | 0.1 %      |
| Celulosa carboximetilsódica | 0.43 %     |
| Tampón de citrato sódico    | 2 "        |
| Agua destilada              | hasta 100% |



380761

Ejemplo 15 para inyección intramuscular

- |    |   |            |
|----|---|------------|
|    | Polinucleótido                          | 1%         |
|    | Monoestearato de aluminio               | 2%         |
| 5. | Accite de sésamo o aceite de caca-huete | hasta 100% |

Ejemplo 16 gotas intranasales

- |     |                      |                             |
|-----|----------------------|-----------------------------|
|     | Polinucleótido       | 0.01-1% preferente-mente 1% |
| 10. | Sulfato de neomicina | 0.1-1%, preferente-mente 1% |
|     | Efedrina             | 0.5-2%, preferente-mente 1% |
|     | Agua destilada       | hasta 100%                  |

15. Ejemplo 17 gotas intranasales

- |     |                      |                               |
|-----|----------------------|-------------------------------|
|     | Polinucleótido       | 0.01-1% preferente-mente 0.1% |
|     | Sulfato de neomicina | 0.1-1%, preferente-mente 0.5% |
|     | Hidrocortisona       | 0.5%                          |
| 20. | Agua destilada       | hasta 100%                    |

En estas preparaciones se puede emplear cualquiera de los nucleótidos de la invención, por ejemplo, poli AS, poli US, poli ASUS, poli ISCS, poli IS/CS, poli ASBUS, poli IS, poli CS, etc.

25. Por consiguiente, será evidente que se han previsto polinucleótidos nuevos y útiles, métodos de prepararlos y preparaciones médicas que contienen a los mismos.

380761



En los dibujos anexos:

Las figuras 1, 2, 3, 4, y 5 representan gráficas cuyas ordenadas expresan recuentos por minuto y las abscisas tiempo en minutos, diagramándose:

En la figura 1, en fósforo diesterasa estomacal, a pH 5,6 y temperatura 27°C, siendo:

O-O poli rAU (0,34  $\mu$ g proteína)

X-X poli rASUS (0,34  $\mu$ g proteína)

En la figura 2, en fosforilasa polinucleótido (E. coli), a pH 8 y temperatura 60°C, siendo:

O-O poli rAU (0,5  $m\mu$ g proteína)

X-X poli rASUS (0,5  $m\mu$ g proteína)

En la figura 3, en ribonucleasa pancreática, a pH 7,4 y temperatura 27°C, siendo:

O-O poli rAU (0,08  $\mu$ g proteína)

X-X poli rASUS (0,08  $\mu$ g proteína)

□-□ poli rASUS (0,2  $\mu$ g proteína)

En la figura 4, en fósforo diesterasa del veneno de serpiente, a pH 8,9 y temperatura 37°C, siendo:

O-O poli rAU (2,5  $\mu$ g proteína)

X-X poli rASUS (2,5  $\mu$ g proteína)

□-□ poli rASUS (5,0  $\mu$ g proteína)

En la figura 5, en nucleasa micrococcal, a pH 8,6 y temperatura 27°C, siendo

X-X poli rAU (12,5  $m\mu$ g proteína)

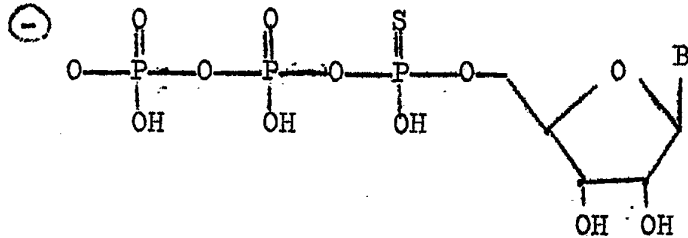
O-O poli rASUS (12,5  $m\mu$ g proteína)

□-□ poli rASUS (50  $m\mu$ g proteína)



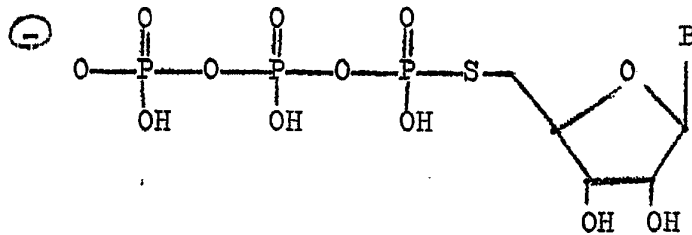


380761



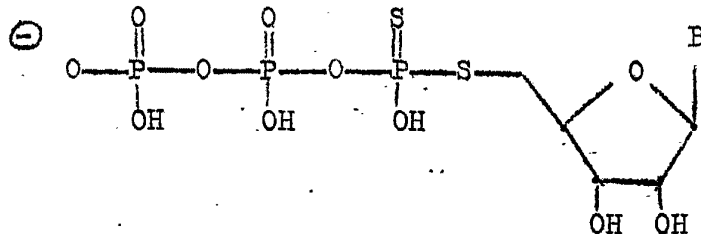
9.- Un método según la reivindicación 1, en el que el componente nucleosídico del sustrato comprende como un ingrediente principal por lo menos un nucleótido que tiene la estructura

10.



10.- Un método según la reivindicación 1, en el que el componente nucleosídico del sustrato comprende como un ingrediente principal por lo menos un nucleótido que tiene la estructura

20.



11.- Un método para sintetizar polinucleótidos sintéticos.

25. *hpc*

345473

= 76 =

380761



Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 76 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 15 de Junio de 1970

p.a.

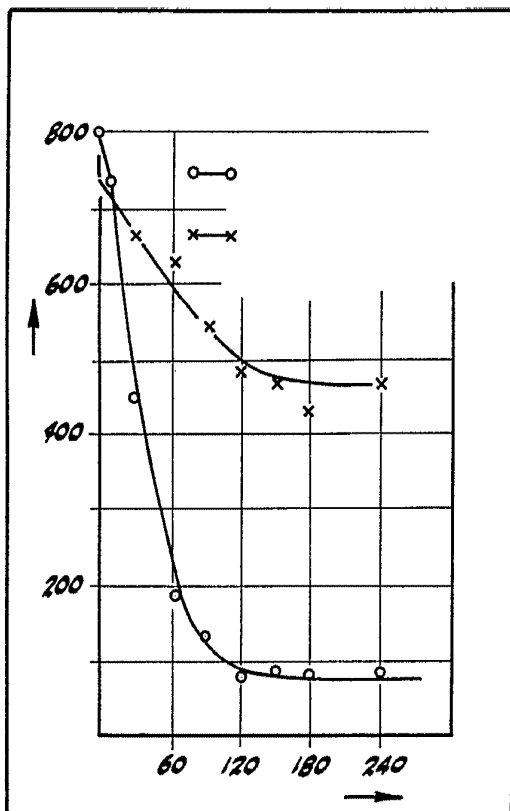
JAIME ISERN

p. p.

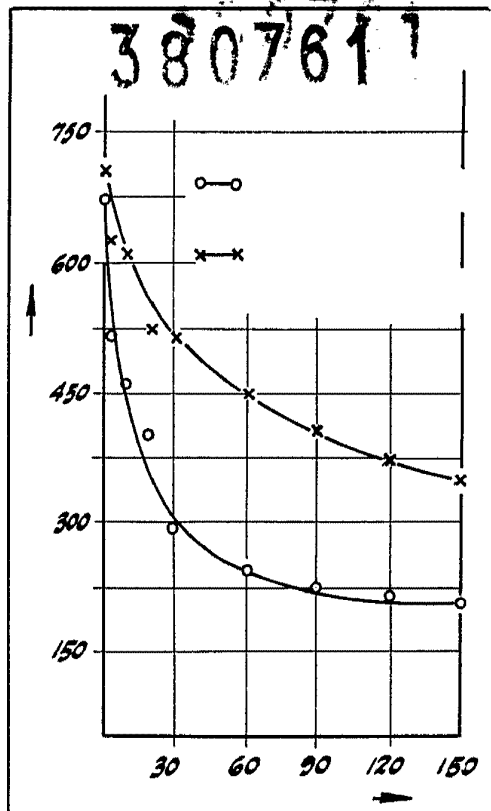
Firmado: JOSE F. NIETO

mpc.

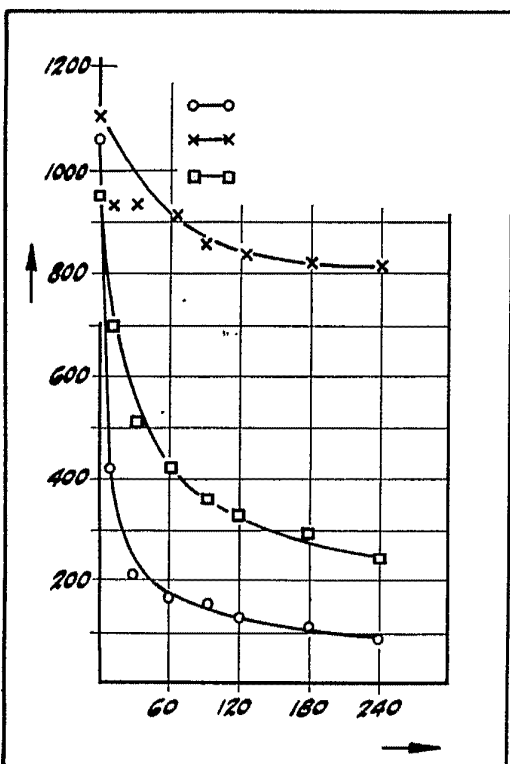
*hpf*



**FIG. 1**



**FIG. 2**

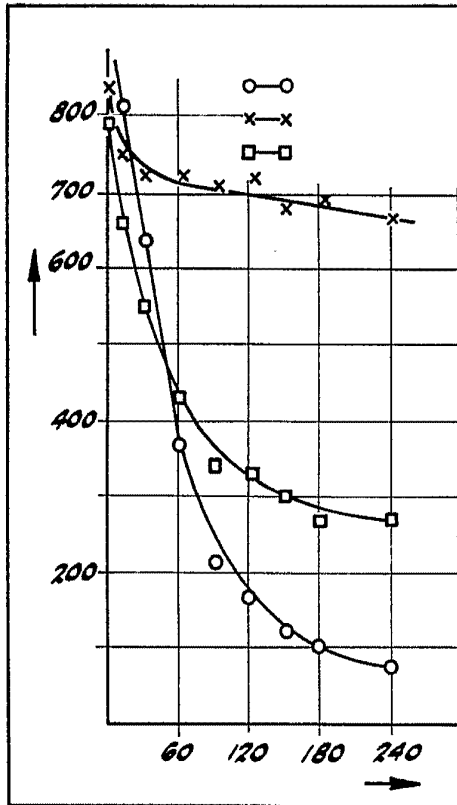


**FIG. 3**

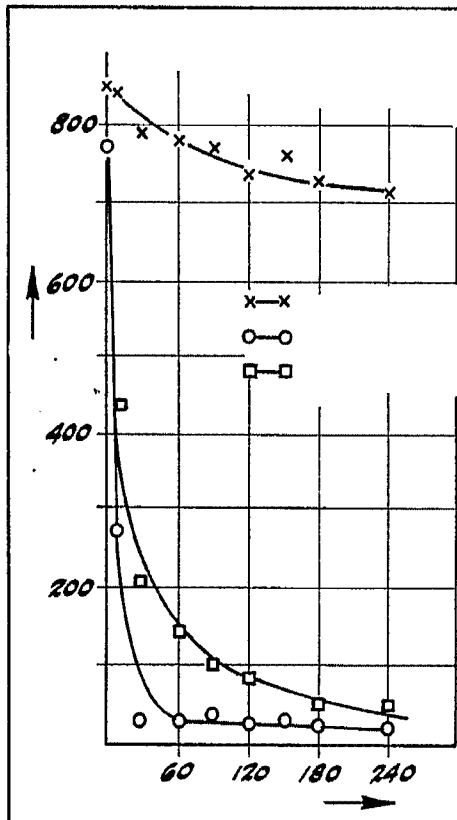
Madrid, a 15 JUN. 1970  
 p.a. JAIME ISERN 5 JUN. 1970  
 P. P.



**380761**



**FIG. 4**



**FIG. 5**

*Madrid, 15 JUN. 1970*

*p. a.*

*JAME IBERN*

*RECEIVED JUNE 15 1970*