

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 875**

51 Int. Cl.:
A61K 31/70 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99933747 .0**
96 Fecha de presentación: **07.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1104303**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2001**

54 Título: **CARBOHIDRATO U OLIGONUCLEOTIDOS MODIFICADOS EN POSICIÓN 2' QUE TIENEN ENLACES INTERNUCLEOSIDICOS ALTERNOS.**

30 Prioridad:
14.07.1998 US 115025

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2011

73 Titular/es:
Isis Pharmaceuticals, Inc.
2855 Gazelle Court
Carlsbad, CA 92010, US

72 Inventor/es:
MANOHARAN, Muthiah

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 875 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

Carbohidrato u oligonucleótidos modificados en posición 2' que tienen enlaces internucleosídicos alternos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al diseño y síntesis de oligonucleótidos de fosforotioato resistentes a nucleasas que son útiles como productos terapéuticos, de diagnóstico y como reactivos de investigación. Se proporcionan oligonucleótidos que contienen al menos una región de nucleósidos modificados en la posición 2' conectados por enlaces alternos fosfodiéster y fosforotioato. Dichos compuestos son resistentes a la degradación por nucleasas y son capaces de modular la actividad del ADN y el ARN.

Antecedentes de la invención

- 10 Es bien sabido que la mayoría de los estados corporales en los organismos multicelulares, incluyendo la mayoría de los estados patológicos, se efectúan por proteínas. Dichas proteínas, actuando directamente o a través de sus funciones enzimáticas u otras funciones, contribuyen en una proporción importante a muchas enfermedades y funciones reguladoras en los animales y el ser humano. Para los estados patológicos, los productos terapéuticos clásicos generalmente se han centrado en interacciones con dichas proteínas con la intención de moderar sus
- 15 funciones causantes de la enfermedad o potenciadoras de la enfermedad. En enfoques terapéuticos más nuevos, se desea la modulación de la producción real de dichas proteínas. Al interferir con la producción de proteínas, puede obtenerse el efecto terapéutico máximo con efectos secundarios mínimos. Por lo tanto, es un objeto general de dichos enfoques terapéuticos interferir o modular de otra manera la expresión génica, que conduciría a la formación de proteínas indeseadas.

- 20 Un procedimiento para inhibir la expresión de genes específicos es con el uso de oligonucleótidos, especialmente oligonucleótidos que son complementarios a una secuencia de ARN mensajero (ARNm) diana específico. Actualmente, varios oligonucleótidos se están sometiendo a ensayos clínicos para dicho uso. Actualmente se están usando oligonucleótidos de fosforotioato como agentes terapéuticos en ensayos clínicos humanos contra diversos estados patológicos, incluyendo el uso como agentes antivirales.

- 25 Además de dicho uso tanto como reguladores directos como reguladores indirectos de proteínas, los oligonucleótidos también han encontrado uso en ensayos de diagnóstico. Dichos ensayos de diagnóstico pueden realizarse usando fluidos biológicos, tejidos, células intactas o componentes celulares aislados. Como ocurre con la inhibición de la expresión génica, las aplicaciones de diagnóstico utilizan la capacidad de los oligonucleótidos de hibridar con una cadena complementaria de ácido nucleico. La hibridación es la unión por formación de enlaces de hidrógeno específicos de secuencia de compuestos oligoméricos mediante pares de bases de Watson-Crick y/o Hoogsteen en el ARN o ADN. Se dice que las bases de dichos pares de bases son complementarias entre sí.

- 30 Los oligonucleótidos también se usan ampliamente como reactivos de investigación. Son útiles para comprender la función de muchas otras moléculas biológicas así como en la preparación de otras moléculas biológicas. Por ejemplo, el uso de oligonucleótidos como cebadores en reacciones de PCR ha dado lugar a una industria comercial en expansión. La PCR se ha convertido en un pilar de los laboratorios comerciales y de investigación, y las aplicaciones de la PCR se han multiplicado. Por ejemplo, la tecnología de PCR ahora encuentra uso en los campos de los estudios forenses, en paleontología, estudios evolutivos y asesoramiento genético. La comercialización ha conducido al desarrollo de kits que ayudan al personal no formado en biología molecular a aplicar la PCR. En dicha tecnología de PCR se emplean oligonucleótidos, tanto naturales como sintéticos, como cebadores.

- 40 También se usan oligonucleótidos en otros procedimientos de laboratorio. Varios de estos usos se describen en manuales de laboratorio comunes tales como *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Ed., J. Sambrook, y col., Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; y *Current Protocols In Molecular Biology*, F. M. Ausubel, y col., Eds., Current Publications, 1993. Dichos usos incluyen como sondas oligonucleotídicas sintéticas en la exploración de bibliotecas de expresión con anticuerpos y compuestos oligoméricos, secuenciación de ADN, amplificación *in vitro* de ADN por reacción en cadena de la polimerasa, y en mutagénesis dirigida del ADN clonado. Véase el Libro 2 de *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, *supra*. Véase también "DNA-protein interactions and The Polymerase Chain Reaction" en el Vol. 2 de *Current Protocols In Molecular Biology*, *supra*.

- 45 Se han introducido varias modificaciones químicas en los oligonucleótidos para aumentar su utilidad en el diagnóstico, como reactivos de investigación y como entidades terapéuticas. Dichas modificaciones incluyen las destinadas a aumentar la unión a una cadena diana (es decir, aumentar las temperaturas de fusión, T_m) para ayudar a la identificación de un oligonucleótido o un complejo diana de oligonucleótido, para aumentar la penetración celular, para estabilizar frente a nucleasas y otras enzimas que degradan o interfieren con la estructura o actividad de los oligonucleótidos, para proporcionar un modo de ruptura (acontecimiento de terminación) una vez unido de forma específica de secuencia a una diana, y para mejorar las propiedades farmacocinéticas del oligonucleótido.

- 55 La complementariedad de oligonucleótidos se ha usado para la inhibición de varias dianas celulares. Los oligonucleótidos complementarios comúnmente se describen como oligonucleótidos antisentido. Se han publicado diversas revisiones que describen los resultados de estos estudios, incluyendo *Progress In Antisense*

Oligonucleotide Therapeutics, Crooke, S.T. and Bennett, C.F., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1996, 36, 107-129. Estos oligonucleótidos han resultado ser herramientas de investigación poderosas y agentes de diagnóstico. Ciertos oligonucleótidos que se ha mostrado que son eficaces actualmente están en ensayos clínicos humanos.

5 La actividad farmacológica de los oligonucleótidos, a diferencia de otros productos terapéuticos, depende de varios factores que influyen en la concentración eficaz de estos agentes en dianas intracelulares específicas. Un factor importante para los oligonucleótidos es la estabilidad de las especies en presencia de nucleasas. Es poco probable que los oligonucleótidos naturales, no modificados, sean agentes terapéuticos útiles porque se degradan rápidamente por las nucleasas. Las limitaciones de los procedimientos disponibles para la modificación del esqueleto de fosfato de oligonucleótidos no modificados ha conducido a una necesidad continuada y percibida desde hace
10 mucho tiempo de otras modificaciones que proporcionen resistencia a las nucleasas y propiedades de hibridación satisfactorias para productos de diagnóstico y terapéuticos de oligonucleótidos antisentido.

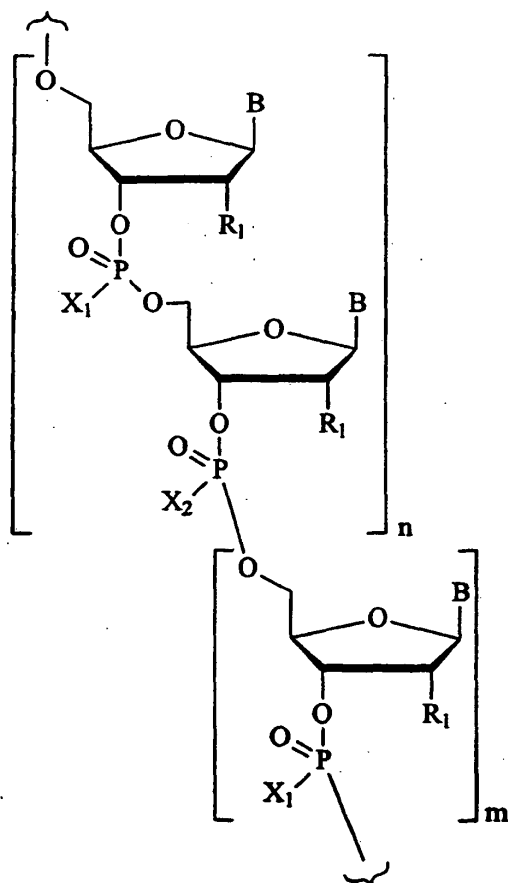
Ghosh y col. (1992) Phosphorothioate-phosphodiester oligonucleotide co-polymers: assessment for antisense application, Anti-Cancer Drug Design, 8, 15-32 describe copolímeros oligodesoxinucleotídicos (17-meros) que comprenden diferentes proporciones y disposiciones de enlaces fosforotioato y fosfodiéster. De forma similar, el
15 documento US 3.687.808 describe polinucleótidos que comprenden fosforotioatos, incluyendo un polirribonucleótido con enlaces fosforotioato y fosfodiéster alternos.

Los documentos WO 91/06556 y WO 97/46569 describen oligonucleótidos modificados en posición 2' que son resistentes a nucleasas.

Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona compuestos que imitan y/o modulan la actividad de ácidos nucleicos de tipo silvestre. En general, los compuestos contienen una secuencia seleccionada de nucleósidos unidos covalentemente que se puede hibridar específicamente con una secuencia de nucleósidos dirigida de ADN o ARN monocatenario o bicatenario.

25 En algunas realizaciones preferidas, se proporcionan compuestos que comprenden una pluralidad de nucleósidos modificados en posición 2' unidos covalentemente que tienen la fórmula:



en la que:

cada B es una nucleobase;

uno de X₁ o X₂ es O y el otro de X₁ o X₂ es S;

5 cada R₁, es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₃-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, halógeno, tior, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol o poliéter; o R₁ es un grupo de fórmula Z-R₂₂-(R₂₃)_v;

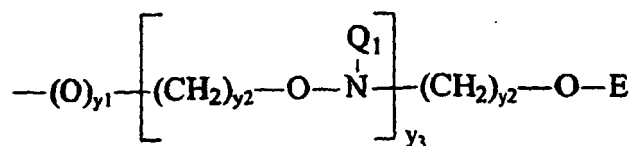
10 Z es O, S, NH o N-R₂₂-(R₂₃)_v;

R₂₂ es alquilo C₂-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀ o alquinilo C₂-C₂₀;

R₂₃ es hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, tior, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol, poliéter;

15 v es de 0 a 10;

o, R₁ tiene la fórmula:



20 en la que

y₁ es 0 ó 1;

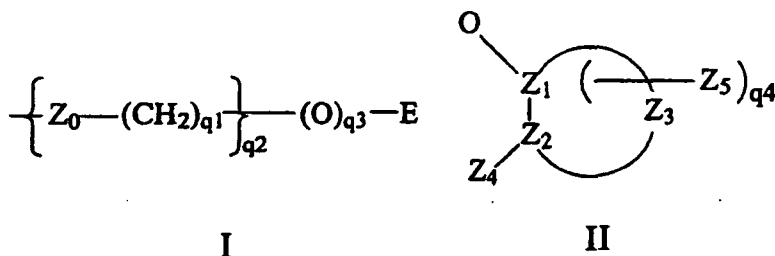
y₂ es independientemente de 0 a 10;

y₃ es de 1 a 10;

E es alquilo C₁-C₁₀, N(Q₁)(Q₂) o N=C(Q₁)(Q₂):

25 cada Q₁ y Q₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₀, alquilo sustituido, dialquilaminoalquilo, un grupo protector de nitrógeno, un grupo conjugado inmovilizado o no inmovilizado, un enlace para un soporte sólido; o Q₁ y Q₂, juntos, están unidos en un grupo protector de nitrógeno o un estructura de anillo que puede incluir al menos un heteroátomo adicional seleccionado entre N y O;

o R₁ tiene una de las fórmulas I o II:



30

en la que

Z₀ es O, S o NH;

q¹ es de 0 a 10;

q² es de 0 a 10;

35 q³ es 0 ó 1;

q⁴ es, 0, 1 ó 2;

Z₄ es OM₁, SM₁ o N(M₁)₂

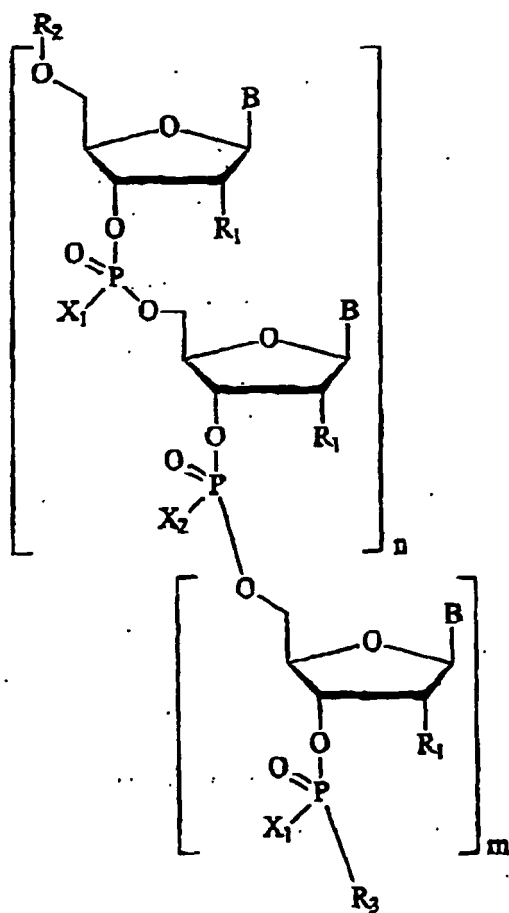
cada M₁ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₈, haloalquilo C₁-C₈, C(=NH)N(H)M₂, C(=O)N(H)M₂ u OC(=O)N(H)M₂;

M₂ es H o alquilo C₁-C₈;

Z₁, Z₂ y Z₃ comprenden un sistema de anillo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, o que tiene de 3 a 6 átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos, en el que dichos heteroátomos se seleccionan entre oxígeno, nitrógeno y azufre y en el que dicho sistema de anillo es alifático, alifático insaturado, aromático o heterocíclico saturado o insaturado; y

Z₅ es alquilo o haloalquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alqueniilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, arilo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono, N(Q₁)(Q₂), OQ₁, halo, SQ₁ o CN; n de 2 a 50; y m es 0 ó 1; y en el que al menos uno de R es un grupo seleccionado entre 2'-metoxietoxi, 2'-dimetilaminooxietoxi, 2'-metoxi, 2'-aminopropoxi, flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilalcoxi, O-alquilamino protegido, O-alquilaminoalquilo, O-alquilimidazol, poliéter de la fórmula (O-alquil)_m, en la que m es de 1 a 10 y 2'-SR o 2'-NR_z, en el que cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno, un grupo protector y alquilo, alqueniilo o alquinilo sustituido o sin sustituir.

También se proporcionan de acuerdo con la presente invención oligonucleótidos que tienen la Fórmula:

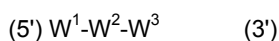


15 en la que:

X₁ es S; X₂ es O; R₂ es H, un grupo protector de hidroxilo o un oligonucleótido; R₃ es OH, un oligonucleótido, o un engarce conectado a un soporte sólido; y las otras variables constituyentes son como se han definido anteriormente.

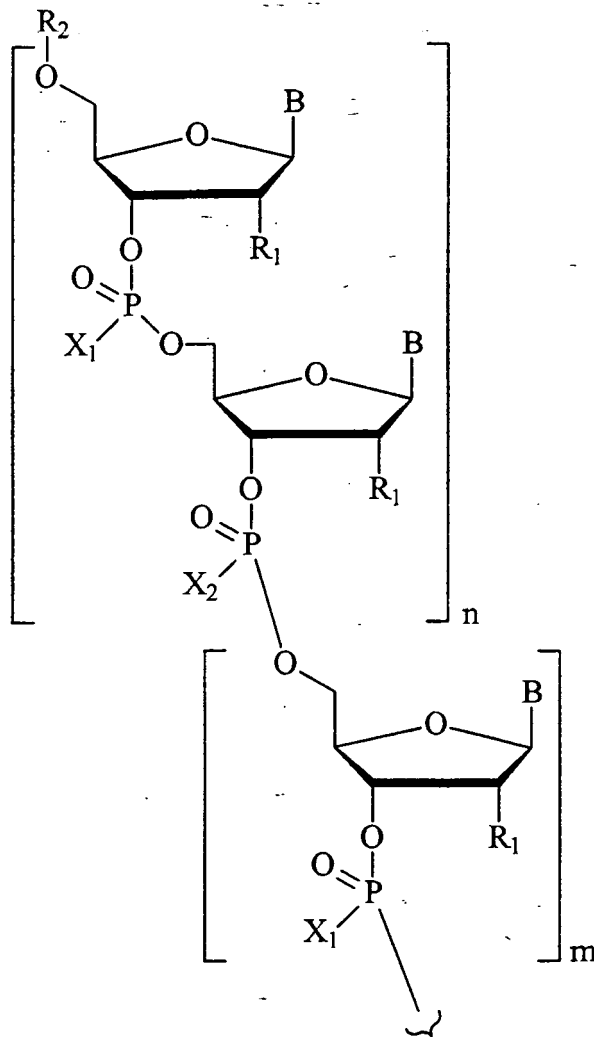
En algunas realizaciones preferidas, R₂ es un oligonucleótido unido a fosfodiéster o un oligonucleótido unido a fosforotioato. En realizaciones adicionales preferidas, R₃ es un oligonucleótido unido a fosfodiéster o un oligonucleótido unido a fosforotioato. En otras realizaciones preferidas, cada uno de R₂ y R₃ es un oligonucleótido unido a fosfodiéster o un oligonucleótido unido a fosforotioato.

La presente invención también proporciona compuestos que tienen la Fórmula:



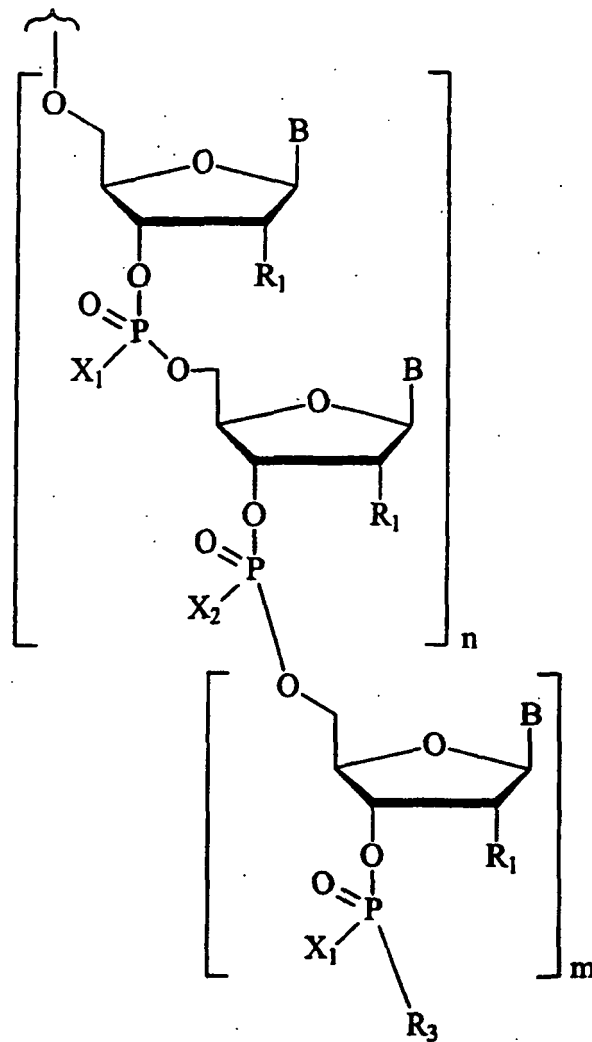
en la que :

W^1 tiene la fórmula:



en la que uno de X_1 o X_2 es O y el otro de X_1 o X_2 es S; y las otras variables constituyentes son como se han definido anteriormente;

W^3 tiene la fórmula:



en la que R₃ es OH, un oligonucleótido o un engarce conectado a un soporte sólido; y W² es una pluralidad de nucleótidos unidos covalentemente ligados por enlaces fosfodiéster o fosforotioato. En algunas realizaciones preferidas, W² es una pluralidad de 2'-desoxinucleótidos unidos covalentemente ligados por enlaces fosfodiéster o fosforotioato.

5 En algunas realizaciones preferidas de los compuestos y procedimientos descritos en el presente documento, R₁ es -O-CH₂-CH₂-O-CH₃-.

En realizaciones preferidas adicionales de los compuestos y procedimientos de la invención, n es de 5 a 50, siendo más preferido de 8 a 30, siendo incluso más preferido de 4 a 15 y siendo especialmente preferido de 2 a 10.

10 En algunas realizaciones preferidas, R₂ es H y R₃ es OH.

La presente invención también proporciona el uso de los compuestos anteriores en medicina.

También se proporcionan procedimientos para ensayar un ácido nucleico que comprende la etapa de poner en contacto una solución que se sospecha que contiene el ácido nucleico con al menos uno de dichos compuestos.

Breve descripción de los dibujos

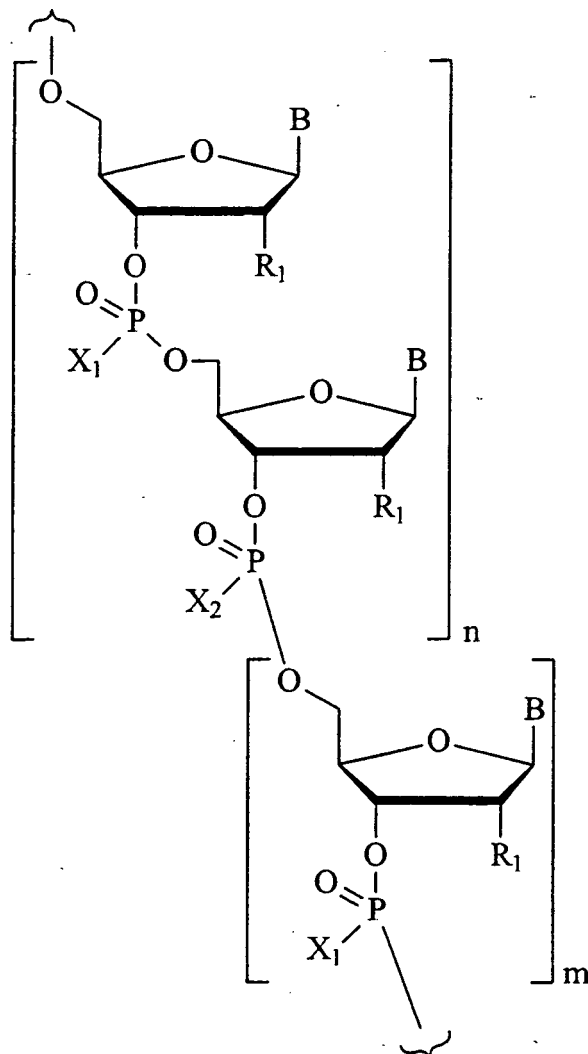
15 La Figura 1 muestra la inhibición de la expresión de ICAM-1 en HUVEC por compuestos de la invención y compuestos de control.

La Figura 2 es un gráfico que muestra ciertos datos farmacocinéticos comparativos para la concentración en plasma IV frente al tiempo para un oligonucleótido de la invención y dos oligonucleótidos de referencia.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el contenido de radiactividad total en un tejido después de la administración IV en embolada de un oligonucleótido de la invención y dos oligonucleótidos de referencia, cada uno administrado a una dosis de 3 mg/kg.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

5 La presente invención proporciona oligonucleótidos que contienen al menos una región de nucleósidos modificados en posición 2' conectada por enlaces fosfodiéster y fosforotioato alternos. En algunas realizaciones preferidas, los compuestos comprenden una pluralidad de nucleósidos modificados en posición 2' unidos covalentemente que tienen la fórmula:



10 en la que:

cada B es una nucleobase;

uno de X₁ o X₂ es O y el otro de X₁ o X₂ es S;

cada R₁ es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₃-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, halógeno, tior, ceto, carboxilo, vitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol o poliéter; o R₁ es un grupo de fórmula Z-R₂₂-(R₂₃)_v;

15

Z es O, S, NH, o N-R₂₂-(R₂₃)_v;

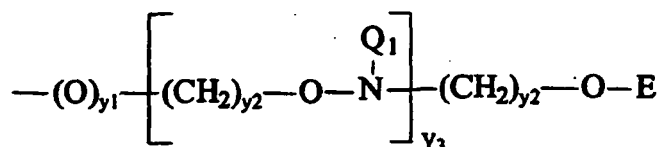
R₂₂ es alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀, o alquinilo C₂-C₂₀;

R₂₃ es hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, tiol, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol, poliéter;

5

v es de 0 a 10;

o R₁ tiene la fórmula:



10

en la que

y₁ es 0 ó 1;

y₂ es independientemente de 0 a 10;

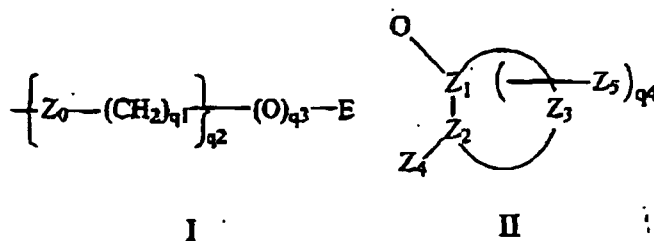
y₃ es de 1 a 10;

E es alquilo C₁-C₁₀, N (Q₁) (Q₂) o N=C (Q₁) (Q₂);

15

cada Q₁ y Q₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₀, alquilo sustituido, dialquilaminoalquilo, un grupo protector de nitrógeno, un grupo conjugado inmovilizado o no inmovilizado, un enlace para un soporte sólido; o Q₁ y Q₂, juntos, están unidos en un grupo protector de nitrógeno o una estructura de anillo que puede incluir al menos un heteroátomo adicional seleccionado entre N y O;

o R₁ tiene una de las fórmulas I o II:



20

en la que

Z₀ es O, S o NH;

q¹ es de 0 a 10;

q² es de 0 a 10;

25

q³ es 0 ó 1;

q⁴ es 0, 1 ó 2;

Z₄ es OM₁, SM₁ o N(M₁)₂;

cada M₁ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₈, haloalquilo C₁-C₈, C(=NH)N(H)M₂, C(=O)N(H)M₂ u OC(=O)N(H)M₂;

30

M₂ es H o alquilo C₁-C₈;

Z₁, Z₂ y Z₃ comprenden un sistema de anillo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, o que tiene de 3 a 6 átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos, en el que dichos heteroátomos se seleccionan entre oxígeno, nitrógeno y azufre, y en el que dicho sistema de anillo es alifático, alifático insaturado, aromático o heterocíclico insaturado o saturado; y

35

Z₅ es alquilo o haloalquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, alquinilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, arilo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono, N(Q₁)(Q₂), OQ₁, halo, SQ₁ o CN;

n es de 2 a 50; y

m es 0 ó 1; y en el que al menos uno de un grupo seleccionado entre 2'-metoxieto, 2'-dimetilaminooxietoxi, 2'-metoxi, 2'-aminopropoxi, flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilalcoxi, O-alquilamino protegido, O-alquilaminoalquilo, O-alquilimidazol, poliéter de la fórmula (O-alquil)_m, m es de 1 a 10 y 2'-SR o 2'-NR₂ en los que cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno, un grupo protector y alquilo, alqueno o alquino sustituido o sin sustituir.

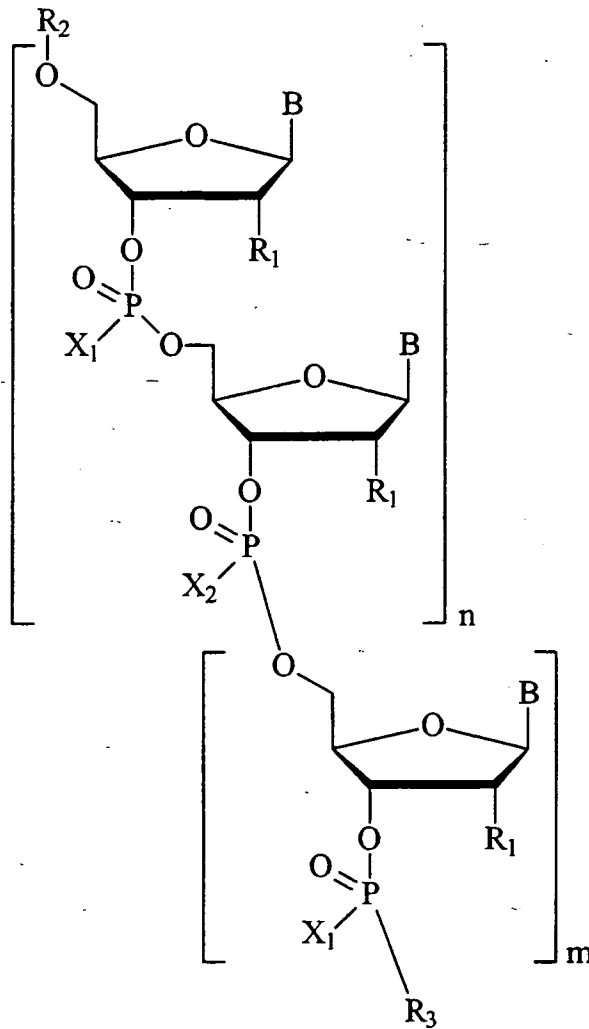
Se sabe que los enlaces fosforotioato son esenciales para ciertas propiedades farmacológicas de los oligonucleótidos, tales como la resistencia a nucleasas. Sin embargo, se cree que un número excesivo de enlaces fosforotioato crea problemas de toxicidad para compuestos farmacéuticos, por ejemplo, al crear algunos efectos secundarios no específicos de secuencia. Se ha descubierto que los compuestos representados por las fórmulas proporcionadas en el presente documento poseen de forma beneficiosa tanto una mejor resistencia a nucleasas con respecto a los oligómeros de fosfodiéster uniformes, como una mayor afinidad de unión con respecto a los oligómeros de fosforotioato. Además, los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden tener una toxicidad reducida con respecto a los oligonucleótidos de fosforotioato uniformes.

Es de esperar que la adición de enlaces fosfodiéster a oligonucleótidos de fosforotioato altere favorablemente la farmacocinética del oligonucleótido (por ejemplo, con respecto a la excreción en orina, distribución preferida en el riñón). Los enlaces fosforotioato/fosfodiéster escalonados también modularán la unión de la proteína a proteínas plasmáticas (suero, albúmina etc.).

Además, se ha propuesto que la captación de fosforotioato se produce por varios mecanismos. Uno de estos mecanismos que se ha propuesto es la endocitosis mediada por receptor. Otro mecanismo propuesto es un mecanismo lanzadera, en el cual los oligonucleótidos de fosforotioato se lanzarán entre proteínas basándose en sus afinidades relativas. De esta manera, el control del número de enlaces fosforotioato presentes en un oligonucleótido, de acuerdo con la presente invención, puede ser crucial para la captación, actividad antisentido y farmacocinética de dichos oligonucleótidos.

Sin desear quedar ligado a un mecanismo particular, se cree que los oligonucleótidos de la presente invención que poseen al menos una región de enlaces fosfodiéster y/o fosforotioato uniformes funcionan por un mecanismo dependiente de la RNasa H, en el que la hibridación conduce a la escisión del dúplex por la RNasa H. También se cree que los oligonucleótidos de la presente invención que tienen un esqueleto de enlaces fosfodiéster/fosforotioato alternos uniforme (es decir, oligonucleótidos en los que el esqueleto entero, o sustancialmente el esqueleto entero está compuesto de enlaces fosfodiéster/fosforotioato alternos) no funcionan por un mecanismo dependiente de RNasa H, sino más bien principalmente 13-15 por un mecanismo de detención de la traducción.

La pluralidad de nucleósidos modificados en posición 2' unidos covalentemente puede formar el oligonucleótido entero, o una parte del mismo. De esta manera, la pluralidad de nucleósidos modificados en posición 2' unidos covalentemente puede localizarse en la parte 3' terminal de un oligonucleótido, la parte 5' terminal de un oligonucleótido o en cualquier posición entre ellas. De esta manera, en algunas realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan oligonucleótidos que tienen la Fórmula:



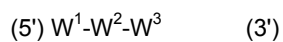
en la que:

X_1 es S; X_2 es O; R_2 es H, un grupo protector de hidroxilo o un oligonucleótido; R_3 es OH, un oligonucleótido o un engarce conectado a un soporte sólido; y las otras variables constituyentes son como se han definido anteriormente.

5

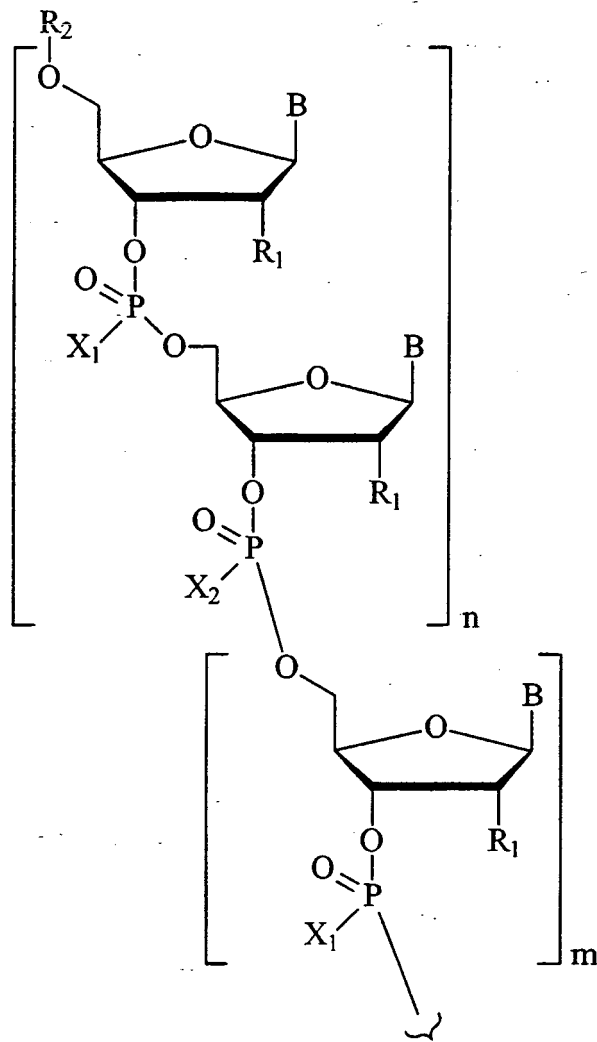
En la fórmula anterior, R_2 , R_3 o ambos puede ser un oligonucleótido unido a fosfodiéster o un oligonucleótido unido a fosforotioato.

La presente invención también proporciona compuestos que tienen la Fórmula:

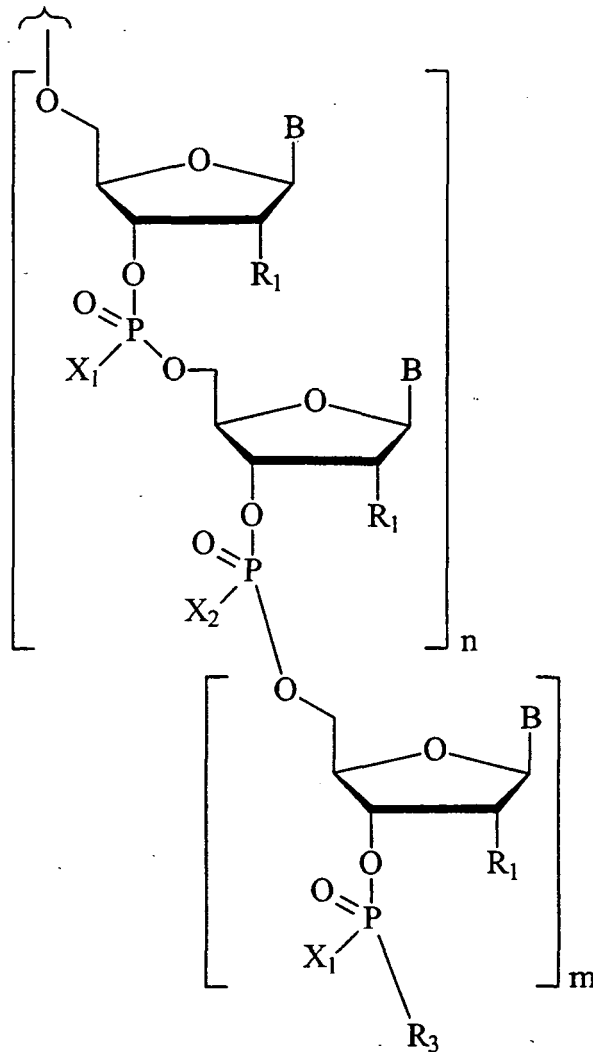


10 en la que:

W^1 tiene la fórmula:



en la que uno de X_1 o X_2 es O, y el otro de X_1 o X_2 es S; las otras variables constituyentes son como se han definido anteriormente;
 W^3 tiene la fórmula:



en la que R_3 es OH, un oligonucleótido o un engarce conectado a un soporte sólido; y

W^2 es una pluralidad de nucleótidos unidos covalentemente ligados por enlaces fosfodiéster o fosforotioato. En algunas realizaciones preferidas, W^2 es una pluralidad de 2'-desoxinucleósidos unidos covalentemente ligados por enlaces fosfodiéster o fosforotioato.

5

En algunas de las realizaciones especialmente preferidas de los compuestos y procedimientos descritos en el presente documento, el sustituyente 2' representado por R_1 es un grupo -O-etil-O-metilo ("MOE").

En algunas realizaciones especialmente preferidas, la región de enlaces fosfodiéster/fosforotioato alternos está al menos en un extremo del oligonucleótido. Se prefiere especialmente que el nucleótido terminal de dicha región tenga un enlace fosforotioato.

10

Los compuestos de la invención pueden tener unido cualquiera de una diversidad de especies de conjugados moleculares que sirven para facilitar la captación, dirección o eficacia del oligonucleótido. Los restos conjugados representativos incluyen fosfolípidos, colesterol, ácido fólico, vitaminas, esteroides y sus derivados. Otras especies conjugadas incluyen proteínas, péptidos, alquilantes, moléculas lipófilas, intercalantes, moléculas de unión a receptores celulares, agentes de entrecruzamiento y otros grupos para modificar propiedades de los oligómeros que incluyen complejos de escisión del ARN, pirenos, quelantes metálicos, porfirinas, híbridos de intercalantes/ligandos y agentes de foto-entrecruzamiento. Los agentes de escisión del ARN incluyen complejos de *o*-fenantrolina/Cu y complejos de $Ru(bipiridina)_3^{2+}$. Los complejos de $Ru(bipiridina)_3^{2+}$ interactúan con ácidos nucleicos y escinden los ácidos nucleicos fotoquímicamente. Los quelantes metálicos incluyen EDTA, DTPA y *o*-fenantrolina. Los alquilantes incluyen compuestos tales como yodoacetamida. Las porfirinas incluyen porfina, sus formas sustituidas y complejos metálicos. Los pirenos incluyen pireno y otros ácidos carboxílicos basados en pireno que pueden conjugarse usando protocolos similares a los especificados anteriormente.

15

20

El término fosfolípido, como se usa en el presente documento, incluye los compuestos que tras la hidrólisis producen ácido fosfórico, un alcohol y uno o más ácidos grasos. Los ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen lecitina, cefalina y esfingomielina.

5 Como se usan en la presente invención, los grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas incluyen grupos que mejoran la captación del oligonucleótido, aumentan la resistencia del oligonucleótido a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de secuencia con el ARN. Los grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción del oligonucleótido.

10 Para los fines de la presente invención, las expresiones "molécula indicadora" y "enzima indicadora" incluyen las moléculas o enzimas que tienen propiedades físicas o químicas que permiten que se identifiquen en geles, fluidos, sistemas celulares enteros, sistemas celulares rotos y similares utilizando propiedades físicas tales como espectroscopía, radiactividad, ensayos colorimétricos, fluorescencia y unión específica. Son particularmente útiles como moléculas indicadoras los fluoróforos, cromóforos y restos que contienen radiomarcadores. Los fluoróforos son moléculas detectables por espectroscopía de fluorescencia. Son ejemplos de fluoróforos preferidos los colorantes de fluoresceína y rodamina y las acridinas. Hay numerosos fluoróforos disponibles en el mercado incluyendo "Rojo Texas" y otras fluoresceínas y rodaminas similares disponibles en Molecular Probes, Eugene, OR. Los cromóforos son moléculas que pueden detectarse por espectroscopía de absorción visible o ultravioleta (UV-VIS). Son ejemplos de cromóforos compuestos aromáticos polinucleares tales como antraceno, perileno, pireno, rodamina y criseno. Los restos que contienen radiomarcadores, como se usan en el presente documento, son moléculas que incorporan al menos un átomo radiactivo, tal como ^3H o ^{14}C , permitiendo de esta manera la detección. Las enzimas indicadoras pueden detectarse directamente o a través de sus productos enzimáticos por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente. Son particularmente útiles como enzimas indicadoras la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante.

25 Las moléculas esteroideas de acuerdo con la invención incluyen los compuestos químicos que contienen un sistema de anillo de perhidro-1,2-ciclopentanofenantreno. Son particularmente útiles como moléculas esteroideas los ácidos biliares, incluyendo el ácido cólico, ácido desoxicólico y ácido deshidrocólico; esteroides incluyendo cortisona, digoxigenina, testosterona y colesterol y esteroides catiónicos tales como cortisona que tienen un grupo trimetilaminometil hidrazida unido a través de un doble enlace en la posición 3 del anillo de cortisona (3-trimetilaminometilhidrazido cortisona).

30 Las proteínas y péptidos se utilizan en su sentido habitual como polímeros de aminoácidos. Normalmente, los péptidos comprenden polímeros que contienen un número menor de aminoácidos por molécula unitaria que las proteínas. Son particularmente útiles como péptidos y proteínas péptidos y proteínas específicos de secuencia incluyendo fosfodiesterasas, peroxidasas, fosfatasa y nucleasas. Dichos péptidos y proteínas incluyen, pero sin limitación, el péptido SV40, RNasa A, RNasa H y la nucleasa de estafilococos.

35 Las moléculas lipófilas incluyen restos aromáticos y no aromáticos naturales y sintéticos tales como ácidos grasos, ésteres y alcoholes, otras moléculas de lípidos, estructuras de jaula tales como adamantano y buckminsterfullerenos, e hidrocarburos aromáticos tales como benceno, perileno, fenantreno, antraceno, naftaleno, pireno, criseno y naftaceno. Son particularmente útiles como moléculas lipófilas hidrocarburos alicíclicos, ácidos grasos saturados e insaturados, ceras, terpenos e hidrocarburos polialicíclicos incluyendo adamantano y buckminsterfullerenos.

40 Los alquilantes de acuerdo con la invención son restos que pueden afectar a la unión de grupos electrófilos a estructuras moleculares diana. Se describen alquilantes representativos por Meyer, y col., J. Am. Chem. Véase, 1989, 111, 8517.

45 Los intercalantes son restos aromáticos policíclicos que pueden insertarse entre pares de bases adyacentes sin afectar a la formación de pares de bases de Watson-Crick normal, e incluyen intercalantes/ligandos híbridos tales como el híbrido de fotonucleasa/ligando intercalante 6-[[[9-[[6-(4-nitrobenzamido)hexil]amino]acridina-4-il]carbonil]amino]hexanoilpentafluorofenil éster. Este compuesto tiene dos características notables: un resto de acridina que es un intercalante y un grupo p-nitrobenzamido que es una fotonucleasa. Otros intercalantes representativos se desvelan por Manoharan, M., Antisense Research and Applications, Crooke y Lebleu, eds., CRC Press; Boca Raton, 1993.

50 Las moléculas de unión a receptores celulares de acuerdo con la invención son vitaminas y restos de carbohidrato para los que existen receptores específicos dentro de una célula. Se desvelan moléculas de unión a receptores celulares representativas en la Solicitud de Patente con el N° de Serie PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992.

55 Los agentes de entrecruzamiento son restos que pueden efectuar la unión covalente intracatenaria o intercatenaria del ARN y/o ADN, e incluyen agentes de foto-entrecruzamiento. Los ejemplos de agentes de foto-entrecruzamiento incluyen aril azidas tales como N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HSAB) y N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (SANPAH). Las aril azidas conjugadas con oligómeros efectuarán el entrecruzamiento con ácidos nucleicos y proteínas tras la irradiación. Se desvelan otros agentes de entrecruzamiento representativos en la

Solicitud de Patente Internacional con el N° de Serie PCT/US93/02059, presentada el 5 de marzo de 1993.

Se desvelan aminos de corona útiles por Studer, y col., Helv. Chim. Acta 1986, 69, 2081 y Smith-Jones, y col., Bioconjugate Chem. 1991, 2, 415.

5 Las vitaminas de acuerdo con la invención generalmente pueden clasificarse como hidrosolubles o liposolubles. Las vitaminas hidrosolubles incluyen tiamina, riboflavina, ácido nicotínico o niacina, el grupo piridoxal de la vitamina B₆, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico y las coenzimas de cobalamina B₁₂, inositol, colina y ácido ascórbico. Las vitaminas liposolubles incluyen la familia de la vitamina A, vitamina D, la familia de la vitamina E tocoferol y la vitamina K (y fitoles). La familia de la vitamina A, incluyendo el ácido retinoico y el retinol, se absorben y transportan a los tejidos diana mediante su interacción con proteínas específicas tales como proteína de unión a retinol citosólica tipo II (CRBP-II), proteína de unión a retinol (RBP) y proteína de unión a retinol celular (CRBP). Estas proteínas, que se han encontrado en diversas partes del cuerpo humano, tienen pesos moleculares de aproximadamente 15 kD. Tienen interacciones específicas con compuestos de la familia de la vitamina A, especialmente el ácido retinoico y el retinol.

15 La familia de compuestos de vitamina A puede unirse a oligómeros de la invención a través de funcionalidades ácido o alcohol encontradas en los diversos miembros de la familia. Por ejemplo, la conjugación de un éster de N-hidroxisuccinimida de un resto ácido de ácido retinoico a una función amina de un grupo colgante del oligómero da como resultado la unión del compuesto de vitamina A al oligómero, a través de un enlace amida. De forma similar, pueden usarse químicas de esterificación convencionales para unir el resto ácido del grupo de ácido retinoico a un oxígeno en posición 4' de un compuesto de la invención, o a una función hidroxilo de un grupo colgante del mismo.

20 El α -tocoferol (vitamina E) y otros tocoferoles (beta a zeta) pueden conjugarse de forma similar con oligómeros también para mejorar la captación debido a su carácter lipófilo. La vitamina lipófila, vitamina D, y sus precursores de ergosterol pueden conjugarse con oligómeros a través de sus grupos hidroxilo activando primero los grupos hidroxilo mediante la formación, por ejemplo, de ésteres de hemisuccinato. Después se realiza la conjugación, tal como, por ejemplo, con un engarce amino colgante del oligómero, o a través de otros grupos funcionales adecuados descritos en el presente documento. Otras vitaminas que pueden conjugarse con oligómeros mediante grupos hidroxilo en las vitaminas incluyen tiamina, riboflavina, piridoxina, piridoxamina, piridoxal y desoxipiridoxina. Las vitaminas K liposolubles y los compuestos que contienen quinona relacionados pueden conjugarse a través de grupos carbonilo en el anillo de quinona. El resto fitol de la vitamina K también puede servir para aumentar la unión de los oligómeros a las células.

30 El piridoxal fosfato es la forma de coenzima de la vitamina B₆. La vitamina B₆ también se conoce como piridoxina. El piridoxal tiene proteínas de unión a B₆ específicas. El papel de estas proteínas en el transporte de piridoxal se ha estudiado por Zhang y McCormick, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991 88, 10407. Zhang y McCormick mostraron que una serie de N-(4'-piridoxil)aminas, en las que se conjugaron varias aminos sintéticas en la posición 4' del piridoxal, podían entrar en las células por un proceso facilitado por el transportador de B₆. Zhang y McCormick también demostraron la liberación de estas aminos sintéticas dentro de la célula. Otros miembros de la familia del piridoxal incluyen piridoxina, piridoxamina, piridoxal fosfato y ácido piridóxico. El ácido piridóxico, niacina, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico y ácido ascórbico pueden conjugarse con oligómeros usando ésteres de N-hidroxisuccinimida como se ha descrito anteriormente para el ácido retinoico.

40 Los compuestos de la invención son resistentes a la degradación por nucleasas y son capaces de modular la actividad del ADN y el ARN.

El término "nucleósido", como se usa en relación con la presente invención, se refiere a una unidad constituida por una base heterocíclica y su azúcar. El término "nucleótido" se refiere a un nucleósido que tiene un grupo fosfato en el grupo hidroxilo del azúcar 3' ó 5'.

45 Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" pretende incluir oligómeros de nucleósidos unidos tanto naturales como no naturales (es decir "sintéticos"). Aunque dichos enlaces generalmente están entre el carbono 3' de un nucleósido y el carbono 5' de un segundo nucleósido (es decir, enlaces 3'-5'), pueden formarse otros enlaces (tales como enlaces 2'-5').

50 Los oligonucleótidos naturales son los que existen en la naturaleza; por ejemplo, oligonucleótidos de ribosa y desoxirribosa fosfodiéster que tienen nucleobases de adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Como se usa en el presente documento, los oligonucleótidos no naturales son oligonucleótidos que contienen un azúcar modificado, enlaces internucleosídicos y/o restos de nucleobases. Dichos análogos oligonucleotídicos típicamente se pueden distinguir estructuralmente, aunque son intercambiables funcionalmente con, los oligonucleótidos de tipo silvestre naturales o sintéticos. De esta manera, los oligonucleótidos no naturales incluyen todas estas estructuras que funcionan eficazmente imitando la estructura y/o función de una cadena de ARN o ADN deseada, por ejemplo, por hibridación con una diana.

55 Las nucleobases representativas incluyen adenina, guanina, citosina, uridina y timina, así como otras nucleobases naturales y no naturales tales como xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de

adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 5-halo uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, oxa, amino, tiol, tioalquil, hidroxil y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-sustituidos y citosinas, 7-metilguanina. Otras nucleobases naturales y no naturales incluyen las desveladas en la Patente de Estados Unidos N° 3.687.808 (Merigan, y col.), en el capítulo 15 por Sanghvi, en Antisense Research and Application, Ed. S. T. Crooke y B. Lebleu, CRC Press, 1993, en English y col., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613-722 (véanse especialmente las páginas 622 y 623, y en the Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, J.I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, páginas 858-859, Cook, Anti-Cancer -Drug Design 1991, 6, 585-607. La expresión "base nucleosídica" pretende incluir además compuestos heterocíclicos que pueden servir como bases nucleosídicas incluyendo ciertas "bases universales" que no son bases nucleosídicas en el sentido más clásico, pero sirven como bases nucleosídicas. Se menciona especialmente como base universal el -nitropirrol.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo sustituyente 2'" representa grupos acoplados a la posición 2' del resto ribosilo, con o sin un átomo de oxígeno.

Los grupos sustituyentes 2' preferidos descritos en el presente documento se representan en los compuestos descritos en el presente documento por la variable R₁, que pueden ser independientemente, H, hidroxilo, alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₃-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, halógeno, tiol, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol o poliéter;

o R₁ es un grupo de fórmula Z-R₂₂-(R₂₃)_v;

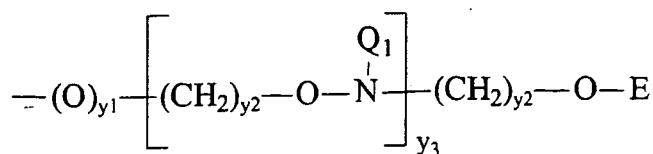
Z es O, S, NH, o N-R₂₂-(R₂₃)_v;

R₂₂ es alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀ o alquinilo C₂-C₂₀;

R₂₃ es hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, tiol, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol, poliéter;

v es de 0 a 10;

o R₁, tiene la fórmula:



y₁ es 0 ó 1;

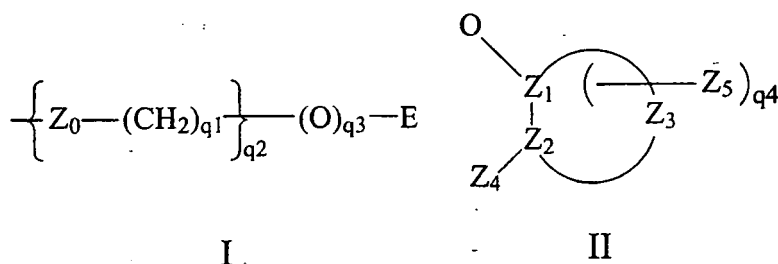
y₂ es independientemente de 0 a 10;

y₃ es 1 a 10;

E es alquilo C₁-C₁₀, N (Q₁) (Q₂) o N=C(Q₁)(Q₂);

cada Q₁ y Q₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₀, alquilo sustituido, dialquilaminoalquilo, un grupo protector de nitrógeno, un grupo conjugado inmovilizado o no inmovilizado, un enlace para un soporte sólido; o Q₁ y Q₂, juntos, están unidos en un grupo protector de nitrógeno o una estructura de anillo que puede incluir al menos un heteroátomo adicional seleccionado entre N y O;

o R₁ tiene una de las fórmulas I o II:



en las que

Z₀ es O, S o NH;

q¹ es de 0 a 10;

q² es de 0 a 10;

q³ es 0 ó 1;

q⁴ es 0, 1 ó 2;

Z₄ es OM₁, SM₁ o (M₁)₂;

cada M₁ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₈, haloalquilo C₁-C₈, C(=NH)N(H)M₂, C(=O)N(H)M₂ u

OC(=O)N(H)M₂

M₂ es H o alquilo C₁-C₈;

Z₁, Z₂ y Z₃ comprenden un sistema de anillo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono o que tiene de 3 a 6 átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos, en el que dichos heteroátomos se seleccionan entre oxígeno, nitrógeno y

azufre y en el que dicho sistema de anillo es alifático, alifático insaturado, aromático o heterocíclico saturado o insaturado; y Z₅ es alquilo o haloalquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alqueno que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, alquino que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, arilo que tiene de 6 a 14 átomos de

carbono, N(Q₁)(Q₂), OQ₁, halo, SQ₁ o CN.

Se describen sustituyentes 2'-O-azúcar de fórmula I representativos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie: 09/130.973, presentada el 7 de agosto de 1998, titulada Capped 2'-Oxyetoxy Oligonucleotides (2'-Oxietoxi Oligonucleótidos Protegidos Terminalmente).

Se describen sustituyentes cíclicos de 2'-O-azúcar representativos de fórmula II en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie: 09/123.108, presentada el 27 de julio de 1998, titulada RNA Targeted 2'-Modified Oligonucleotides that are Conformationally Preorganized (Oligonucleótidos Modificados en posición 2' Dirigidos a ARN que están Preorganizados Conformacionalmente).

Un grupo particularmente preferido incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE] (Martin y col., Helv. Chim. Acta, 1995, 78,486), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo solicitante. Número de Serie 09/016.520, presentada el 30 de enero de 1998. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃) y 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂).

Otras modificaciones preferidas adicionales de 2'-azúcar incluidas en la presente invención incluyen flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilalcoxi, O-alquilamino protegido, O-alquilaminoalquilo, O-alquilimidazol y poliéteres de la fórmula (O-alquil)_m, en la que m es de 1 a 10. Son poliéteres preferidos entre éstos, polietilenglicoles lineales y cíclicos (PEGs) y grupos que contienen (PEG), tales como éteres de corona y los que se desvelan por Ouchi, y col. Drug Design and Discovery 1992, 9, 93, Ravasio, y col., J. Org. Chem. 1991, 56, 4329 y Delgado y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 1992, 9, 249. Se describen modificaciones de azúcar adicionales en Cook, P.D., Anti-Cancer Drug Design, 1991, 6, 585-607. Se describe la sustitución de flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilimidazol, O-alquilaminoalquilo y alquilamino en Solicitud de Patente de Estados Unidos número de serie 08/398.901, presentada el 6 de marzo de 1995, titulada Oligomeric Compounds having Pyrimidine Nucleotide(s) with 2' and 5' Substitutions (Compuestos Oligoméricos que tienen Nucleótido(s) de Pirimidina con Sustituciones 2' y 5').

Otras modificaciones adicionales de 2'-azúcar incluidas en la presente invención incluyen grupos 2'-SR y 2'-NR₂, en los que cada R es, independientemente, hidrógeno, un grupo protector o alquilo, alqueno o alquino sustituido o sin sustituir. Se describen 2'-SR nucleósidos en la Patente de Estados Unidos N° 5.670.633, expedida el 23 de septiembre de 1997. La incorporación de sintones 2'-SR monoméricos por Hamm y col., J. Org. Chem., 1997, 62,

3415-3420. Se describen nucleósidos 2'-NR₂ por Goettingen, M., J. Org. Chem., 1996, 61, 6273-6281; y Polushin y col., Tetrahedron Lett., 1996, 37, 3227-3230.

También se incluyen en la presente invención azúcares que tienen O-sustituciones en el anillo de ribosilo. Las sustituciones representativas para el anillo O incluyen S, CH₂, CHF y CF₂, véase, por ejemplo, Sacrist, y col.,
 5 Abstract 21, Program & Abstracts, Tenth International Roundtable, Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications, Park City, Utah, 16-20 de septiembre de 1992. También pueden realizarse modificaciones adicionales en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Por ejemplo, una modificación adicional de los oligonucleótidos de la invención implica la unión química a uno o más restos del oligonucleótido o conjugados que aumentan la actividad, distribución
 10 celular o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, pero sin limitación, restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553), ácido cólico (Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan y col., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306; Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765), un tiocolésterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras y col., EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanov y col., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk y col., Biochimie, 1993, 75, 49), un fosfolípido; por ejemplo, dihexadecil-*rac*-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-*rac*-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea y col., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan y col., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969) o ácido adamantano acético (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651), un resto palmitilo (Mishra y col., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229) o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923).

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye, pero sin limitación, grupos hidrocarburo insaturados de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos que incluyen, pero sin limitación, grupos metilo, etilo e isopropilo. Los grupos alquilo de la presente invención pueden estar sustituidos. Se describen sustituyentes alquilo representativos en la Patente de Estados Unidos N° 5.212.295, en la columna 12, líneas 41-50.

Son grupos alqueno de acuerdo con la invención, grupos hidrocarburo de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono, y son grupos alquilo grupos hidrocarburo de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos que contienen al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alqueno y alquilo de la presente invención pueden estar sustituidos.

30 Son grupo arilo restos cíclicos aromáticos sustituidos o sin sustituir que incluyen, pero sin limitación, grupos fenilo, naftilo, antracilo, fenantrilo, pirenilo y xililo. Son grupos alquilo aquellos en los que un resto arilo une un resto alquilo con una estructura central y son grupos aralquilo aquellos en los que un resto alquilo une un resto arilo con una estructura central.

En general, el término "hetero" representa un átomo distinto de carbono, preferentemente pero no exclusivamente N, O o S. Por consiguiente, el término "heterocicloalquilo" representa un sistema de anillo alquilo que tiene uno o más heteroátomos (es decir, átomos distintos de carbono). Los grupos heterocicloalquilo preferidos incluyen, por ejemplo, grupos morfolino. Como se usa en el presente documento, el término "heterocicloalqueno" representa un sistema de anillo que tiene uno o más dobles enlaces y uno o más heteroátomos. Los grupos heterocicloalqueno preferidos incluyen, por ejemplo, grupos pirrolidino.

40 Los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención que pueden hibridar con un ácido nucleico diana preferentemente comprenden de 5 a 50 nucleósidos. Es más preferido que dichos compuestos comprendan de 8 a 30 nucleósidos, siendo particularmente preferido de 15 a 25 nucleósidos. Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico diana es cualquier ácido nucleico que puede hibridar con un compuesto de tipo ácido nucleico complementario. Además, en el contexto de la presente invención, "hibridación" significará formación de enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertidos entre nucleobases complementarias. "Complementario", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un emparejamiento preciso entre dos nucleobases. Por ejemplo, la adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de enlaces de hidrógeno. "Complementario" y "hibridable específicamente", como se usan en el presente documento, se refieren al emparejamiento preciso o
 45 complementariedad de secuencia entre un primer y un segundo oligómeros de tipo ácido nucleico que contienen subunidades nucleosídicas. Por ejemplo, si una nucleobase en cierta posición del primer ácido nucleico es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase en la misma posición del segundo ácido nucleico, entonces el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico se consideran complementarios entre sí en esa posición. El primer y segundo ácidos nucleicos son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleobases que pueden formar enlaces de hidrógeno entre
 50
 55

sí. De esta manera, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad de tal forma que se produzca una unión estable y específica entre un compuesto de la invención y una molécula de ARN diana. Se entiende que un compuesto oligomérico de la invención no necesita ser complementario al 100% con su secuencia de ARN diana para ser específicamente hibridable. Un compuesto oligomérico es hibridable específicamente cuando la unión del compuesto oligomérico a la molécula de ARN diana interfiere con la función normal del ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

Los enlaces fosforotioato en los oligonucleótidos de la invención se preparan usando la química de fosforamidita convencional, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático (por ejemplo Applied Biosystems modelo 380B) y oxidación con una solución 0,2 M de 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona en acetonitrilo para la tianción por etapas de los enlaces fosfito. Los enlaces fosforotioato que tienen configuración Sp pueden prepararse, en general, de acuerdo con los procedimientos descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.212.295, 5.587.361 y 5.599.797. En realizaciones preferidas, se usan amiditas modificadas en posición 2' para sintetizar compuestos de la invención de acuerdo con regímenes de fosforamidita convencionales. En realizaciones especialmente preferidas, las amiditas tienen un sustituyente 2'-metoxietoxi (-O-CH₂-CH₂-O-CH₃, "MOE").

Como se reconocerá, la presente invención se refiere a oligonucleótidos que presentan una mayor estabilidad con respecto a sus homólogos naturales. Las nucleasas extracelulares e intracelulares generalmente no reconocen (y, por lo tanto, no se unen a) los compuestos de la invención. Los enlaces internucleosídicos modificados de la presente invención preferentemente reemplazan los enlaces fosfodiéster-5'-metileno naturales para conferir resistencia a nucleasas.

Los oligonucleótidos de la invención pueden usarse en diagnóstico, terapia y como reactivos de investigación y kits. Pueden usarse en composiciones farmacéuticas incluyendo un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable de manera adecuada. Además, pueden usarse para tratar organismos que tienen una enfermedad caracterizada por la producción indeseada de una proteína. El organismo debe ponerse en contacto con un oligonucleótido que tenga una secuencia que es capaz de hibridar específicamente con una cadena de ácido nucleico que codifica la proteína indeseable. Los tratamientos de este tipo pueden ponerse en práctica en una diversidad de organismos que varían desde organismos unicelulares procariotas y eucariotas a organismos multicelulares eucariotas. Cualquier organismo que utilice la transcripción de ADN-ARN o la traducción de ARN-proteína como parte fundamental de su control hereditario, metabólico o celular es susceptible del tratamiento terapéutico y/o profiláctico de acuerdo con la invención. De forma similar, pueden tratarse diversos organismos tales como bacterias, levaduras, protozoos, algas, todas las plantas y todas las formas animales superiores, incluyendo animales de sangre caliente. Además, puede tratarse cada célula de eucariotas multicelulares, ya que incluyen tanto la transcripción de ADN-ARN como la traducción de ADN-proteínas como partes integrales de su actividad celular. Además, muchos de los orgánulos (por ejemplo, mitocondrias y cloroplastos) de las células eucariotas también incluyen mecanismos de transcripción y traducción. De esta manera, dentro de la definición de organismos que pueden tratarse con oligonucleótidos terapéuticos o de diagnóstico también pueden incluirse células individuales, poblaciones celulares u orgánulos.

Algunas indicaciones terapéuticas representativas y otros usos para los compuestos de la invención son los siguientes. Una indicación terapéutica de interés particular es la psoriasis. La psoriasis es una enfermedad común crónica y recurrente caracterizada por pápulas descamativas, plateadas, bien delimitadas, secas y placas de diversos tamaños. La enfermedad varía en gravedad desde unas pocas lesiones a una dermatosis generalizada con artritis discapacitante o exfoliación. No se conoce la causa última de la psoriasis, pero la fuerte descamación que se produce probablemente se debe a un aumento de la proliferación de células epidérmicas (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ª Ed., págs. 22-83, 2285, Berkow y col., eds., Rahway, N.J., 1987). Se ha mostrado que inhibidores de la Proteína Quinasa C (PKC) tienen tanto efectos antiproliferativos como antiinflamatorios *in vitro*. Se ha mostrado que algunos fármacos anti-psoriasis tales como la ciclosporina A y antralina, inhiben la PKC, y la inhibición de la PKC se ha sugerido como un enfoque terapéutico para el tratamiento de la psoriasis (Hegemann, L. y G. Mahrle, Pharmacology of the Skin, H. Mukhtar, ed., págs. 357-368, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992). En las Patentes de Estados Unidos N° 5.620.963 de Cook y col. y 5.681.747 de Boggs y col. se describen compuestos antisentido dirigidos a la proteína quinasa C (PKC).

Otro tipo de indicación terapéutica de interés son los trastornos inflamatorios de la piel. Se producen en una diversidad de formas que incluyen, por ejemplo, liquen plano, necrosis epidérmica tóxica (NET), eritema multiforme y similares (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ª Ed., págs. 2286-2292, Berkow y col., eds., Rahway, N.J., 1987). La expresión de ICAM-1 se ha asociado con una diversidad de trastornos inflamatorios de la piel tales como dermatitis alérgica de contacto, exantema fijo medicamentoso, liquen plano y psoriasis (Ho y col., J. Am. Acad. Dermatol., 1990, 22, 64; Griffiths y col., Am. J. Pathology, 1989, 135, 1045; Lisby y col., Br. J. Dermatol., 1989, 120, 479; Shiohara y col., Arch. Dermatol., 1989, 125, 1371; Regezi y col., Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 1996, 81, 682). Además, la administración intraperitoneal de un anticuerpo monoclonal contra ICAM-1 reduce la infiltración de eosinófilos inducida por ovoalbúmina en la piel en ratones (Hakugawa y col., J. Dermatol., 1997, 24, 73). Se describen compuestos antisentido dirigidos a ICAM-1 en las Patentes de Estados Unidos N° 5.514.788 y 5.591.623,

y en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente, con los N° de Serie 09/009.490 y 09/062.416, 20 de enero de 1998 y 17 de abril de 1998, respectivamente, todas de Bennett y col.

Otras dianas antisentido para trastornos inflamatorios de la piel son VCAM-1 y PECAM-1. La administración intraperitoneal de un anticuerpo monoclonal contra VCAM-1 reduce la infiltración de eosinófilos inducida por ovoalbúmina en la piel de ratones (Hakugawa y col., J., Dermatol., 1997, 24, 73). Se describen compuestos antisentido dirigidos contra VCAM-1 en las Patentes de Estados Unidos N° 5.514.788 y 5.591.623. Las proteínas PECAM-1 son glicoproteínas que se expresan en las superficies de una diversidad de tipos celulares (como revisión, véase Newman, J. Clin. Invest., 1997, 99, 3 y DeLisser y col., Immunol. Today, 1994, 15, 490). Además de participar directamente en interacciones célula-célula, PECAM-1 aparentemente también regula la actividad y/o expresión de otras moléculas implicadas en interacciones celulares (Litwin y col., J. Cell Biol., 1997, 139, 219) y, por lo tanto, es un mediador clave de varias interacciones célula:célula. Se describen compuestos antisentido dirigidos contra PECAM-1 en la Solicitud de Patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente, con el N° de Serie 09/044.506, presentada el 19 de marzo de 1998 por Bennett y col.

Otro tipo de indicación terapéutica de interés para oligonucleótidos incluye una diversidad de cánceres de la piel. Los cánceres de piel representativos incluyen tumores benignos (verrugas, lunares y similares) y tumores malignos tales como, por ejemplo, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, enfermedad de Paget, sarcoma de Kaposi y similares (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ª Ed., págs. 2301-2310, Berkow y col., eds., Rahway, N.J., 1987). Varias dianas moleculares implicadas en el mantenimiento en la tumorigénesis del estado hiperproliferativo y metástasis sirven como objetivo para prevenir o inhibir cánceres de piel, o para prevenir su extensión a otros tejidos.

Los oncogenes *ras* son proteínas de unión a guanina que se han implicado en el cáncer, por ejemplo, por el hecho de que se han encontrado oncogenes *ras* activados en aproximadamente un 30% de los tumores humanos en general; esta cifra se aproxima al 100% en carcinomas del páncreas exocrino (como revisión, véase Downward, Trends in Biol. Sci., 1990, 15, 469). Se describen compuestos antisentido dirigidos a H-ras y K-ras en la Patente de Estados Unidos N° 5.582.972 de Lima y col., 5.582.986 de Monia y col. y 5.661.134 de Cook y col., y en la Solicitud PCT publicada WO 94/08003.

La Proteína Quinasa C (PKC) también se ha implicado en la tumorigénesis. Se describen compuestos antisentido dirigidos a proteínas del grupo de la Proteína Quinasa C (PKC) en las Patentes de Estados Unidos N° 5.620.963 de Cook y col. y 5.681.747 de Boggs y col. También son de interés las subunidades AP-1 y las proteínas JNK, particularmente en relación con sus papeles en la tumorigénesis y metástasis. El proceso de metástasis implica una secuencia de acontecimientos en la que (1) una célula cancerosa se separa de sus matrices extracelulares, (2) la célula cancerosa separada migra a otra parte del cuerpo del animal, con frecuencia a través del sistema circulatorio y (3) se une a una matriz extracelular distal e inapropiada, creando de esta manera un foco a partir del cual puede producirse un tumor secundario. Las células normales no poseen la capacidad de invadir o metastatizar y/o experimentar apoptosis (muerte celular programada) si se producen dichos acontecimientos (Ruoslahti, Sci. Amer., 1996, 275, 72). Sin embargo, muchos tumores humanos tienen niveles elevados de actividad de una o más metaloproteinasas de matriz (MMP) (Stetler Stevenson y col., Annu. Rev. Cell Biol., 1993, 9, 541; Bernhard y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 1994, 91, 4293. Las MMP son una familia de enzimas que tienen la capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular (Birkedal-Hansen, Current Op. Biol., 1995, 7, 728). En particular, con frecuencia se ha observado que un miembro de esta familia, la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9), se expresa únicamente en tumores y otros tejidos enfermos (Himelstein y col., Invasion & Metastasis, 1994, 14, 246).

Varios estudios han mostrado que la regulación del gen de MMP-9 puede controlarse por el factor de transcripción AP-1 (Kerr y col., Science, 1988, 242, 1242; Kerr y col., Cell, 1990, 61, 267; Gum y col., J. Biol. Chem., 1996, 271, 10672; Hua y col., Cancer Res., 1996, 56, 5279). Se ha mostrado que la inhibición de la función de AP-1 atenúa la expresión de MMP-9 (Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/837.201). AP-1 es una proteína heterodimérica que tiene dos subunidades, los productos génicos de *fos* y *jun*. Se describen compuestos antisentido dirigidos a *c-fos* y *c-jun* en la Solicitud de Patente de Estados Unidos, en trámite junto con la presente, con el N° de Serie 08/837.201 presentada el 14 de marzo de 1997 por Dean y col.

Además, la AP-1 se autoactiva en ciertas circunstancias por fosforilación de la subunidad Jun en una posición amino-terminal por quinasas Jun N-terminales (JNK). De esta manera, es de esperar que la inhibición de una o más JNK dé como resultado una reducción de la actividad de AP-1 y, por consiguiente, una menor expresión de MMP. Se describen compuestos antisentido dirigidos a JNK en la Solicitud de Patente de Estados Unidos, en trámite junto con la presente, con el N° de Serie 08/910.629, presentada el 13 de agosto de 1997 por Dean y col.

Las enfermedades infecciosas de la piel se producen por agentes virales, bacterianos o fúngicos. En el caso de la enfermedad de Lyme, el agente causante de la misma transmitido por garrapatas, la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, regula positivamente la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1 en células endoteliales *in vitro*. (Boggemeyer y col., Cell Adhes. Comm., 1994, 2, 145). Además, se ha propuesto que la mediación de la enfermedad por el agente antiinflamatorio prednisolona se debe en parte a la mediación de esta regulación positiva de moléculas de adhesión (Hurtenbach y col., Int. J. Immunopharmac., 1996, 18, 281). De esta manera, las dianas potenciales para la mediación terapéutica (o prevención) de la enfermedad de Lyme incluyen ICAM-1, VCAM-1 y

ELAM-1 (*supra*).

Otra enfermedad infecciosa de la piel que es susceptible de tratamiento usando las composiciones de la invención incluye trastornos debidos a la infección por agentes bacterianos, virales o fúngicos (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ª Ed., págs. 2263-2277, Berkow y col., eds., Rahway, N.J., 1987).

- 5 Con respecto a infecciones de la piel producidas por agentes fúngicos, la Patente de Estados Unidos Nº 5.691.461 proporciona compuestos antisentido para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*.

Con respecto a las infecciones de la piel producidas por agentes virales, las Patentes de Estados Unidos 5.166.195, 5.523.389 y 5.591.600 proporcionan inhibidores oligonucleotídicos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La Patente de Estados Unidos 5.004.810 proporciona oligómeros capaces de hibridar con el ARNm de Vmw65 del virus del herpes simple e inhibir su replicación. Las Patentes de Estados Unidos 5.194.428 y 5.580.767 proporcionan compuestos antisentido que tienen actividad antiviral contra el virus de la gripe. La Patente de Estados Unidos 4.806.463 proporciona compuestos antisentido y procedimientos que los usan para inhibir la replicación de HTLV-III. Las Patentes de Estados Unidos 4.689.320, 5.442.049, 5.591.720 y 5.607.923 se refieren a compuestos antisentido como agentes antivirales específicos para citomegalovirus (CMV). La Patente de Estados Unidos 5.242.906 proporciona compuestos antisentido útiles en el tratamiento de infecciones latentes por el virus de Epstein-Barr (EBV). Las Patentes de Estados Unidos 5.248.670, 5.514.577 y 5.658.891 proporcionan compuestos antisentido útiles en el tratamiento de infecciones por herpesvirus. Las Patentes de Estados Unidos 5.457.189 y 5.681.944 proporcionan compuestos antisentido útiles en el tratamiento de infecciones por papilomavirus. Los compuestos antisentido desvelados en estas patentes, que se incorporan en el presente documento por referencia, pueden usarse con las composiciones de la invención para conseguir un alivio profiláctico, paliativo o terapéutico de enfermedades producidas o exacerbadas por los agentes patógenos indicados.

Los oligonucleótidos antisentido empleados en las composiciones de la presente invención también pueden usarse para determinar la naturaleza, función y relación potencial de diversos componentes genéticos del cuerpo con enfermedades o estados corporales en los animales. Hasta ahora, la función de un gen se ha examinado principalmente por la construcción de mutaciones de pérdida de función en el gen (es decir, mutaciones "knock-out") en un animal (por ejemplo, un ratón transgénico). Dichas tareas son difíciles, requieren tiempo y no pueden realizarse para genes esenciales al desarrollo animal, ya que la mutación "knock-out" produciría un fenotipo letal. Además, el fenotipo de pérdida de función no puede introducirse de forma transitoria durante una parte particular del ciclo de vida o estado patológico del animal; la mutación "knock-out" siempre está presente. Las mutaciones "knock-out antisentido", es decir, la modulación selectiva de la expresión de un gen por oligonucleótidos antisentido, en lugar de por manipulación genética directa, soluciona estas limitaciones (véase, por ejemplo, Albert y col., Trends in Pharmacological Sciences, 1994, 15, 250). Además, algunos genes producen una diversidad de transcritos de ARNm como resultado de procesos tales como corte y empalme alternativo; una mutación "knock-out" típicamente elimina todas las formas de transcritos de ARNm producidos a partir de dichos genes y, por lo tanto, no puede usarse para examinar el papel biológico de un transcrito de ARNm particular. Se han administrado sistemáticamente oligonucleótidos antisentido a ratas para estudiar el papel del receptor N-metil-D-aspartato en la muerte neuronal, a ratones para investigar el papel biológico de la proteína quinasa C- α , y a ratas para examinar el papel del receptor de neuropéptido Y1 en la ansiedad (Wahlestedt y col., Nature, 1993, 363:260; Dean y col., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 1994, 91:11762; y Wahlestedt y col., Science 1993, 259:528, respectivamente). En casos en los que se están investigando familias complejas de proteínas relacionadas, los "knock-out antisentido" (es decir, inhibición de un gen por administración sistémica de oligonucleótidos antisentido) pueden representar el medio más preciso para examinar un miembro específico de la familia (véase, en general, Albert y col., Trends Pharmacol. Sci. 1994, 15:250). Al proporcionar composiciones para la administración sencilla no parenteral de oligonucleótidos y otros ácidos nucleicos, la presente invención soluciona estos y otros inconvenientes.

45 Se considera que la administración de composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos de la invención está dentro de la experiencia de los expertos en la materia. En general, a un paciente que necesita terapia o profilaxis se le administra una composición que comprende un compuesto de la invención, comúnmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en dosis que varían de 0,01 μ g a 100 g por kg de peso corporal dependiendo de la edad del paciente y la gravedad del trastorno o estado patológico que se está tratando. La dosificación depende de la gravedad y respuesta del estado patológico a tratar, durando el curso de tratamiento desde varios días a varios meses, o hasta que se consiga la curación o una disminución o prevención del estado patológico. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los compuestos antisentido individuales, y en general puede estimarse basándose en los valores de CE₅₀ considerados eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*.

En el contexto de la invención, la expresión "régimen de tratamiento" pretende incluir modalidades terapéuticas, paliativas y profilácticas de administración de una o más composiciones de la invención. Un régimen de tratamiento particular puede durar un período de tiempo que variará dependiendo de la naturaleza de la enfermedad o trastorno particular, su gravedad y el estado general del paciente, y puede extenderse de una vez al día a una vez cada 20 años. Después del tratamiento, se supervisa al paciente para determinar los cambios en su estado y para aliviar los

síntomas del trastorno o estado patológico. La dosificación de la composición puede aumentarse en caso de que el paciente no responda significativamente a los niveles de dosificación actuales, o la dosis puede reducirse si se observa un alivio de los síntomas del trastorno o estado patológico, o si ha desaparecido el trastorno o estado patológico.

- 5 Se usa un programa de dosificación óptimo para suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz del oligonucleótido de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", para los fines de la invención, se refiere a la cantidad de composición farmacéutica que contiene oligonucleótido que es eficaz para conseguir un fin deseado sin efectos secundarios indeseables (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica). Aunque las necesidades individuales pueden variar, la determinación de intervalos óptimos para cantidades eficaces de composiciones farmacéuticas está dentro de la experiencia en este campo. Las dosis humanas pueden extrapolarse a partir de estudios animales (Katocs y col., Capítulo 27 En: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990). En general, la dosificación necesaria para proporcionar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que puede ajustarse por un experto en la materia, variará dependiendo de la edad, salud, estado físico, peso, tipo y grado de la enfermedad o trastorno del receptor, frecuencia de tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay) y la naturaleza y alcance del efecto o efectos deseados (Nies y col., Capítulo 3 En: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª Ed., Hardman y col., eds, McGraw-Hill, Nueva York, NY, 1996).

Después de un tratamiento satisfactorio, puede ser deseable someter al paciente a una terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición del estado patológico, en la que el agente bioactivo se administra en dosis de mantenimiento que varían de 0,01 ug a 100 g por kg de peso corporal, una o más veces al día, a una vez cada 20 años. Por ejemplo, en caso de que se sospeche o se sepa que un individuo es propenso a una afección autoinmune o inflamatoria, pueden conseguirse efectos profilácticos por administración de dosis preventivas, que varían de 0,01 ug a 100 g por kg de peso corporal, una o más veces al día, hasta una vez cada 20 años. De una forma similar, un individuo puede hacerse menos susceptible a una afección inflamatoria que se espera que se produzca como resultado de algún tratamiento médico, por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped resultante del trasplante de células, tejidos o un órgano en el individuo.

También se incluyen en la invención modalidades profilácticas para individuos de alto riesgo. Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "individuo de alto riesgo" se refiere a un individuo para el que se ha determinado, por ejemplo, a través de una historia individual o familiar o ensayo genético, que tiene una probabilidad significativamente mayor de lo normal de ser susceptible a la aparición o recurrencia de una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, un sujeto animal podría tener una historia médica personal y/o familiar que incluye apariciones frecuentes de una enfermedad o trastorno particular. Como otro ejemplo, en un sujeto animal se podría haber determinado dicha susceptibilidad por exploración genética de acuerdo con técnicas conocidas en este campo (véase, por ejemplo, U.S. Congress, Office of Technology Assessment, Capítulo 5 En: Genetic Monitoring and Screening in the Workplace, OTABA-455, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1990, páginas 75-99). Como parte de un régimen de tratamiento para un individuo de alto riesgo, el individuo puede tratarse profilácticamente para prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad o trastorno. Se entiende que la expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una composición farmacéutica que produce un efecto observado como la prevención de la aparición o recurrencia de una enfermedad o trastorno. Las cantidades profilácticamente eficaces de una composición farmacéutica típicamente se determinan por el efecto que tienen en comparación con el efecto observado cuando se administra una segunda composición farmacéutica que carece del agente activo a un individuo con una situación similar.

Para su uso terapéutico, el análogo oligonucleotídico se administra a un animal que padece una enfermedad modulada por alguna proteína. Se prefiere administrar a pacientes que se sospecha que padecen dicha enfermedad una cantidad de análogo oligonucleotídico que sea eficaz para reducir la sintomatología de esa enfermedad. Un experto en la materia puede determinar dosificaciones óptimas y programas de tratamiento para dichos regímenes de tratamiento.

Se prefiere que la parte de ARN o ADN que se va a modular se preseleccione para comprender la parte de ADN o ARN que codifica la proteína cuya formación o actividad se desea modular. La parte de dirección de la composición a emplear, de esta manera, se selecciona para ser complementaria a la parte preseleccionada de ADN o ARN, es decir para ser un oligonucleótido antisentido para esa parte.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, los compuestos de la invención hibridan con ARNm de VIH que codifica la proteína tat, o con la región TAR del ARNm de VIH. En otra realización preferida, los compuestos imitan la estructura secundaria de la región TAR del ARNm de VIH, y al hacer esto se unen a la proteína tat. Otros compuestos preferidos son secuencias complementarias para virus del herpes, papilomavirus y otros virus.

En general, se prefiere administrar los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención internamente, tal como por vía oral, intravenosa o intramuscular. También pueden ser útiles otras formas de administración tales como la vía transdérmica, tópica o por intralesional. También puede ser útil la inclusión en supositorios. También se prefiere para algunas realizaciones el uso de vehículos farmacológicamente aceptables.

La presente invención también se refiere a procedimientos para la unión selectiva de ARN para fines de investigación y diagnóstico. Dicha unión selectiva, fuerte, se consigue por interacción de dicho ARN o ADN con composiciones de la invención que son resistentes a nucleasas de degradación y que hibridan más fuertemente y con mayor fidelidad que oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos conocidos.

- 5 Otros objetos, ventajas y nuevas características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos y no deben considerarse limitantes.

Ejemplo 1 - Preparación de Oligonucleótidos

Síntesis de oligonucleótidos

10 Se sintetizaron oligonucleótidos en un Sistema de Síntesis de Ácidos Nucleicos Perseptive Biosystems Expedite 8901. A continuación se resume el protocolo de síntesis a escala 1 μ mol. Se usaron dos sintetizadores. Uno se ajustó para realizar el protocolo de diéster (P=O) y el otro para realizar el protocolo de tioato (P=S). Se retiraron grupos tritilo con ácido tricloroacético (975 μ l durante un minuto) seguido de lavado con acetonitrilo.

Protocolo de fosfodiéster (P=O)

15 Se acoplaron todas las 2'-desoxiamiditas (0,1 M) convencionales dos veces por ciclo (el tiempo de acoplamiento total fue aproximadamente de 4 minutos). Se disolvieron todas las amiditas nuevas (modificadas en posición 2') en acetonitrilo seco (100 mg de amidita/1 ml de acetonitrilo) para dar soluciones aproximadamente 0,08-0,1 M. El tiempo de acoplamiento total fue aproximadamente 6 minutos (105 μ l de amidita administrados). Se usó 1-H-tetrazol en acetonitrilo como agente de activación. La amidita en exceso se retiró por lavado con acetonitrilo. Se usó (1S)-
20 (+)-(10-canforsulfonil)oxaziridina (CSO, 1,0 g de CSO/8,72 ml de acetonitrilo seco) para oxidar (etapa de espera de 4 minutos), administrando aproximadamente 375 μ l de oxidante.

Protocolo de tioato (P=S)

25 Se administraron las mismas cantidades de amiditas y reactivos a las columnas usando el protocolo de tioato, con la excepción de que la cantidad de oxidante, 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona (reactivo Beaucage, 3,4 g de reactivo Beaucage/200 ml de acetonitrilo), fue 225 μ l (etapa de espera de un minuto). En ambos protocolos, las funcionalidades sin reaccionar se protegieron con una mezcla 50:50 de tetrahidrofurano/anhídrido acético y tetrahidrofurano/piridina/1-metil imidazol. Los rendimientos de tritilo se siguieron mediante la supervisión del tritilo a lo largo de la duración de la síntesis. El grupo DMT final se dejó intacto.

Protocolos de 10 μ mol

30 Se usaron aproximadamente 300 mg de CPG para cada síntesis de 10 μ mol. Para los acoplamientos de diéster (P=O), se usó el siguiente protocolo: se realizó la retirada del grupo tritilo usando 7,5 ml de ácido tricloroacético. El acoplamiento de las dos amiditas, convencionales y nuevas, (0,8-0,1 M) se consiguió usando un ciclo de acoplamiento de 23 minutos, administrando aproximadamente 750 μ l de amidita. Se administraron aproximadamente 2,7 ml de oxidante (CSO) durante 3 minutos. La protección se realizó durante 80 segundos con 1,8 ml de una mezcla 50:50 de tetrahidrofurano/anhídrido acético y tetrahidrofurano/piridina/1-metil imidazol. Los acoplamientos de
35 tioato (P=S) retiraron los grupos tritilo con 7,5 ml de ácido tricloroacético. Los acoplamientos de amiditas convencionales 0,1 M se consiguieron usando 750 μ l de solución durante 6,6 minutos. Los acoplamientos de amiditas nuevas se realizaron usando 750 μ l de soluciones 0,08-0,1 M, administradas durante 23 minutos. Se administraron aproximadamente 2,7 ml de oxidante durante 3 minutos. La protección se realizó durante 80 segundos con 1,8 ml de una mezcla 50:50 de tetrahidrofurano/anhídrido acético y tetrahidrofurano/piridina/1-metil imidazol.

40 A 55 °C, las síntesis de 1 μ mol se desprotegeron y se escindieron del CPG en 1-2 ml de hidróxido de amonio (NH₄OH) al 28,0-30% durante aproximadamente 16 horas. La síntesis de 10 μ mol de CPG se dividió en 2 viales para la escisión como se ha descrito anteriormente. Se añadieron 5 mg de NH₄OH a cada vial.

Purificación de Oligonucleótidos

45 Después de la etapa de desprotección, las muestras se filtraron del CPG usando filtros de jeringa acrodisc de nylon de 0,45 μ m Gelman. El exceso de NH₄OH se retiró por evaporación en un speed vac automático Savant AS160. El rendimiento bruto se midió en un espectrofotómetro de diodos en fila Hewlett Packard 8452A a 260 nm. Después, las muestras en bruto se analizaron por espectrometría de masas (EM) en un espectrómetro de masas de electronebulización Hewlett Packard. Se purificaron trityl-on oligonucleótidos por cromatografía líquida de alta

resolución (HPLC). preparativa de fase inversa. Las condiciones de HPLC fueron las siguientes: Waters 600E con detector 991; columna Waters Delta Pak C4 (7,8 x 300 mm); Disolvente A: acetato de trietilamonio 50 mM (TEA-Ac), pH 7,0; B: acetonitrilo 100%; caudal 2,5 ml/min; el gradiente para **22592** y **25303**: 5% de B durante los primeros cinco minutos con incremento lineal en B hasta el 80% durante los siguientes 55 minutos. El gradiente para **18268**:
5 5% de B durante los primeros cinco minutos con incremento lineal en B hasta el 60% durante los siguientes 55 minutos. Las fracciones que contenían el producto deseado se recogieron y el disolvente se retiró por secado en el speed vac. Los oligonucleótidos destritaron en ácido acético al 80% durante aproximadamente 60 minutos y se liofilizaron de nuevo. El tritilo libre y la sal en exceso se retiraron pasando los oligonucleótidos destritolados a través de Sephadex G-25 (cromatografía de exclusión por tamaños) y recogiendo muestras adecuadas a través de un
10 colector de fracciones Pharmacia. El disolvente se retiró de nuevo por evaporación en un speed vac. Después, los oligonucleótidos purificados se analizaron con respecto a la pureza por CGE, HPLC (caudal: 1,5 ml/min; columna Waters Delta Pak C4, 3,9 x 300mm) y EM. El rendimiento final se determinó mediante un espectrofotómetro a 260 nm.

Análisis de RMN ³¹P

15 El análisis de RMN ³¹P indicó el número correcto de enlaces P=O y P=S. Los desplazamientos químicos de P=S se dispersan sobre 2-3 ppm debido a la naturaleza diastereomérica de los enlaces P=S.

Las estructuras de los oligonucleótidos y sus características físicas se muestran a continuación en las Tablas I y II:

Tabla I

Oligonucleótidos que contienen enlaces PS/PO escalonados

Oligo N°	ISIS N°	Secuencia (5'-3') ¹	Esqueleto	Química	Diana
1	oligómero escalonado 18268	5'- T_sC^m_oT_sG_oA_sG_oT_sA_oG_sC^m_o A_sG_oA_sG_oG_sA_oG_sC^m_oT_sC-3'	P=S/P=O	2'-O-MOE	ICAM-1 Humana
2	gapmer escalonado 22592	5'- A_sT_oG_sC^m_oA_sT_oT_sC^m_sT_sG_sC^m_sC^m_sC^m_o C^m_sA_oA_sG_oG_sA-3'	P=S/P=O	2'-O-MOE y 2'-H	C-raf de ratón
3	hemimer escalonado 25303	5'-G _s C ^m _s C ^m _s C ^m _s A _s A _s G _s C ^m _s T _s G _s G _s C ^m _o A_sT_oC^m_sC^m_oG_sT_oC^m_sA-3'	P=S/P=O	2'-O-MOE y 2'-H	ICAM-1 Humana

¹Todos los nucleósidos en negrita son 2'-O-MOE (2'-O-CH₂-CH₂-O-CH₃)

5

Tabla II

Características físicas de oligonucleótidos que contienen enlaces PS/PO escalonados

ISIS N°	Secuencia (5'-3') ¹	Masa esperada (g)	Masa observada (g)	Tiempo de retención de HPLC (min) ²	N° DO purificados (a 260 nm)
18268	5'- T_sC^m_oT_sG_oA_sG_oT_sA_o G_sC^m_oA_sG_oA_sG_oG_sA_oG_sC^m_oT_sC-3'	7863	7865	21,00	1000
22592	5'- A_sT_oG_sC^m_oA_sT_o T _s C ^m _s T _s G _s C ^m _s C ^m _s C ^m _o C^m_sA_oA_sG_oG_sA-3'	7138	7123	22,00	136
25303	5'-G _s C ^m _s C ^m _s C ^m _s A _s A _s G _s C ^m _s T _s G _s G _s C ^m _o A_sT_oC^m_sC^m_oG_sT_oC^m_sA-3'	7008	7006	22,00	1250

¹Todos los nucleósidos en negrita son 2'-O-MOE²Condiciones: Waters 600E con detector 991; Columna Waters C4 (3,9x300 mm); Disolvente A: TEA-Ac 50 mM, pH 7,0; acetonitrilo al 100%; caudal 1,5 ml/min; gradiente: 5% de B durante los primeros cinco minutos con un aumento lineal en B al 60% durante los siguientes 55 minutos.

Ejemplo 2 - Análisis de Tm

En la Tabla III mostrada a continuación se presenta el análisis de Tm de oligómeros modificados de la serie ICAM-1:

Tabla III
Valores de Tm de oligonucleótido antisentido de ICAM-1 humana
ISIS 3067 y análogos contra diana de ARN

5'-TCT GAG TAG CAG AGG AGC TC-3'		
Oligonucleótido	Modificaciones	Tm
ISIS 3067	P=S, 2'-desoxi ADN	50,1
ISIS 11910	P=O, 2'-desoxi ADN	58,4
ISIS 11159	P=S, 2'-MOE	79,2
ISIS 11158	P=O, 2'-MOE	86,6
ISIS 18268	P=O/P=S, 2'-MOE ESCALONADO	84,0

Es significativo indicar por los datos anteriores que todos los oligómeros 2'-MOE tienen mayor afinidad de unión que los oligómeros 2'-H. Además, en la serie, ISIS 11159, 11158 y 18269 (el oligómero escalonado) tienen afinidad de unión entre los oligómeros P=O y P=S, pero la pérdida de Tm no es significativa (2,6°).

Ejemplo 3 - Expresión de ICAM-1*Tratamiento con Oligonucleótido de HUVEC*

Las células se lavaron tres veces con Opti-MEM (Life Technologies, Inc.) precalentado a 37°C. Los oligonucleótidos se premezclaron con 10 µg/ml de Lipofectin (Life Technologies, Inc.) en Opti-MEM, diluido en serie a las concentraciones deseadas, y se aplicaron a las células lavadas. También se trataron células de control basales y no tratadas (sin oligonucleótido) con Lipofectin. Las células se incubaron durante 4 h a 37°C, después de lo cual el medio se retiró y se reemplazó con medio de crecimiento convencional con o sin 5 mg/ml de TNF-α (R & D Systems). La incubación a 37°C se continuó hasta los tiempos indicados.

Cuantificación de la Expresión de Proteína ICAM-1 por Clasificador de Células activadas por Fluorescencia

Se retiraron células de superficies de placas por una breve tripsinización con tripsina al 0,25% en PBS. La actividad de la tripsina se inactivó con una solución de albúmina de suero bovino al 2% y azida sódica al 0,2% en PBS (+ Mg/Ca). Las células se sedimentaron por centrifugación (1000 rpm, centrifuga GPR de Beckman), se resuspendieron en PBS y se tiñeron con 3 µl/10⁵ células del anticuerpo específico de ICAM-1, CD54-PE (Pharmingen). Los anticuerpos se incubaron con las células durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad, con agitación suave. Las células se lavaron por procedimientos de centrifugación y después se resuspendieron en 0,3 ml de tampón FacsFlow (Becton Dickinson) con formaldehído al 0,5% (Polysciences). Después se determinó la expresión de ICAM-1 en la superficie celular por citometría de flujo usando un FACScan de Becton Dickinson. El porcentaje de la expresión de ICAM-1 de control se calculó como se indica a continuación: [(valor de ICAM-1 tratado con oligonucleótido)-(valor de ICAM-1 basal)/(valor de ICAM-1 no tratado) - (valor de ICAM-1 basal)]. (Baker, Brenda, y col. 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified Anti-intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) Oligonucleotides Selectively Increase the ICAM-1 mRNA Level and Inhibit Formation of the ICAM-1 Translation Initiation Complex in Human Umbilical Vein Endothelial Cells, The Journal of Biological Chemistry, 272, 11994-12000, 1997.)

Los oligonucleótidos usados en el estudio descrito anteriormente se muestran en la Tabla IV presentada a continuación. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Tabla IV**Control de Enlaces P=S: Actividad de ICAM-1 con Enlaces P=S//P=O Alternos en un Oligómero Modificado en Posición 2' Uniforme**

Isis N°	Oligonucleótidos Ensayados	MOE, P=O
16952	TCTGAGTAGCAGAGGAGCTC	MOE, P=O
16953	GATCGCGTCCGACTATGAAG	Control Desorganizado (Scrambled)^a
15537	TCTGAGTAGCAGAGGAGCTC	MOE, P=S
16954	GATCGCGTCCGACTATGAAG	Control Desorganizado
18268	TCTGAGTAGCAGAGGAGCTC *	MOE, P=S, P=O

C=5-metil-C en todas las secuencias (excepto C*)

^a la misma composición de bases

Los oligómeros desorganizados 16953 y 16954, que tienen la misma composición de bases que la secuencia parental, sirven como controles.

- 5 Puede verse que los datos de expresión de ICAM-1 (Figura 1) revelan que el oligómero 18268 escalonado es más eficaz que el oligómero P=O (16952) y el oligómero P=S (15537) en células HUVEC. Los oligómeros supuestamente funcionan por un mecanismo independiente de RNasa H de unión directa.

Ejemplo 4 - Estudios farmacocinéticos

Modulación de la unión a proteínas por oligonucleótido P=S/P=O

- 10 Se determinaron diversos parámetros farmacocinéticos de los oligonucleótidos 11158, 11159 y 18268 del Ejemplo 2. Los oligonucleótidos se estudiaron con respecto a diversos efectos que incluían la modulación de la unión a proteínas y la distribución tisular. Los estudios se realizaron en ratas Sprague-Dawley usando administración en embolada I.V. de oligonucleótidos radiomarcados con ³H. Los resultados se presentan en la Tabla V.

Tabla V

Parámetros Farmacocinéticos en Plasma Comparativos

Parámetro PK	ISIS 11159	ISIS 18268	ISIS 11158
Cl _p (ml/min)	2,17	6,86	9,62
T _{1/2} distrib. (min)	22	12	8
Kd* de albúmina (μM)	25	280	450
Porcentaje excretado en orina	5	13	48

- 15 El oligonucleótido MOE P=O modificado completamente, ISIS 11158, se une deficientemente a la proteína albúmina de suero y se distribuye principalmente en el riñón y se excreta en orina rápidamente. El oligonucleótido P=O/P=S alterno, ISIS 18268, tiene una mayor concentración en plasma que ISIS 11158 (MOE, P=O) pero menor que el oligonucleótido MOE P=S, ISIS-11159, como se ve en la Figura 2. Esto también se compara bien con los datos de unión a albúmina de suero observados en la Tabla V.

- 20 El oligonucleótido MOE P=S/P=O modificado completamente alterno, ISIS 18268, se unía a HSA con una afinidad comprendida entre la de P=S completo y P=O completo. Esto se midió por técnicas de ultrafiltración usando albúmina sin ácidos grasos.

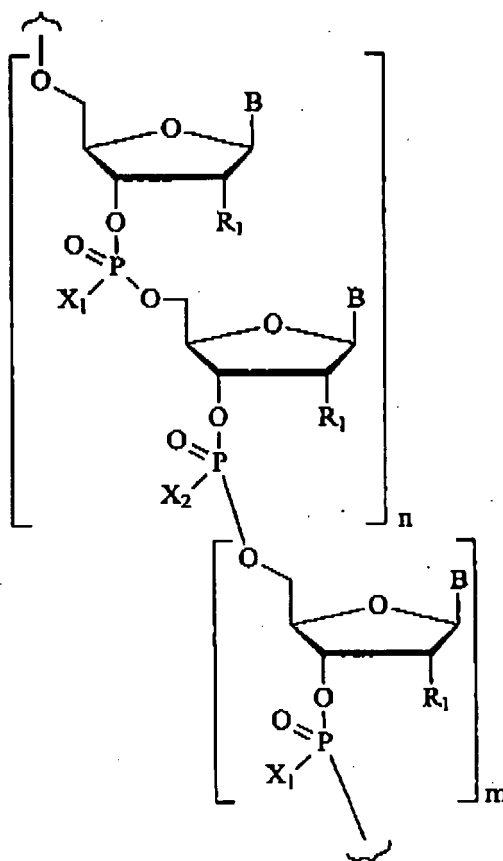
Cambios en la Distribución Tisular:

- 25 La distribución tisular de los oligonucleótidos radiomarcados se examinó en ratas Sprague-Dawley después de la administración I.V. en embolada. Los resultados se muestran en la Figura 3.

- 30 En estos estudios farmacocinéticos *in vivo*, el oligonucleótido alterno P=S/P=O, ISIS 18268, presenta una menor distribución renal y mayor distribución tisular en general en comparación con el oligonucleótido P=O uniforme, ISIS 11158. Esto también dio como resultado una menor excreción en orina: un 13% excretado en 6 horas en comparación con un 48% en el mismo período de tiempo (6 horas) para el oligonucleótido P=O. El oligonucleótido P=S, ISIS 11159, mostró más compuesto en el hígado que los oligonucleótidos P=O y P=S/P=O.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos modificados en posición 2' unidos covalentemente que tienen la fórmula:



5 en la que :

cada B es una nucleobase;

uno de X₁ o X₂ es O y el otro de X₁ o X₂ es S;

10 cada R₁ es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₃-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, halógeno, tiol, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol o poliéter; o R₁ es un grupo de fórmula Z-R₂₂-(R₂₃)_v;

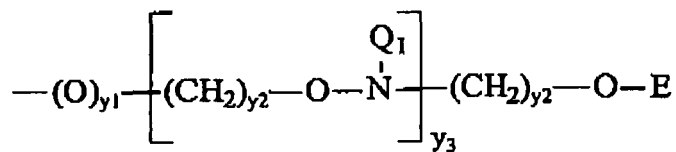
Z es O, S, NH o N-R₂₂-(R₂₃)_v;

15 R₂₂ es alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀ o alquinilo C₂-C₂₀;

20 R₂₃ es hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, tiol, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, 5-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol, poliéter;

v es de 0 a 10;

o R₁ tiene la fórmula:



en la que:

y₁ es 0 ó 1;

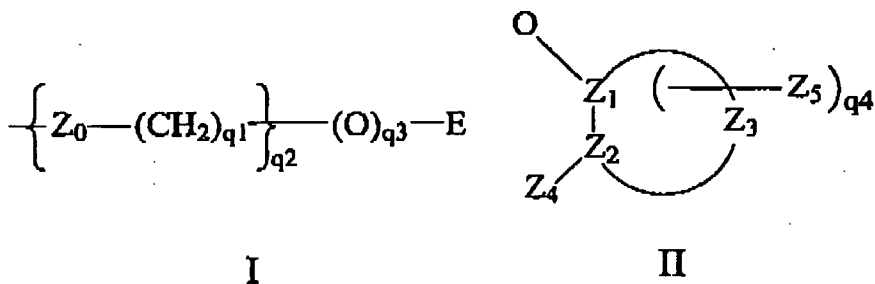
5 y₂ es independientemente de 0 a 10;

y₃ es de 1 a 10;

E es alquilo C₁-C₁₀, N(Q₁) (Q₂) o N=C(Q₁) (Q₂);

10 cada Q₁ y Q₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₀, alquilo sustituido, dialquilaminoalquilo, un grupo protector de nitrógeno, un grupo conjugado inmobilizado o no inmobilizado, un enlace para un soporte sólido; o Q₁ y Q₂, juntos, están unidos en un grupo protector de nitrógeno o una estructura de anillo que puede incluir al menos un heteroátomo adicional seleccionado entre N y O;

o R₁ tiene una de las fórmulas I o II:



en las que:

15 Z₀ es O, S o NH;

q¹ es de 0 a 10;

q² es de 0 a 10;

q³ es 0 ó 1;

q⁴ es 0, 1 ó 2;

20 Z₄ es OM₁, SM₁ o N(M₁)₂;

cada M₁ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₈, haloalquilo C₁-C₈, C(=NH)N(H)M₂, C(=O)N(H)M₂ u OC(=O)N(H)M₂;

M₂ es H o alquilo C₁-C₈;

25 Z₁, Z₂ y Z₃ comprenden un sistema de anillo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, o que tiene de 3 a 6 átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos, en el que dichos heteroátomos se seleccionan entre oxígeno, nitrógeno y azufre, y en el que dicho sistema de anillo es alifático, alifático insaturado, aromático o heterocíclico saturado o insaturado; y

Z₅ es alquilo o haloalquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alqueno que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, alquino que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, arilo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono, N(Q₁),

(Q₂), OQ₁, halo, SQ₁ o CN;

n es de 2 a 50;

m es 0 ó 1; y

5 en la que al menos uno de R₁ es un grupo seleccionado entre 2'-metoxietoxi, 2'-dimetilaminooxietoxi, 2'-metoxi, 2'-aminopropoxi, flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilalcoxi, O-alquilamino protegido, O-alquilaminoalquilo, O- alquilimidazol, poliéter de la fórmula (O-alquil)_m, en la que m es de 1 a 10 y 2'-SR o 2'-NR₂, en los que cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno, un grupo protector y alquilo, alquenilo o alquinilo sustituido o sin sustituir.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₁ es -O-CH₂-CH₂-O-CH₃.

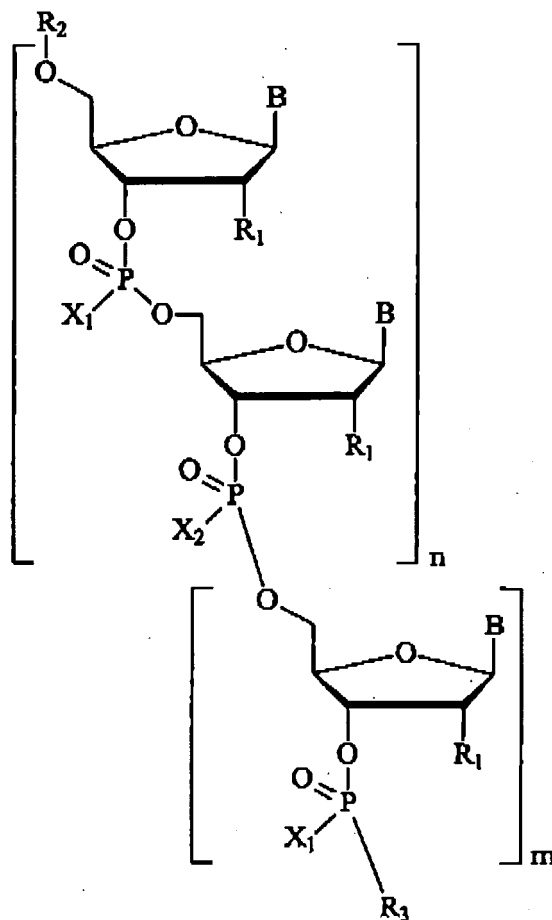
10 3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que n es de 5 a 50.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que n es de 8 a 30.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que n es de 4 a 15.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que n es de 2 a 10.

7. Un oligonucleótido que tiene la formula:



15

en la que:

cada B es una nucleobase;

X₁ es S;

X₂ es O;

5 cada R₁ es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₃-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, halógeno, tiol, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol o poliéter;

o R₁ es un grupo de fórmula Z-R₂₂-(R₂₃)_v;

Z es G, S, NH o N-R₂₂-(R₂₃)_v;

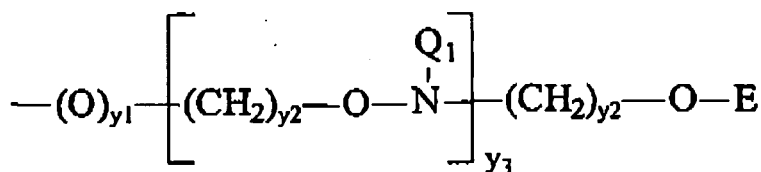
10 R₂₂ es alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀ o alquinilo C₂-C₂₀;

R₂₃ es hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, tiol, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol, poliéter;

15

v es de 0 a 10;

o R₁ tiene la fórmula:



en la que:

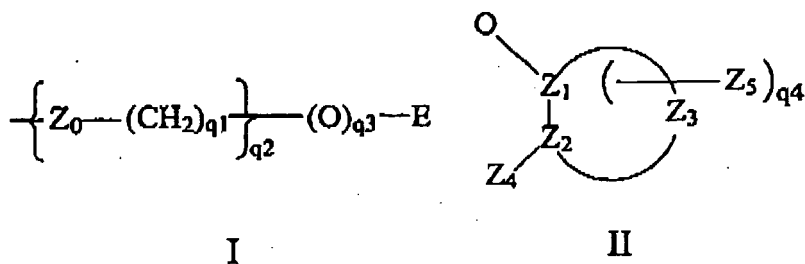
20 y₁ es 0 ó 1;

y₂ es independientemente de 0 a 10;

y₃ es de 1 a 10;

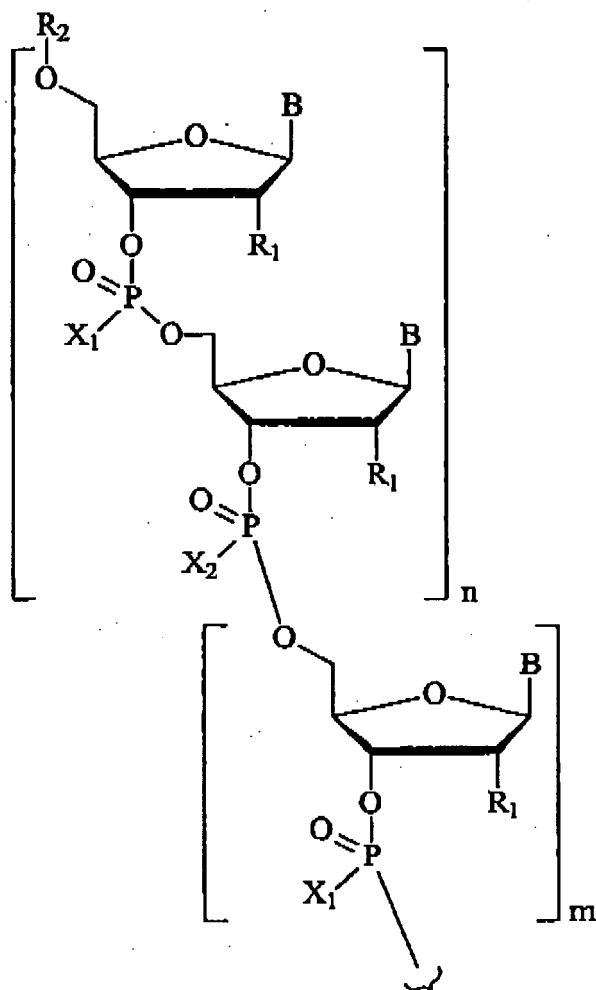
25 E es alquilo C₁-C₁₀, N(Q₁)(Q₂) o N=C(Q₁)(Q₂); cada Q₁ y Q₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₀, alquilo sustituido, dialquilaminoalquilo, un grupo protector de nitrógeno, un grupo conjugado inmovilizado o no inmovilizado, un enlace para un soporte sólido; o Q₁ y Q₂, juntos, están unidos en un grupo protector de nitrógeno o una estructura de anillo que puede incluir al menos un heteroátomo adicional seleccionado entre N y O;

o R₁ tiene una de las fórmulas I o II:



30 en las que:

- Z_0 es O, S o NH;
 q^1 es de 0 a 10;
 q^2 es de 0 a 10;
 q^3 es 0 ó 1;
5 q^4 es, 0, 1 ó 2;
 Z_4 es OM_1 , SM_1 , o $N(M_1)_2$;
cada M_1 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_8 , haloalquilo C_1-C_8 , $C(=NH)N(H)M_2$, $C(=O)N(H)M_2$ u $OC(=O)N(H)M_2$;
 M_2 es H o alquilo C_1-C_8 ;
- 10 Z_1 , Z_2 y Z_3 comprenden un sistema de anillo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, o que tiene de 3 a 6 átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos, en el que dichos heteroátomos se seleccionan entre oxígeno, nitrógeno y azufre, y en el que dicho sistema de anillo es alifático, alifático insaturado, aromático o heterocíclico saturado o insaturado; y
- 15 Z_5 es alquilo o haloalquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, alquinilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, arilo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono, $N(Q_1)(Q_2)$, OQ_1 , halo, SQ_1 o CN;
- n es de 2 a 50; y
 m es 0 ó 1;
 R_2 es H, un grupo protector de hidroxilo o un oligonucleótido; y
- 20 R_3 es OH, un oligonucleótido o un engarce conectado a un soporte sólido;
y en la que al menos uno de R_1 es un grupo seleccionado entre 2'-metoxietoxi, 2'-dimetilaminooxietoxi, 2'-metoxi, 2'-aminopropoxi, flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilalcoxi, O-alquilamino protegido, O-alquilaminoalquilo, O-alquilimidazol, poliéter de la fórmula $(O\text{-alquil})_m$, en la que m es de 1 a 10, y 2'-SR o 2'-NR₂ en los que cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno, un grupo protector y alquilo, alquenilo o alquinilo sustituido o sin sustituir.
- 25 8. El compuesto de la reivindicación 7, en el que R_1 es $-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$.
9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que R_2 es H y R_3 es OH.
10. El compuesto de la reivindicación 8, en el que R_2 es un oligonucleótico unido a fosfodiéster o un oligonucleótico unido a fosforotioato.
- 30 11. El compuesto de la reivindicación 8, en el que R_3 es un oligonucleótico unido a fosfodiéster o un oligonucleótico unido a fosforotioato.
12. El compuesto de la reivindicación 8, en el que cada uno de R_2 y R_3 es un oligonucleótico unido a fosfodiéster o un oligonucleótico unido a fosforotioato.
13. Un compuesto que tiene la fórmula:
- 35 (5') $W^1-W^2-W^3$ (3')
- en la que:
 W^1 tiene la fórmula:



en la que:

cada B es a nucleobase;

uno de X_1 o X_2 es O y el otro de X_1 o X_2 es S;

5 cada R_1 , es, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C_1-C_{20} , alqueno C_3-C_{20} , alquino C_2-C_{20} , halógeno, tior, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol o poliéter;

10 o R_1 es un grupo de fórmula $Z-R_{22}-(R_{23})_v$;

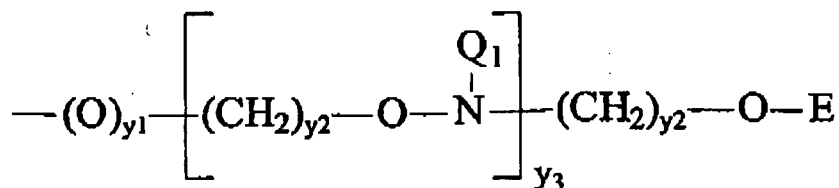
Z es O, S, NH o $N-R_{22}-(R_{23})_v$;

R_{22} es alquilo C_1-C_{20} , alqueno C_2-C_{20} o alquino C_2-C_{20} ;

15 R_{23} es hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, tior, ceto, carboxilo, nitro, nitroso, nitrilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo, N-dialquilo, O-arilo, S-arilo, NH-arilo, O-aralquilo, S-aralquilo, NH-aralquilo, amino, N-ftalimido, imidazol, azido, hidrazino, hidroxilamino, isocianato, sulfóxido, sulfona, sulfuro, disulfuro, sililo, arilo, heterociclo, carbociclo, intercalante, molécula informadora, conjugado, poliamina, poliamida, polialquilenglicol, poliéter;

v es de 0 a 10;

o R₁ tiene la fórmula:



en la que:

y₁ es 0 ó 1;

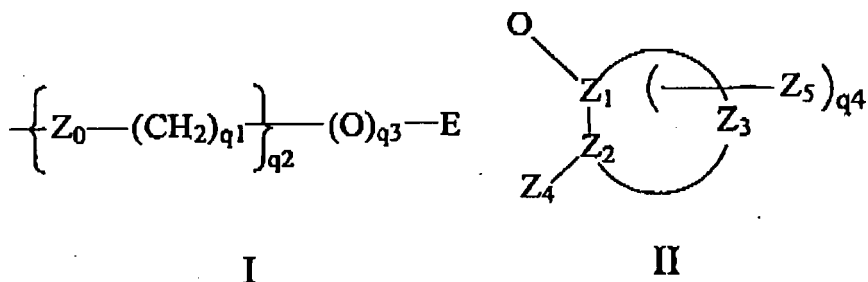
5 y₂ es independientemente de 0 a 10;

y₃ es de 1 a 10;

E es alquilo C₁-C₁₀, N(Q₁)(Q₂) o N=C(Q₁)(Q₂);

10 cada Q₁ y Q₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₀, alquilo sustituido, dialquilaminoalquilo, un grupo protector de nitrógeno, un grupo conjugado inmovilizado o no inmovilizado, un enlace para un soporte sólido; o Q₁ y Q₂, juntos, están unidos en un grupo protector de nitrógeno o una estructura de anillo que puede incluir al menos un heteroátomo adicional seleccionado entre N y O;

o R₁ tiene una de las fórmulas I o II:



en las que:

15 Z₀ es O, S o NH;

q¹ es de 0 a 10;

q² es de 0 a 10;

q³ es 0 ó 1;

q⁴ es 0, 1 ó 2;

20 Z₄ es OM₁, SM₁ o N(M₁)₂;

cada M₁ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₈, haloalquilo C₁-C₈, C(=NH)N(H)M₂, C(=O)N(H)M₂ u OC(=O)N(H)M₂;

M₂ es H o alquilo C₁-C₈;

25 Z₁, Z₂ y Z₃ comprenden un sistema de anillo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono o que tiene de 3 a 6 átomos de carbono y 1 ó 2 heteroátomos, en el que dichos heteroátomos se seleccionan entre oxígeno, nitrógeno y azufre, y en el que dicho sistema de anillo es alifático, alifático insaturado, aromático o heterocíclico insaturado o saturado; y

Z₅ es alquilo o haloalquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alqueno que tiene de 2 a 10 átomos de

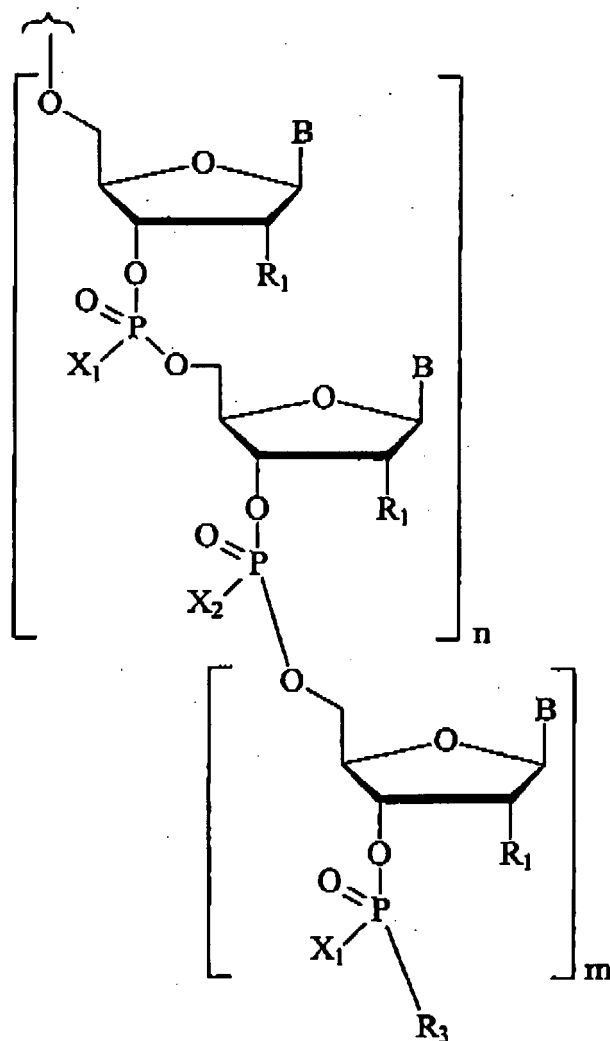
carbono, alquínilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, arilo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono, N(Q₁) (Q₂), OQ₁, halo, SQ₁ o CN;

n es de 2 a 50; y

m es 0 ó 1;

5 R₂ es H, un grupo protector de hidroxilo o un oligonucleótido;

W³ tiene la fórmula:



en la que R₃ es OH, un oligonucleótido o un engarce conectado a un soporte sólido; y

10 W² es una pluralidad de nucleósidos unidos covalentemente ligados por enlaces fosfodiéster o fosforotioato; y en la que al menos uno de R₁ es un grupo seleccionado entre 2'-metoxietoxi, 2'-dimetilaminooxietoxi, 2'-metoxi, 2'-aminopropoxi, flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilalcoxi, O-alquilamino protegido, O-alquilaminoalquilo, O-alquilimidazol, poliéter de la fórmula (O-alquil)_m en la que m es de 1 a 10, y 2'-SR o 2'-NR₂, en los que cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno, un grupo protector y alquilo, alquénilo o alquínilo sustituido o sin sustituir.

15 14. El compuesto de la reivindicación 13, en el que R₁ es -O-CH₂-CH₂-O-CH₃.

15. El compuesto de la reivindicación 14, en el que R₂ es H y R₃ es OH.

16. El compuesto de la reivindicación 14, en el que n es de 5 a 50.

17. El compuesto de la reivindicación 14, en el que n es de 8 a 30.
18. El compuesto de la reivindicación 14, en el que n es de 4 a 15.
19. El compuesto de la reivindicación 14, en el que n es de 2 a 10.
20. El compuesto de la reivindicación 14, en el que W^2 es una pluralidad de nucleósidos unidos covalentemente, unidos por enlaces fosfodiéster.
- 5
21. El compuesto de la reivindicación 14, en el que W^2 es una pluralidad de nucleósidos unidos covalentemente, unidos por enlaces fosforotioato.
22. Una composición que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo aceptable.
23. Una composición que comprende un compuesto de la reivindicación 7 y un vehículo aceptable.
- 10
24. Una composición que comprende un compuesto de la reivindicación 12 y un vehículo aceptable.
25. Un compuesto de acuerdo las reivindicaciones 1, 7 ó 13 para su uso en medicina.
26. Un procedimiento de ensayo de un ácido nucleico, que comprende poner en contacto una solución que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico con un compuesto de la reivindicación 1.
- 15
27. Un procedimiento de ensayo de un ácido nucleico, que comprende poner en contacto una solución que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico con un compuesto de la reivindicación 7.
28. Un procedimiento de ensayo de un ácido nucleico, que comprende poner en contacto una suspensión que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico con un compuesto de la reivindicación 13.

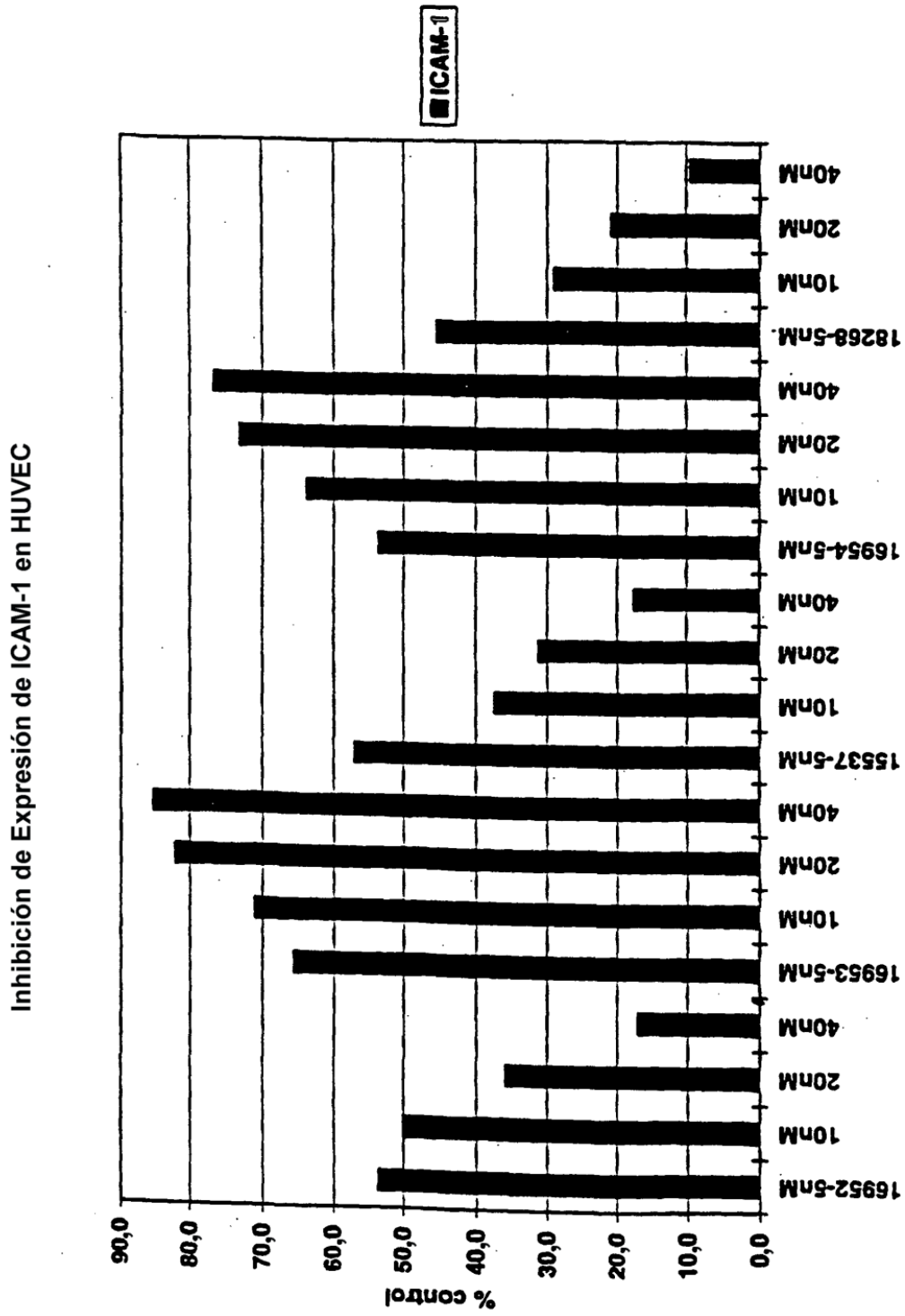


FIGURA 1

Figura 2

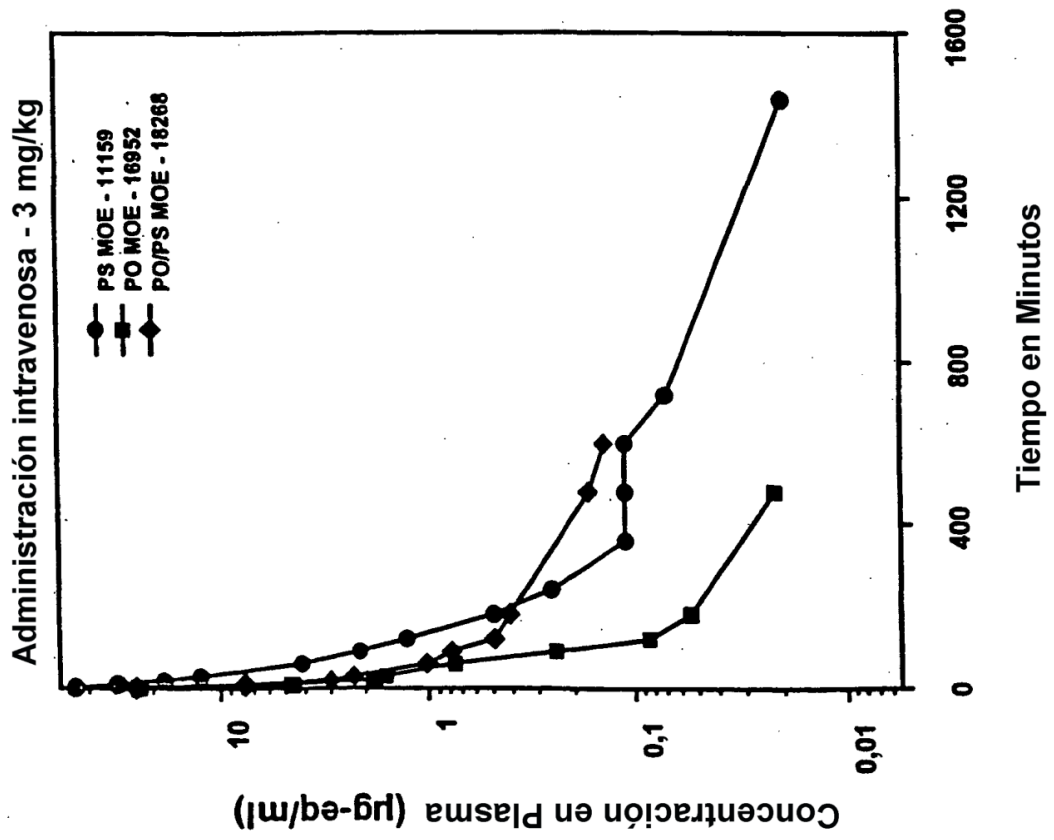


Figura 3
Contenido de Radioactividad Total Después de la
Administración IV en Embolada: 3 mg/kg

