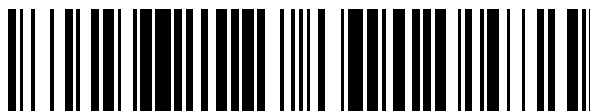


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 631**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05754332 .4**  
96 Fecha de presentación: **24.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1765414**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **COMPUESTO OLIGÓMERO ANTISENTIDO SUSTITUIDO CON INOSINA, CONJUGADO CON UN PÉPTIDO, Y MÉTODO DE PREPARACIÓN.**

30 Prioridad:  
**24.05.2004 US 574048 P**  
**23.05.2005 US 136245**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.03.2012**

73 Titular/es:  
**AVI BIOPHARMA, INC.**  
**SUITE 200, 4575 S.W. RESEARCH WAY**  
**CORVALLIS, OR 97333, US**

72 Inventor/es:  
**IVERSEN, Patrick, L.;**  
**WELLER, Dwight, D. y**  
**HASSINGER, Jed, N.**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 375 631 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

Compuesto oligómero antisentido sustituido con inosina, conjugado con un péptido, y método de preparación.

5 Este invento se refiere a un compuesto oligómero antisentido (i) conjugado con un péptido rico en arginina y eficaz para potenciar la incorporación del oligómero a células, y (ii) en el que cadenas de bases de G están interrumpidas por una o más bases de inosina, y a métodos para usar dicho compuesto.

10 Los oligómeros antisentido ofrecen un gran potencial como compuestos farmacéuticos, como viene evidenciado por el número de fármacos antisentido actualmente en desarrollo clínico y facilitado por el hecho de que a lo largo de los últimos años se han abordado exitosamente diversas limitaciones potenciales de los oligómeros antisentido (Devi, Stein). Se han desarrollado nuevas cadenas principales no cargadas de oligómeros para mejorar la incorporación a células y para aumentar la resistencia a la degradación por nucleasas (Hudziak, Iversen, Summerton). Se ha hallado que para ciertas estructuras de oligómeros, por ejemplo, las estructuras basadas en morfolino, la cadena principal modificada proporciona una afinidad de unión potenciada a su ácido nucleico diana (Iversen, Summerton).

15 Más recientemente, se ha descubierto que una diversidad de péptidos ricos en arginina pueden aumentar drásticamente el nivel de incorporación de oligonucleótidos no cargados a células, incluyendo células de mamífero (véanse, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. SN 60/466.703 de propiedad conjunta, presentada el 29 de abril de 2003, y la correspondiente solicitud de patente de EE.UU. para "Compositions for Enhancing Transport of Molecules into Cells", presentada el 29 de abril de 2004). Este descubrimiento tiene el potencial para aumentar significativamente el potencial terapéutico de una diversidad de oligómeros antisentido, incluyendo los destinados a bloquear la expresión de proteínas seleccionadas, los centrados en bloquear ciertos sitios de corte y empalme dadores o aceptores en mRNA preprocesado, y los diseñados para tratar una infección vírica al bloquear la expresión de genes víricos o la replicación de genomas víricos de cadena sencilla.

20 En ciertas aplicaciones antisentido, la secuencia diana óptima contra la cual se dirige el oligómero antisentido puede incluir una serie de cuatro o más bases de citosina, en cuyo caso el oligómero contendrá la correspondiente cadena de cuatro o más bases de guanina complementarias. Como un ejemplo importante, una secuencia diana óptima para la proteína c-myc es una región que contiene el sitio de inicio AUG del RNA de c-myc que incluye una serie de cuatro bases de citosina. Los oligómeros antisentido dirigidos contra la región codónica de inicio de c-myc tienen diversas aplicaciones terapéuticas importantes, incluyendo el tratamiento del cáncer, la enfermedad del riñón poliquístico (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 6.875.747 de propiedad conjunta) y la reestenosis de vasos coronarios (véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT WO 00/44897 de propiedad conjunta, publicada el 08/03/2000), y la terapia del cáncer (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. US-2003-0087861-A1 de propiedad conjunta, publicada el 05/08/2003).

30 H. M. Moulton et al., *Bioconjugate Chemistry*, ACS, Washington, DC, EE.UU., volumen 15, n° 2 (2004), páginas 290-299, describen un método de distribución celular para oligonucleótidos antisentido al conjugar péptidos ricos en arginina con oligómeros de morfolino. Sorprendentemente, se ha hallado ahora que la conjugación de un péptido rico en arginina con compuestos antisentido que tienen series de cuatro o más bases de citosina, en un esfuerzo para potenciar la incorporación celular del oligómero, compromete gravemente la actividad antisentido del compuesto así como la capacidad para purificar el compuesto. Aunque no se entiende la base de este problema, parece que está implicada una interacción entre el péptido positivamente cargado y el compuesto oligómero de un modo que activa la formación de cuádruplos de G en el oligómero, reduciéndose de este modo la solubilidad y/o la capacidad del compuesto para unirse a su ácido nucleico diana. Por lo tanto, sería útil potenciar la incorporación celular de dichos compuestos oligómeros antisentido, al conjugar el compuesto con un péptido rico en arginina, sin degradar la actividad antisentido del compuesto con respecto a su diana intracelular.

40 En particular, sería útil potenciar la incorporación celular del anterior compuesto antisentido de c-myc sin pérdida de actividad antisentido, con el fin de potenciar la actividad terapéutica del compuesto en el tratamiento del cáncer, la enfermedad del riñón poliquístico o la reestenosis de vasos coronarios.

45 El presente invento proporciona un método para la preparación de un compuesto análogo oligonucleotídico sustancialmente no cargado, método que comprende formar un producto de conjugación del compuesto con un péptido rico en arginina y eficaz para potenciar la incorporación del compuesto a células diana, en que el compuesto incluye una cadena de bases que son complementarias de cuatro o más bases de citosina contiguas de una región de ácido nucleico diana, y en que al menos una base de guanina está sustituida por una base de inosina en dicha cadena de bases con objeto de limitar a tres o menos el número de bases de guanina contiguas en dicha cadena.

50 La sustitución da lugar a una mejora que puede ser eficaz para potenciar la solubilidad del producto de conjugación en agua durante una operación de purificación que implica que el producto de conjugación se una a, y se libere de, una resina de intercambio catiónico, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina. Cuando la región de ácido nucleico diana incluye el codón de inicio en un mRNA, la mejora puede ser eficaz para potenciar la capacidad del producto de conjugación para bloquear la traducción de la proteína codificada

por el mRNA, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina. Cuando la región de ácido nucleico diana incluye un sitio de corte y empalme dador o aceptor en un mRNA preprocesado, la mejora puede ser eficaz para potenciar la capacidad del producto de conjugación para enmascarar el corte y empalme de mRNA en la región diana, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina.

Cuando la región de ácido nucleico diana incluye un elemento víricamente codificado de acción en cis implicado en la replicación vírica, la mejora puede ser eficaz para potenciar la capacidad del producto de conjugación para bloquear la replicación vírica, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina.

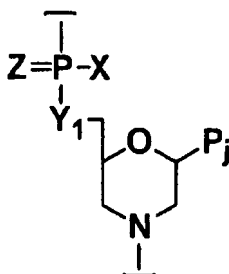
En una realización ejemplar, el péptido rico en arginina comprende de 8 a 16 subunidades seleccionadas entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, incluyendo al menos seis subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en que > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y en que

(a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un compuesto análogo a arginina, siendo dicho compuesto análogo un  $\alpha$ -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura  $R^1N=C(NH_2)R^2$  en que  $R^1$  es H o R, y  $R^2$  es R,  $NH_2$ ,  $NHR$  o  $NR_2$ , en que R es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno;  $R^1$  y  $R^2$  pueden formar conjuntamente un anillo; y la cadena lateral está unida a dicho aminoácido a través de  $R^1$  o  $R^2$ ;

(b) cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro  $-C(O)-(CHR)_n-NH-$ , en que (i) n es de 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo, o (ii) n es 1 y R es una cadena lateral neutra seleccionada entre alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en que dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada entre alquilo, alqueno y alquino sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada cuatro átomos de carbono; y

(c) cada subunidad Z representa independientemente un aminoácido seleccionado entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicocola, histidina, lisina, metionina, serina y treonina.

También en una realización ejemplar, el compuesto oligonucleotídico es un oligómero de morfolino compuesto de subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo entre el nitrógeno del morfolino de una subunidad y un carbono exocíclico en la posición 3 del morfolino de una subunidad adyacente. Las subunidades de morfolino se pueden unir por enlaces fosforodiamidato no cargados, de acuerdo con la estructura:



en que  $Y_1 = O$ ,  $Z = O$ ,  $P_j$  es un componente para apareamiento de bases de purina o pirimidina eficaz para unirse, mediante un enlace de hidrógeno específico de bases, con una base de un polinucleótido, y X es alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo o alquilamino.

En otro aspecto, el invento incluye un producto de conjugación terapéutico de oligómero-péptido, compuesto de (a) un compuesto análogo oligonucleotídico sustancialmente no cargado que tiene una secuencia de bases que incluye una cadena de bases que son complementarias de cuatro o más bases de citosina contiguas de una región de ácido nucleico diana a la cual se pretende unir el compuesto, y (b) conjugado con el compuesto, un péptido rico en arginina eficaz para potenciar la incorporación del compuesto a células diana. La cadena de bases del compuesto incluye al menos una base de inosina, dispuesta en la cadena con objeto de limitar a tres o menos, preferiblemente dos o menos, el número de bases de guanina contiguas en dicha cadena. Las realizaciones ejemplares del producto de conjugación son como se describieron anteriormente.

En particular, para uso en el bloqueo de la traducción de una proteína c-myc, al unirse a una región que incluye el sitio de inicio AUG de mRNA de c-myc humano, la secuencia para transporte dirigido del compuesto puede incluir una de las secuencias identificadas como ID. SEC. números 2-10. El péptido rico en arginina conjugado con el compuesto puede incluir la secuencia identificada como ID. SEC. números 16, 17 ó 18.

También se describe un método para tratar a un sujeto que tiene un estado patológico sensible a la inhibición de la expresión de c-myc en células diana del sujeto. Para llevar el método a la práctica, se puede administrar al sujeto un producto de conjugación del tipo recién descrito en una cantidad terapéuticamente eficaz. El producto de conju-

ción presenta mayor incorporación celular que el compuesto antisentido solo, en ausencia del péptido rico en arginina, y es más activo en el bloqueo de la traducción de c-myc que el mismo producto de conjugación en ausencia de la una o más bases de inosina. Las realizaciones ejemplares del producto de conjugación utilizado en el método son como se describieron anteriormente.

5 Para uso en el tratamiento del cáncer de vejiga, el producto de conjugación se puede administrar mediante distribución transuretral, y el método puede incluir además la administración de un compuesto anticanceroso de cisplatino al paciente.

10 Para uso en la reducción del riesgo de reestenosis de arterias coronarias en el sitio de un daño vascular después de un procedimiento angioplástico, el producto de conjugación se puede distribuir mediante distribución intravascular, por ejemplo, por medio de una cánula intraluminal ("stent") para liberación de fármacos o por medio de una inyección intravenosa de microburbujas que portan el fármaco.

15 Para uso en la protección de una vena safena colocada durante una operación de baipás coronario, el producto de conjugación se puede administrar al exponer la vena al producto de conjugación antes de su colocación quirúrgica.

20 Para uso en el tratamiento de la enfermedad del riñón poliúístico, el producto de conjugación se puede administrar al sujeto mediante administración oral o parenteral.

Estos y otros objetos y características del invento se harán más totalmente evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada del invento junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de las figuras

25 Las Figuras 1A-1D muestran diversas subunidades de tipo morfolino preferidas que tienen grupos enlazantes de cinco átomos (A), seis átomos (B) y siete átomos (C-D), adecuados para formar polímeros;

30 Las Figuras 2A-D muestran el segmento subunitario repetitivo de oligonucleótidos de morfolino ejemplares, construido utilizando, respectivamente, las subunidades A-D de la Figura 1;

Las Figuras 3A-G muestran estructuras de cadenas laterales de X ejemplares, para uso en diversas realizaciones de los péptidos ricos en arginina empleados en el invento;

35 Las Figuras 4A-D muestran productos de conjugación de oligómero-péptido y métodos para su preparación, en que la Figura 4C muestra la preparación de un producto de conjugación escindible *in vivo* y la Figura 4D muestra la preparación de un producto de conjugación con un conector de ácido 6-aminohexanoico/beta-alanina;

40 La Figura 5 es una representación esquemática de pares de bases de cuádruplos de G, en que PMO representa el resto de morfolina intermolecular o intramolecular de la cadena principal del oligómero;

La Figura 6 muestra gráficamente los resultados de la inhibición de la traducción de lisados de reticulocitos de conejo exenta de células, usando diversos oligómeros de c-myc no conjugados sustituidos con inosina y no sustituidos; y

45 La Figura 7 representa la inhibición de la traducción exenta de células utilizando PMOs de c-myc conjugados con péptidos ricos en arginina, con o sin sustituciones con inosina.

Descripción detallada del invento

50 I. Definiciones

"Alquilo" se refiere a un radical monovalente totalmente saturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser ramificado, lineal o cíclico (cicloalquilo). Metilo, etilo, n-butilo, t-butilo, n-heptilo, isopropilo, ciclopropilo, ciclopentilo, etilciclopentilo y ciclohexilo son ejemplos de grupos alquilo. Generalmente, se prefieren los grupos alquilo que tienen de uno a seis átomos de carbono, a los que se hace referencia como "alquilo inferior" y se ejemplifican mediante metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, isoamilo, n-pentilo e isopentilo. En una realización, alquilo inferior se refiere a alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>.

60 "Alquenilo" se refiere a un radical monovalente insaturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser ramificado, lineal o cíclico. El grupo alquenilo puede ser monoinsaturado o poliinsaturado. Generalmente, se prefieren los grupos alquenilo que tienen de uno a seis átomos de carbono, a los que se hace referencia como "alquenilo inferior".

65 "Ariilo" se refiere a un radical aromático monovalente sustituido o no sustituido, que tiene generalmente un único anillo (por ejemplo, benceno) o dos anillos condensados (por ejemplo, naftilo). Este término incluye grupos heteroarílicos, que son grupos anulares aromáticos que tienen uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo,

- tales como furilo, pirrol, piridilo e indol. Por "sustituido" se quiere significar que uno o más hidrógenos anulares del grupo arilo están sustituidos por un haluro tal como flúor, cloro o bromo; por un grupo alquilo inferior que contiene uno o dos átomos de carbono; nitro, amino, metilamino, dimetilamino, metoxilo, halometoxilo, halometilo o haloetilo. Los sustituyentes preferidos incluyen halógeno, metilo, etilo y metoxilo. Generalmente, se prefieren los grupos arilo que tienen un solo anillo.
- "Aralquilo" se refiere a un sustituyente alquilo, preferiblemente alquilo inferior ( $C_1$ - $C_4$ , más preferiblemente  $C_1$ - $C_2$ ), que está además sustituido con un grupo arilo; el bencilo ( $-CH_2C_6H_5$ ) y el fenetilo ( $-CH_2CH_2C_6H_5$ ) son ejemplos.
- Un "heterociclo" se refiere a un anillo no aromático, preferiblemente un anillo de 5 a 7 miembros, cuyos átomos anulares son seleccionados del grupo que consiste en carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Preferiblemente, los átomos anulares incluyen de 3 a 6 átomos de carbono. Dichos heterociclos incluyen, por ejemplo, pirrolidina, piperidina, piperazina y morfolina.
- El término "sustituido", con respecto a un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo, aralquilo o alcarilo, se refiere a la sustitución de un átomo de hidrógeno por un sustituyente que contiene heteroátomo, tal como, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, tiol, alquiltio, amino, alquilamino, imino, oxo (ceto), nitro, ciano, o diversos ácidos o ésteres tales como carboxílicos, sulfónicos o fosfónicos.
- Un "compuesto oligómero antisentido" o "compuesto análogo oligómero antisentido" o "compuesto antisentido" o "compuesto análogo oligómero" se refiere a un compuesto análogo de ácido nucleico sustancialmente no cargado, que tiene típicamente una longitud de entre 8 y 40 bases y que tiene una secuencia de bases que es complementaria o sustancialmente complementaria de la de un ácido nucleico diana de cadena sencilla, por ejemplo, un transcrito de mRNA procesado o preprocesado, o un RNA o DNA genómico vírico de cadena sencilla. El compuesto puede estar en una forma conjugada o no conjugada, tal como, por ejemplo, conjugado con un péptido rico en arginina.
- Un "oligómero de morfolino" es un compuesto análogo oligonucleotídico compuesto de estructuras subunitarias de morfolino de la forma mostrada en la Figura 1, en que (i) las estructuras están unidas entre sí por enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, preferiblemente dos átomos de longitud, y preferiblemente no cargados, que unen el nitrógeno del morfolino de una subunidad con el carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente, y (ii)  $P_i$  y  $P_j$  son componentes para apareamiento de bases de purina o pirimidina eficaces para unirse, mediante un enlace de hidrógeno específico de bases, con una base de un polinucleótido. El componente para apareamiento de bases de purina o pirimidina es típicamente adenina, citosina, guanina, uracilo o timina. En las Patentes de EE.UU. números 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063 y 5.506.337, todas las cuales se incorporan aquí por referencia, se detallan la síntesis, las estructuras y las características ligantes de oligómeros de morfolino.
- La subunidad mostrada en la Figura 1b, que tiene un enlace de dos átomos, se utiliza para las cadenas principales con unidades repetitivas de 6 átomos, como se muestra en la Figura 2B. En estas estructuras, el átomo  $Y_1$  que une el carbono de morfolino 5' con el grupo de fósforo puede ser azufre, nitrógeno, carbono o, preferiblemente, oxígeno. El componente X que cuelga del fósforo es cualquier grupo estable que no interfiere en el enlace de hidrógeno específico de bases. Los grupos preferidos incluyen alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo y alquilamino, incluyendo aminas cíclicas, todos los cuales pueden estar diversamente sustituidos con tal de que no se altere el enlace específico de bases. Los alquilo, alcoxilo y tioalcoxilo incluyen preferiblemente 1-6 átomos de carbono. Preferiblemente, alquilamino se refiere a una sustitución de alquilo inferior ( $C_1$  a  $C_6$ ), y las aminas cíclicas son preferiblemente heterociclos nitrogenados de 5 a 7 miembros que contienen opcionalmente 1-2 heteroátomos adicionales seleccionados entre oxígeno, nitrógeno y azufre. Z es azufre u oxígeno y es preferiblemente oxígeno.
- Un oligómero de morfolino preferido es un oligómero de morfolino unido por fosforodiamidato, al que aquí se hace referencia como PMO (del inglés, phosphorodiamidate-linked morpholino oligomer). Dichos oligómeros están compuestos por estructuras subunitarias de morfolino de la forma mostrada en la Figura 2B, en que las estructuras están unidas entre sí por enlaces fosforodiamidato, en que  $X = NH_2$ ,  $NHR$  o  $NR_2$  (en que R es alquilo inferior, preferiblemente metilo),  $Y = O$ , y  $Z = O$ , uniéndose el nitrógeno del morfolino de una subunidad con el carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente,  $P_i$  y  $P_j$  son componentes para apareamiento de bases de purina o pirimidina eficaces para unirse, mediante un enlace de hidrógeno específico de bases, con una base de un polinucleótido. También se prefieren las estructuras que tienen un enlace fosforodiamidato alternativo, en que, en la Figura 2B,  $X =$  alcoxilo inferior, tal como metoxilo o etoxilo,  $Y = NH$  o  $NR$ , en que R es alquilo inferior, y  $Z = O$ .
- Las propiedades químicas deseables de los oligómeros basados en morfolino incluyen la capacidad para hibridarse selectivamente con un ácido nucleico diana de bases complementarias, incluyendo RNA diana, con elevada  $T_m$ , incluso con oligómeros tan cortos como los de 8-14 bases, la capacidad para ser activamente transportados a células de mamífero, y la capacidad de un heterodúplex de oligómero:RNA para resistir la degradación por RNasas.
- Un oligómero de morfolino "sustancialmente no cargado" incluye a lo sumo un enlace intersubunitario cargado por cada cuatro, preferiblemente por cada diez, y más preferiblemente por cada veinte, enlaces intersubunitarios no

cargados. Los enlaces cargados son preferiblemente enlaces de fosforamidato (o tiosforamidato) cargados, tal como, por ejemplo, un enlace como el mostrado en la Figura 2B en que X es O o S. Preferiblemente, los oligómeros de morfolino están totalmente sin cargar.

5 Una "subunidad de aminoácido" es preferiblemente un resto de  $\forall$ -aminoácido (es decir, -CO-CHR-NH-); también puede ser un resto de  $\exists$ -aminoácido u otro aminoácido (por ejemplo, -CO-CH<sub>2</sub>CHR-NH-), en que R es una cadena lateral.

10 Un "cuádruplo de G" consiste en tetrámeros planos y apilados de guanina enlazados por hidrógeno que pueden causar que ácidos nucleicos ricos en guanina adopten estructuras cuádruples intermoleculares e intramoleculares que son estabilizadas por la presencia de los cuádruplos de G.

15 La expresión "aminoácidos artificiales" se refiere a aquellos aminoácidos no presentes en proteínas halladas en la naturaleza, tales como la beta-alanina ( $\exists$ -Ala) y el ácido 6-aminohexanoico (Ahx).

## II. Productos de conjugación de compuesto-transportador

20 El presente invento incluye, en un aspecto, un producto de conjugación terapéutico de oligómero-péptido, compuesto de un compuesto análogo oligonucleotídico sustancialmente no cargado y, conjugado con él, un péptido rico en arginina eficaz para potenciar la incorporación del compuesto a células diana. El compuesto contiene una cadena de bases que son complementarias de cuatro o más bases de citosina contiguas de una región de ácido nucleico diana a la cual se pretende unir el compuesto, y esta cadena incluye al menos una base de inosina dispuesta en la cadena con objeto de limitar a tres o menos el número de bases de guanina contiguas en la cadena. Preferiblemente, la cadena de bases incluye al menos dos bases de inosina, y el número de guaninas contiguas en la cadena es dos o menos.

30 Como se verá más adelante, la(s) base(s) de inosina, que es(son) complementaria(s) de las bases de citosina diana pero forma(n) una pareja de bases de Watson-Crick menos estable(s) que la pareja de bases G-C habitual, sirve(n) para potenciar la solubilidad del producto de conjugación durante una operación de purificación que implica que el producto de conjugación se una a, y se libere de, una resina de intercambio catiónico, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina. Esta potenciación es importante para obtener un producto de conjugación purificado mediante métodos de purificación prácticos. De acuerdo con otra característica del invento, la(s) sustitución(es) por bases de inosina es(son) también eficaz(es) para potenciar la actividad del compuesto con respecto a su ácido nucleico diana, como es evidenciado por:

35 (i) cuando la región de ácido nucleico diana incluye el codón de inicio en un mRNA, la(s) sustitución(es) es(son) eficaz(es) para potenciar la capacidad del producto de conjugación para bloquear la traducción de la proteína codificada por el mRNA;

40 (ii) cuando la región de ácido nucleico diana incluye un sitio de corte y empalme dador o aceptor en un mRNA preprocesado, la(s) sustitución(es) es(son) eficaz(es) para potenciar la capacidad del producto de conjugación para enmascarar el corte y empalme de mRNA en dicha región diana; y

45 (iii) cuando la región de ácido nucleico diana incluye un elemento víricamente codificado de acción en cis implicado en la replicación vírica, la(s) sustitución(es) es(son) eficaz(es) para potenciar la capacidad del producto de conjugación para bloquear la replicación vírica, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina.

50 Los métodos para demostrar la actividad antisentido potenciada de los productos de conjugación de oligómero-péptido sustituidos con bases de inosina son típicamente ensayos de traducción exenta de células y ensayos basados en cultivo tisular diseñados para medir la inhibición de la traducción de mRNA, la exactitud del corte y empalme de mRNA preprocesado o la replicación vírica.

55 Los ensayos de traducción exenta de células consisten en un lisado de células competente en cuanto a la traducción (por ejemplo, un lisado de reticulocitos de conejo) y un mRNA de entrada que contiene un gen informador, tal como el de la luciferasa de luciérnaga, con secuencias diana de oligómero antisentido situadas inmediatamente cadena arriba. Para generar el mRNA informador se puede usar una diversidad de construcciones plasmídicas. Se añaden oligómeros antisentido a la mezcla de reacción de traducción exenta de células, y la inhibición relativa de la señal del gen informador es una medida de la actividad antisentido. En los Ejemplos 4 y 5 se presentan descripciones más detalladas de los ensayos de traducción exenta de células utilizados para describir el presente invento.

60 En los ensayos basados en cultivos tisulares, diseñados para demostrar la inhibición de la traducción de mRNA, se usan oligómeros antisentido dirigidos a genes celulares nativos cuyos productos de traducción (por ejemplo, proteínas) pueden ser cuantitativamente medidos o a genes informadores con los que se ha transfectado establemente una línea celular. La medición del grado de inhibición de la traducción del mRNA diana puede ser llevada a cabo

utilizando una diversidad de métodos analíticos, incluyendo la producción de la señal del gen informador y la cuantificación de la expresión proteica usando métodos inmunológicos.

5 Se puede demostrar la inhibición del corte y empalme de mRNA preprocesado midiendo el nivel de mRNA mal cortado y empalmado, mediante transferencias Northern o una reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en células tratadas con oligómeros antisentido dirigidos a sitios dadores o aceptores de corte y empalme. En un planteamiento alternativo (véase, por ejemplo, Kang, Cho et al., 1998) se utiliza una línea celular establemente transfectada con un plásmido que tiene un gen de luciferasa interrumpido por un intrón mutado de beta-globina humana que causa un corte y empalme incorrectos. Los oligómeros antisentido dirigidos a la mutación en el intrón dan lugar a una corrección del corte y empalme y a una suprarregulación de la proteína informadora luciferasa funcional.

10 La actividad potenciada de los oligómeros antisentido dirigidos a elementos de acción en cis implicados en la replicación vírica puede ser demostrada utilizando replicones virales o ensayos de replicación vírica estándares basados en cultivos tisulares. La inhibición de la replicación vírica en presencia de oligómeros antisentido se mide determinando el título de virus que se han replicado en presencia del oligómero antisentido. En los sistemas de replicones víricos se utilizan derivados de clones víricos infecciosos de longitud completa en que los genes estructurales víricos han sido sustituidos, en parte o completamente, por un gen informador. Los replicones se introducen, normalmente por transfección, en células que están infectadas por un virus competente en cuanto a la replicación. Los replicones codifican los elementos de replicación de acción en cis esenciales que son reconocidos por la maquinaria de replicación del virus para dar lugar a la multiplicación del gen informador y a un aumento de la señal informadora, por ejemplo, la actividad luciferasa.

#### A. Componente polipeptídico rico en arginina

25 El péptido rico en arginina utilizado en el invento para potenciar la incorporación de un compuesto oligómero antisentido sustancialmente no cargado a través de una membrana biológica comprende generalmente un componente que consiste en 10-15 subunidades seleccionadas entre X e Y, incluyendo 8-13 subunidades X, 2-4 subunidades Y contiguas, subunidades Y intercaladas individualmente entre las subunidades X, y una subunidad conectora opcional a la que se une el agente. X representa una subunidad de aminoácido que comprende un componente de cadena lateral de estructura  $R^1N=C(NH_2)R^2$  (véase la Figura 3A) en que  $R^1$  es H o R, y  $R^2$  es R,  $NH_2$ ,  $NHR$  o  $NR_2$ , en que R es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno;  $R^1$  y  $R^2$  pueden formar conjuntamente un anillo; y el componente de cadena lateral está unido a la subunidad de aminoácido a través de  $R^1$  o  $R^2$ .

35 En realizaciones seleccionadas, para cada X, el componente de cadena lateral es independientemente seleccionado del grupo que consiste en guanidilo [ $HN=C(NH_2)NH-$ ], amidinilo [ $HN=C(NH_2)C<$ ], 2-aminodihidropirimidilo, 2-amino-tetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo (Figuras 3B-G, respectivamente, con posibles sitios de unión indicados). Adviértase que, en las estructuras 3D, 3E y 3G, la unión de la cadena lateral a la subunidad de aminoácido podría tener lugar a través de cualquiera de los grupos -NH- anulares así como a través de cualquiera de los átomos de carbono indicados. En una realización, el componente de cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácido arginina (Arg).

40 Y representa una subunidad de aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral seleccionada del grupo que consiste en alquilo, alqueno, alquino, arilo, aralquilo y alcarilo, cualquiera de los cuales puede estar sustituido o no sustituido; cuando la cadena lateral es seleccionada entre alquilo sustituido, alqueno sustituido y alquino sustituido, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada seis átomos de carbono. En realizaciones seleccionadas, Y representa una subunidad de aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral seleccionada del grupo que consiste en arilo sustituido o no sustituido, aralquilo, y alcarilo. En otras realizaciones, cada Y es seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina y valina. En una realización preferida, cada Y es una subunidad de fenilalanina (Phe o F). En otra realización preferida, la subunidad Y es el ácido 6-aminoheptanoico (Ahx), un aminoácido artificial. A las subunidades X e Y se puede hacer aquí referencia como "subunidades catiónicas" y "subunidades hidrófobas".

55 Como se indicó anteriormente, las subunidades Y son contiguas, es decir, no se presentan subunidades X entre las subunidades Y, o están individualmente intercaladas entre subunidades X. Sin embargo, la subunidad enlazante puede estar entre subunidades Y. En una realización, las subunidades Y están en un extremo del transportador; en otras realizaciones, están flanqueadas por subunidades X.

60 Preferiblemente, el transportador es un péptido, en el que los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos pueden ser d-aminoácidos, l-aminoácidos, aminoácidos artificiales o una combinación de los mismos. El compuesto que se va a distribuir puede ser un compuesto empleado para detección, tal como un compuesto fluorescente, pero es preferiblemente un agente biológicamente activo, tal como, por ejemplo, un agente terapéutico o diagnóstico. Dichos agentes incluyen ácidos nucleicos o compuestos análogos a ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos antisentido.

65 Como aquí se demuestra, los componentes de transporte como los anteriormente descritos potencian en gran medi-

da la entrada de compuestos oligómeros fijados y no cargados a las células, con respecto a la incorporación del compuesto en ausencia del componente de transporte fijado, y con respecto a la incorporación por un componente de transporte fijado que carezca de las subunidades hidrófobas Y. Dicha incorporación potenciada se evidencia preferiblemente por un aumento de al menos dos órdenes de magnitud, y preferiblemente un aumento de cuatro órdenes de magnitud, en la incorporación del compuesto a células de mamífero con respecto a la incorporación del agente por un componente de transporte fijado que carece de las subunidades hidrófobas Y. La incorporación se potencia preferiblemente al menos veinte órdenes de magnitud, y más preferiblemente cuarenta órdenes de magnitud, con respecto al compuesto no conjugado.

Un beneficio más del componente de transporte es su esperada capacidad para estabilizar un dúplex entre un oligómero antisentido y su secuencia de ácido nucleico diana, probablemente en virtud de una interacción electrostática entre el componente de transporte positivamente cargado y el ácido nucleico negativamente cargado. El número de subunidades cargadas en el transportador es inferior a 14, como se indicó anteriormente, y preferiblemente entre 8 y 11, ya que un número demasiado elevado de subunidades cargadas puede conducir a una reducción de la especificidad de secuencia.

El componente de transporte también reduce la concentración eficaz de un oligómero antisentido para alcanzar una actividad antisentido, según se mide en sistemas tanto de cultivo tisular como exentos de células. Los sistemas de traducción exenta de células proporcionan un medio independiente para evaluar el efecto potenciado del componente de transporte sobre la capacidad del oligómero antisentido para unirse a su diana y, a través de un bloqueo estérico, inhibir la traducción de secuencias cadena abajo. Los ensayos de traducción exenta de células diseñados para examinar la actividad antisentido de productos de conjugación de PMO-péptido rico en arginina demuestran una mejora en la actividad antisentido de entre 10 órdenes de magnitud y 500 órdenes de magnitud en comparación con el PMO no conjugado (véanse el Ejemplo 5 y las Figuras 6 y 7).

#### B. Compuesto antisentido oligómero

Como se indicó anteriormente, en una realización, el compuesto oligómero antisentido es un oligómero sintético capaz de unirse, mediante una unión específica de bases, con una secuencia diana de un polinucleótido, por ejemplo, un compuesto oligonucleotídico análogo antisentido. Dichos compuestos análogos, en los que está modificada la estructura de la cadena principal, la estructura anular o, menos frecuentemente, la estructura de bases de los polinucleótidos naturales, son bien conocidos e incluyen compuestos análogos cargados, tales como oligonucleótidos unidos por fosforotioato, y compuestos análogos no cargados, tales como metilfosfonatos y ácidos nucleicos peptídicos. Algunos compuestos análogos, tales como fosforamidatos N3' → P5', pueden estar cargados o no cargados dependiendo de la sustitución en el componente enlazante.

En una realización preferida, el polímero es un oligómero de morfolino, como se definió anteriormente, que tiene una longitud de aproximadamente 8-40 subunidades. Más típicamente, el oligómero tiene una longitud de aproximadamente 10-30, o aproximadamente 12-25, subunidades. Para ciertas aplicaciones, tales como aplicaciones antibacterianas, los oligómeros cortos, por ejemplo, con una longitud de aproximadamente 8-12 subunidades, pueden ser especialmente ventajosos, particularmente cuando se fijan a un transportador peptídico como el aquí descrito. Preferiblemente, el oligómero es un oligómero de morfolino no cargado y unido por fosforodiamidato (PMO), también anteriormente definido. El PMO puede tener cualquier secuencia, en la que los grupos para apareamiento de bases soportados incluyen las bases A, T, C, G, I e U estándares o modificadas.

De acuerdo con un aspecto del invento, la secuencia de ácido nucleico diana contra la cual se dirige el compuesto oligómero incluye una región de cuatro o más bases de citosina contiguas. Esta región diana puede ser parte del sitio de inicio AUG en un mRNA, donde se desea inhibir o bloquear la expresión de una proteína seleccionada codificada por el mRNA. Alternativamente, puede incluir o ser adyacente a un sitio de corte y empalme dador o aceptor en un mRNA preprocesado, sitio en que se desea bloquear el corte y empalme correctos, con el fin de crear polipéptidos con una mutación de corte y empalme o péptidos incompletos o inactivos. En aún otra realización, la diana puede ser un elemento de acción en cis en un genoma vírico, donde la unión del oligómero (que se puede dirigir contra la cadena + o - del genoma vírico) es eficaz para bloquear la replicación vírica en células infectadas con el virus.

En bases de datos de secuencias públicas, bien conocidas por quienes tienen experiencia en la técnica, se pueden hallar secuencias diana ejemplares que contienen una cadena de cuatro o más bases de guanina en cada uno de estos tres tipos de diana. Una secuencia diana ejemplar descrita más adelante incluye el sitio de inicio AUG en el mRNA de c-myc humano. Sin embargo, se apreciará que esta secuencia, y las diversas sustituciones de guanina por inosina realizadas en el compuesto oligómero para transporte dirigido, son ilustrativas de cómo el compuesto oligómero puede ser modificado, cuando se dirige a cualquier secuencia diana con una cadena de cuatro o más bases de citosina, para alcanzar las ventajas del invento.

El transportador se puede unir al compuesto que se va a distribuir mediante una diversidad de métodos asequibles a quien tiene experiencia en la técnica. Más adelante se proporcionan métodos ejemplares en el Ejemplo 1 y se ilus-



tran en las Figuras 4A-D. En uno de estos ejemplos, el transportador es un péptido que contiene un único resto de cisteína cuya cadena lateral de tiol se usa para enlazar. El punto de enlace puede estar en diversas posiciones a lo largo del transportador. En realizaciones seleccionadas, está en un extremo del transportador. Típicamente, está adyacente a los restos hidrófobos del transportador. Si se desea, se pueden fijar múltiples transportadores a un solo compuesto.

El conector puede ser también cualquier combinación de dos restos de  $\exists$ -Ala y/o Ahx fijados al extremo 5' del PMO y el extremo C del transportador peptídico. Una realización preferida es fijar el resto de Ahx al extremo C del transportador peptídico y el resto de  $\exists$ -Ala al extremo 5' del PMO, como se muestra en la Figura 4D.

Cuando el compuesto es un PMO, el transportador se puede fijar al extremo 5' del PMO, por ejemplo, a través del grupo 5'-hidroxilo o a través de un grupo amina de remate terminal, como se describe en el Ejemplo 3 y se ilustra en la Figura 4A. Alternativamente el transportador se puede fijar al extremo 3', por ejemplo, a través de un nitrógeno del anillo de morfolino, como se muestra en la Figura 4B, o a través de la cadena lateral de un enlace intersubunitario, sea en un extremo o sea en un enlace interno. El conector también puede comprender un enlace directo entre el extremo carboxílico de un péptido transportador y un grupo amina o hidroxilo del PMO, formado por una condensación activada mediante, por ejemplo, carbodiimida.

Los conectores pueden ser seleccionados de entre aquellos que no son escindibles bajo las condiciones de uso normales, tales como, por ejemplo, los que contienen un enlace tioéter o carbamato. En ciertas realizaciones, puede ser deseable incluir un enlace entre el componente transportador y el compuesto que sea escindible *in vivo*. Los enlaces que son escindibles *in vivo* son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ésteres de ácido carboxílico, que son hidrolizados enzimáticamente, y disulfuros, que son escindidos en presencia de glutatión. También puede resultar factible escindir un enlace fotolíticamente escindible, tal como un éter orto-nitrofenílico, *in vivo* mediante la aplicación de una radiación con la longitud de onda apropiada.

Por ejemplo, en la Figura 4C se ilustra la preparación de un producto de conjugación que tiene un conector disulfuro, usando el reactivo 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) o succinimidiloxicarbonil- $\forall$ -metil- $\forall$ -(2-piridilditio)tolueno (SMTP). Los agentes conectores heterobifuncionales ejemplares que contienen además un grupo disulfuro escindible incluyen 3-[(4-azidofenil)ditio]propionato de N-hidroxisuccinimidilo y otros descritos en Vanin y Ji, 1981.

A continuación, como Tabla 1, se proporciona una tabla de secuencias de PMOs, PMOs conjugados con péptido, y péptidos transportadores ejemplares, discutidos en las secciones siguientes. En general, los péptidos incluyen un grupo amino N-terminal y una amina C-terminal (por ejemplo,  $\text{NH}_2$ -RRRRRRRRFFC-CONH<sub>2</sub>, ID. SEC. n° 16). Los restos de guanina sustituidos por inosina se muestran en letra negra.

Tabla 1. PMOs, PMOs conjugados con péptido y péptidos de transporte ejemplares

PMOs	Secuencia (5' a 3')	ID. SEC. n°:
c-myc (AVI-4126)	ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC	1
c-myc 398	ACG TTG AGI GGC ATC GTC GC	2
c-myc 400	ACG TTG AGG IGC ATC GTC GC	3
c-myc 402	ACG TTG AIG IGC ATC GTC GC	4
c-myc 404	ACG TTG AIG GIC ATC GTC GC	5
c-myc 406	ACG TTG AGI IGC ATC GTC GC	6
c-myc 408	ACG TTG AGI GIC ATC GTC GC	7
c-myc 410	ACG TTG AII IGC ATC GTC GC	8
c-myc 412	ACG TTG AGI IIC ATC GTC GC	9
c-myc 414	ACG TTG AII IIC ATC GTC GC	10
<b>Péptido-PMO</b>		
	<b>Secuencia (amino a carboxilo a 5' a 3')</b>	
c-myc 36-01	(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx- $\exists$ Ala-ACGTTGAGIIGCATCGTCGC-3'	11
c-myc 36-02 (AVI-5126)	(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx- $\exists$ Ala-ACGTTGAIIGCATCGTCGC-3'	12
c-myc 36-03	(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx- $\exists$ Ala-ACGTTGAGIICATCGTCGC-3'	13
(RAhxR) <sub>4</sub> -c-myc	(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx- $\exists$ Ala-ACGTTGAGGGGCATCGTCGC-3'	14
R <sub>9</sub> F <sub>2</sub> Ahx-c-myc	RRRRRRRRRRFF-Ahx-ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	15
<b>Péptidos</b>		
	<b>Secuencia (amino a carboxilo)</b>	

R <sub>9</sub> F <sub>2</sub> C	RRRRRRRRRFFC	16
(RAhxR) <sub>4</sub>	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	17
(RAhx) <sub>8</sub>	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx	18

### C. Sustitución por inosina en el compuesto oligómero

5 En estudios llevados a cabo en respaldo del presente invento y presentados más adelante, se observó que al copu-  
lar un péptido rico en arginina con un compuesto oligómero que tiene una cadena de cuatro o más bases de guanina  
(es decir, dirigido contra una secuencia que tiene una serie de cuatro o más bases de citosina), con el objetivo de  
potenciar la incorporación celular del compuesto, se creaban dos problemas críticos, ambos inesperados. En primer  
lugar, la presencia del polipéptido rico en arginina causaba la agregación del producto de conjugación durante el  
proceso de purificación sobre una resina de intercambio catiónico. En segundo lugar, se reducía significativamente  
10 la actividad antisentido del compuesto contra la diana.

Como se describe en los Ejemplos 2 y 3, la agregación del producto de conjugación es un importante obstáculo a  
superar en la síntesis de péptidos ricos en arginina conjugados con PMOs ricos en G tales como el PMO de c-myc  
(AVI-4126, ID. SEC. n° 1). Las preparaciones iniciales de PMO de c-myc conjugado con péptido produjeron discre-  
pancias en el análisis subsiguiente. El espectro de masas del producto de conjugación era el esperado pero la HPLC  
analítica de intercambio catiónico fuerte (SCX; del inglés, strong cation exchange) proporcionaba diversos picos  
distintos con tiempos de retención bastante diferentes. Los múltiples picos correspondían a diferentes formas agre-  
gadas del producto de conjugación. Los resultados descritos en los Ejemplos 4 y 5 demuestran que secuencias de  
PMO ricas en guanina están implicadas en la agregación observada en la HPLC de intercambio catiónico fuerte  
20 (SCX) del PMO de c-myc, y que la sustitución de una o más de las bases de guanina contiguas por bases de inosina  
reducía o eliminaba esta agregación. Como se enumera en la Tabla 1, una estructura ejemplar para AVI-5126 (ID.  
SEC. n° 12) contiene tres restos de inosina y no forma especies agregadas ni siquiera bajo unas condiciones que  
favorecen acusadamente la agregación.

25 El fenómeno de agregación observado cuando se conjugan PMOs con péptidos de transporte ricos en arginina no se  
limita a esta clase de compuestos análogos de ácido nucleico. Otros ácidos nucleicos o compuestos análogos de  
ácido nucleico no cargados, incluyendo otras cadenas principales de morfolino, metilfosfonatos, fosforotioatos y  
fosfodiésteres (es decir, DNA y RNA) y PNAs, tienen todos el mismo potencial para la agregación cuando se conju-  
gan con un polipéptido rico en arginina y, por lo tanto, el potencial para una mejora mediante la sustitución de bases  
30 de guanina por inosina del invento.

### D. Propiedades de bloqueo estérico mejoradas de los péptidos ricos en arginina sustituidos con inosina

35 Se ensayaron PMOs sustituidos con inosina que se dirigen al gen c-myc en un ensayo de lisado de reticulocitos de  
conejo (RRL; del inglés, rabbit reticulocyte lysate) exento de células, descrito en el Ejemplo 4. Como se describe en  
este ejemplo y se muestra en la Figura 6, aumentar el número de sustituciones de guanina por inosina se correlacio-  
naba con una inhibición disminuida de la traducción. El PMO con cuatro sustituciones de guanina por inosina (ID.  
SEC. n° 10) era el menos eficaz a la hora de inhibir la traducción, mientras que los PMOs con sólo una sustitución de  
G por I (ID. SEC. números 2 y 3) eran los más eficaces de todos los PMOs que contenían inosina. El PMO de c-myc  
40 testigo sin sustituciones por inosina (ID. SEC. n° 1) tenía el máximo nivel de inhibición en este ensayo. La disminuida  
inhibición de la traducción observada con PMOs que contienen inosina es consistente con la pérdida de un enlace  
de hidrógeno entre pares de bases de I:C en comparación con los pares de bases de G:C con tres enlaces de hidró-  
geno. La menor T<sub>m</sub> entre el PMO para transporte dirigido y su diana puede desempeñar un papel en la pérdida  
relativa de bloqueo estérico que mide el ensayo de RRL.

45 Tres de los PMOs de c-myc con sustituciones de guanina por inosina anteriormente descritos fueron conjugados con  
el péptido de distribución (RAhxR)<sub>4</sub> y fueron examinados en cuanto a su capacidad para inhibir la traducción exenta  
de células usando el mismo plásmido pCNmycluc y el mismo sistema de RRL descritos en el Ejemplo 4. Como se  
muestra en la Figura 7 y se describe en el Ejemplo 5, se observó que el PMO menos inhibitorio era la secuencia de  
PMO de c-myc conjugada con péptido testigo sin sustituciones por inosina (ID. SEC. n° 14). Por contraste, los com-  
puestos con sustituciones por inosina demostraron una inhibición significativamente mayor de la traducción. En la  
Figura 7 se muestran productos de conjugación de PMO y péptido (RAhxR)<sub>4</sub> con dos o tres sustituciones por inosina  
(ID. SEC. números 11-13). La inhibición traduccional mejorada del PMO sustituido con inosina y conjugado con  
péptido está en acusado contraste con la inhibición disminuida observada con los PMOs no conjugados descritos en  
55 el Ejemplo 4 y mostrados en la Figura 6.

La inhibición potenciada por bloqueo estérico que los péptidos ricos en arginina confieren a un PMO antisentido  
supera completamente las disminuidas propiedades de bloqueo estérico observadas con un PMO no conjugado y  
sustituido con inosina. Basándose en los resultados descritos en el Ejemplo 5 y mostrados en la Figura 7, los PMOs  
60 con sustituciones por inosina presentan unas propiedades de bloqueo estérico significativamente potenciadas con  
respecto a los PMOs no sustituidos con inosina.

## III. Aplicaciones

5 Los productos de conjugación del presente invento son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos vasculares tales como la reestenosis. Las áreas de daño vascular incluyen, por ejemplo, reestenosis o reestrechamiento de la luz vascular después de una intervención vascular, tal como una angioplastia de arterias coronarias con globo, con o sin inserción de cánula intraluminal. Se cree que se produce reestenosis en aproximadamente del 30% al 60% de las lesiones tratadas por angioplastia y en aproximadamente el 20% de las lesiones tratadas con cánulas intraluminales en un periodo de 3 a 6 meses después del procedimiento (véase, por ejemplo, Devi, N. B. et al., Cathet. Cardiovasc. Diagn. 45 (3): 337-45, 1998). También se puede producir una estenosis después de una operación de bypass de arterias coronarias, en la que se realiza una cirugía cardíaca para redirigir o "derivar" la sangre alrededor de arterias obstruidas y mejorar el suministro de sangre y oxígeno al corazón. En tales casos, se puede producir la estenosis en los segmentos de vasos sanguíneos trasplantados y particularmente en la juntura de vasos reemplazados. También se puede producir estenosis en juntas anastomóticas creadas para diálisis.

15 En este aspecto, un producto de conjugación de PMO, preferiblemente c-myc para transporte dirigido, se emplea en una cánula intraluminal revestida, o mediante una disolución de remojo *ex vivo* para tratamiento de venas safenas, o, de otro modo, se distribuye en el sitio del daño vascular. Se ha hallado que composiciones de microburbujas son particularmente útiles en la distribución de moléculas fijadas, tales como oligonucleótidos, en zonas de trombosis o daño vascular, tal como, por ejemplo, un endotelio dañado (véase, por ejemplo, la publicación PCT n° WO 2000/02588), así como en órganos seleccionados tales como el hígado y el riñón. Una composición antirreestenótica preferida es un PMO anti-c-myc, sustituido con inosina, conjugado con un péptido (RAhxR)<sub>4</sub> de transporte a través de un conector de Ahx- $\exists$ Ala (por ejemplo, la ID. SEC. n° 12).

25 Los productos de conjugación de PMO que se dirigen al gen c-myc aquí descritos son también útiles en el tratamiento del cáncer en general y del cáncer de vejiga en particular. La administración transuretral de un producto de conjugación de PMO, preferiblemente c-myc para transporte dirigido, junto con quimioterapia proporciona una actividad anti cancerosa potenciada, como se describe en Knapp, Mata et al. (2003) y como se describe en la Solicitud de EE.UU. 10/151.008 en tramitación conjunta y propiedad conjunta. Una composición anti cancerosa preferida es un PMO anti-c-myc, sustituido con inosina, conjugado con un péptido (RAhxR)<sub>4</sub> de transporte a través de un conector de Ahx- $\exists$ Ala (por ejemplo, la ID. SEC. n° 12).

Los ejemplos siguientes ilustran diversas realizaciones del invento, sin limitación.

## 35 Ejemplo 1: Síntesis peptídica y conjugación con PMO

Se sintetizaron péptidos mediante síntesis peptídica en fase sólida con Fmoc, a la que aquí se hace referencia como SPPS (del inglés, solid phase peptide synthesis). Se usó una resina de alcohol p-benciloxibencilico para la síntesis de péptidos con un ácido C-terminal, mientras que, para las amidas peptídicas, se usó una resina Rink Amide MBHA. Ambas resinas están disponibles en Novabiochem (San Diego, California, EE.UU.). Un ciclo de síntesis típico comenzó con la desprotección N-terminal por medio de piperidina al 20%. A continuación, los aminoácidos N- $\forall$ -protegidos con Fmoc fueron copulados con la cadena peptídica en crecimiento por activación con hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) en presencia de N,N-diisopropiletilamina (DIEA). Las cadenas laterales de la arginina fueron protegidas con el grupo protector 2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf), la cisteína con tritilo, y las cadenas laterales de la lisina con t-butoxicarbonilo (Boc). Se repitió el ciclo hasta que se añadieron todos los aminoácidos, en dirección carboxilo a amino, en la secuencia deseada. La escisión de la resina para síntesis y la desprotección de las cadenas laterales se llevaron simultáneamente a cabo tratando la peptidil-resina con una disolución de H<sub>2</sub>O al 2,5%, triisopropilsilano (TIS) al 2,5% y ácido trifluoroacético (TFA) al 95%. Para los péptidos que contenían un resto de cisteína, se añadió 1,2-etanoditiol (EDT) al 2,5% al cóctel de escisión. Los péptidos crudos se aislaron por precipitación utilizando éter dietílico en un exceso de diez órdenes de magnitud. Para la purificación, se usó una HPLC de intercambio catiónico fuerte utilizando una resina Source 15S (Amersham Biosciences, Piscataway, new Jersey, EE.UU.), lo que fue seguido de una desalación en fase inversa empleando una resina Amberchrom 300M (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, Pennsylvania, EE.UU.). Los péptidos desalados fueron liofilizados y fueron analizados en cuanto a identidad y pureza mediante espectroscopía de masas por tiempo de vuelo y desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS; del inglés, matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy), cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, high performance liquid chromatography) por intercambio catiónico fuerte (SCX), y electroforesis capilar (CE; del inglés, capillary electrophoresis).

60 Se prepararon péptidos que contenían diversos enlaces hidrófobos C-terminales, del modo siguiente. Se prepararon péptidos para condensación directa con un grupo amina o hidroxilo del PMO incluyendo combinaciones de aminoácidos naturales y/o artificiales en el extremo C-terminal del péptido durante la SPPS. Específicamente, los enlaces estaban compuestos por los aminoácidos glicocola, beta-alanina y/o ácido 6-aminohexanoico, usados en diferentes combinaciones de uno o dos restos. Por lo demás, la síntesis peptídica fue idéntica a la síntesis de otros ácidos peptídicos.

Se prepararon péptidos con grupos amina enmascarados para condensación directa con un grupo amina o hidroxilo de un PMO, del modo siguiente. Los grupos amino peptídicos libres interfieren en la condensación directa del extremo carboxilo del péptido con un grupo amina o hidroxilo de un PMO y, por lo tanto, deben ser enmascarados. Se prepararon secuencias peptídicas, tales como rTat y pTat (Tabla 1), que contienen cadenas laterales amínicas, utilizando el grupo protector de cadenas laterales amínicas 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)etilo (Dde). Por lo demás la síntesis peptídica fue idéntica a la síntesis de otros ácidos peptídicos. Los grupos lisina-Dde sobrevivieron a la escisión de la resina y a la desprotección de otros grupos protectores de cadenas laterales de aminoácidos. Las aminas de cadenas laterales permanecen enmascaradas por Dde a lo largo de la conjugación y son posteriormente desprotegidas por tratamiento con hidrazina al 2% en DMF.

La fijación de un péptido de transporte a los extremos 5' del PMO se llevó a cabo a través de un enlace amídico del modo siguiente. Se preparó un péptido-éster benzotriazolónico C-terminalmente reactivo disolviendo el péptido-ácido (15 micromoles), HBTU (14,25 micromoles) y HOBt (15  $\mu$ mol) en 200  $\mu$ l de NMP y añadiendo DIEA (22,5 micromoles). Inmediatamente después de la adición de DIEA, se añadió la disolución del péptido a 1 ml de una disolución 12 mM de 3'-acetil-PMO funcionalizado con 5'-piperazina en DMSO. Después de 180 minutos a 30 °C, la mezcla de reacción fue diluida con agua en un exceso de cuatro órdenes de magnitud. El producto de conjugación crudo fue purificado primero a través de una columna de CM-Sepharose para intercambio catiónico débil (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.), para separar el PMO no conjugado, y luego a través de una columna de fase inversa (columna HLB, Waters, Milford, Massachusetts, EE.UU.). El producto de conjugación fue liofilizado y fue analizado por MALDI-TOF MS, SCX HPLC, y CE.

Ejemplo 2: Oligómeros ricos en G forman agregados de cuádruplos de G cuando se conjugan con péptidos ricos en arginina

En este ejemplo se detalla el desarrollo de un producto de conjugación de PMO-péptido rico en arginina que se dirige al gen c-myc para una aplicación clínica de injerto de un baipás de arteria coronaria (CABG; del inglés, coronary artery bypass graft). La finalidad del proyecto descrito en este ejemplo era desarrollar procedimientos para la síntesis y purificación del producto de conjugación con un rendimiento y una pureza aceptables. Además, los métodos para el análisis del producto de conjugación deben permitir caracterizarlo e identificar impurezas durante todo el proceso sintético y en cualesquier formulaciones usadas en la clínica. La cuantificación de la cantidad de péptido libre que queda en el producto es probablemente la capacidad analítica más crítica ya que el péptido libre es potencialmente más tóxico que el producto de conjugación o el PMO libre.

Como se mostrará más adelante, es evidente que la agregación a través de la formación de cuádruplos de G intramoleculares es un obstáculo principal a superar en la síntesis de péptidos ricos en arginina conjugados con PMOs ricos en G, tal como el PMO de c-myc (AVI-4126, ID. SEC. n° 1). A la luz de esto, se requiere la resolución de diversos problemas antes del ulterior desarrollo de este compuesto. En primer lugar, ¿es posible producir una forma no agregada del producto de conjugación? En segundo lugar, ¿es posible desarrollar un método analítico que no sea agregativo ni disgregativo y que nos proporcione una evaluación precisa de la forma de una muestra dada? Finalmente, ¿qué forma agregada, si la hubiera, asumirá el producto de conjugación cuando se formule en un tampón para inyección tal como PBS?

Las preparaciones iniciales de PMO de c-myc conjugado con péptido produjeron evidentes discrepancias en el análisis subsiguiente. El espectro de masas era el esperado pero la HPLC analítica de intercambio catiónico fuerte (SCX) proporcionaba diversos picos distintos con tiempos de retención bastante diferentes. Los múltiples picos correspondían a diferentes formas agregadas del producto de conjugación.

La evidencia de agregación surge del primer intento para purificarlo mediante SCX HPLC preparativa. Se cargaron 118 DO<sub>260</sub> de R<sub>9</sub>F<sub>2</sub>Ahx-cmyc (ID. SEC. n° 15) en una columna Source 15S de 20 ml de capacidad para HPLC y se desarrollaron en un tampón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> con un pH de 4,75, con elución por medio de KCl 1,5 M. Tanto el tampón A como el B contenían acetonitrilo (ACN) al 25%. El producto de conjugación fue eluido de la columna como un pico principal, resultando eluido justo después del péptido libre, pero el subsiguiente análisis de las fracciones reveló que picos que eran eluidos más tarde habían resultado enriquecidos. Los picos que son eluidos más tarde corresponden a formas agregadas multímeras del producto de conjugación. Se obtuvo evidencia de que los picos que son eluidos más tarde son formas agregadas multímeras del producto de conjugación, con sus tiempos de retención más prolongados a causa de su carga aumentada, mediante la observación de que las condiciones saladas de la purificación por SCX favorecen las formas agregadas, mientras que las condiciones de baja sal favorecen la forma libre. Se sabe que la sal potencia la formación de GROs (oligómeros ricos en guanina; del inglés, guanine-rich oligomers) cuádruplos a través de cuádruplos de G. La carga de un producto de conjugación en una columna para SCX HPLC en KCl 1,5 M enriqueció el segundo de los dos picos que eran eluidos más tarde, y disminuyó la cantidad del pico no agregado primero. La carga en cloruro de guanidinio 2 M o urea 6 M redujo mucho la cantidad de los picos que eran eluidos más tarde y dejó inafectado el pico que era eluido primero. Por lo tanto, el estado de agregación de la molécula puede ser manipulado cambiando el ambiente de la carga. Esto proporcionaba la evidencia adicional de que los picos que son eluidos más tarde corresponden a formas agregadas del producto de conjugación, y que los disgre-

gantes tradicionales urea y guanidinio son claramente eficaces en cuanto a disgregar el producto de conjugación conforme es cargado en la resina.

5 El efecto del calor sobre la SCX HPLC analítica proporcionó evidencia adicional de agregación. Esta cromatografía se llevó a cabo usando una columna Source 15S Tricorn para SCX dispuesta dentro de una estufa para columnas. Cuando se excluyen completamente los cationes metálicos de la cromatografía y se sustituyen por guanidinio, la aplicación de calor a la columna hace que desaparezcan los picos que son eluidos más tarde. El porcentaje de producto de conjugación agregado disminuye conforme se aumenta la temperatura de la columna de la temperatura ambiental hasta 65 °C. No se observa el fenómeno de "fusión" cuando se usa sodio como catión durante toda la  
10 cromatografía, lo que sugiere que los cationes metálicos estabilizan las especies agregadas. Esto tiene sentido cuando se ve en el contexto del susodicho intento de purificación por SCX, en la que el potasio está por todas partes y predominan las formas agregadas.

15 El hecho de que la forma agregada del producto de conjugación tenga un tiempo de retención mucho mayor sugiere que, aunque las moléculas estén interaccionando, las cargas en las cadenas laterales de las argininas están aún disponibles para la interacción con la resina de intercambio iónico. Éste sería el caso si las porciones de PMO de las moléculas de producto de conjugación estuvieran interaccionando entre sí para formar agregados multímeros donde las porciones peptídicas no están implicadas en la interacción.

20 Parece que el problema de la agregación es único para la secuencia de PMO de c-myc, o al menos para oligómeros ricos en guanina (GROs). La conjugación de péptidos similares con secuencias que tienen bajo contenido de G no presenta problemas de agregación. Los productos de conjugación de otros PMOs con series de G consecutivas presentan el mismo tipo de agregación en SCX HPLC. No parece que el conector entre el PMO y el péptido ejerza efecto alguno sobre la agregación. El enlace éster N-(4-maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBS)-tioéter proporciona un patrón de elución en SCX muy similar al de los enlaces Gly2-Ahx, Ahx2, o amida de Ahx. Finalmente, un péptido más reciente usado en nuestros productos de conjugación de c-myc, (RAhxR)<sub>4</sub>-, aun cuando es un 58% más largo que el R<sub>9</sub>F<sub>2</sub>- previo, proporciona el mismo patrón de elución del agregado en SCX que el péptido más corto. Por lo tanto, se produce agregación con cualquier péptido rico en arginina y con todos los enlaces usados hasta la fecha.  
25 Puesto que no se observa agregación cuando los mismos péptidos con sus diversos enlaces se conjugan con secuencias de PMO de "baja G", atribuimos el fenómeno a la naturaleza rica en G de la secuencia de PMO de c-myc.  
30

La agregación observada con el GRO conjugado es consistente con las interacciones PMO a PMO que forman las estructuras de cuádruplos de G vistas en DNA y RNA con series de guaninas consecutivas. La secuencia de PMO del PMO de c-myc de 20 monómeros anteriormente descrito (ID. SEC. n° 1) es 5'-ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC-3', abarcando su serie de cuatro G las posiciones 8-11. Se obtiene evidencia de la formación de estructuras de cuádruplos de G cuando se miden mediante SCX HPLC los efectos de diferentes cationes sobre el grado de agregación. Es bien sabido que las interacciones catiónicas son importantes para que se coordinen los cuádruplos de DNA y RNA.  
35

40 Ejemplo 3: La sustitución de guanina por inosina evita la agregación de oligómeros ricos en G conjugados con péptidos ricos en arginina

45 Durante mucho tiempo se ha reconocido que las secuencias de ácido nucleico ricas en guanina pueden adoptar estructuras cuádruples intermoleculares o intramoleculares que son estabilizadas por la presencia de cuádruplos de G (véase la Figura 5). Los cuádruplos de G son tetrámeros planos y apilados de guanina enlazados por hidrógeno y causan que los ácidos nucleicos ricos en guanina formen estructuras cuádruples. Se han investigado los posibles papeles de la formación de cuádruplos *in vivo* porque ciertas secuencias ricas en G biológicamente importantes son capaces de formar cuádruplos de G bajo condiciones fisiológicas *in vitro*. Además, el número de comunicados que describen proteínas ligantes de cuádruplos de G específicas es ahora considerable (Shafer y Smirnov, 2000).  
50

Los oligómeros ricos en G (GROs) pueden formar una diversidad de posibles estructuras cuádruples dependiendo de consideraciones tanto termodinámicas como cinéticas. Las estructuras formadas pueden ser influidas por la concentración y la secuencia de bases oligonucleotídicas, así como por las condiciones (temperatura y tampón) usadas para la hibridación, especialmente la presencia de cationes monovalentes tales como K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>. Los cuádruplos pueden estar formados por una, dos o cuatro moléculas de oligonucleótido, a los que se hace referencia como estructuras monómeras, dímeras y tetrámeras, respectivamente. Los cuádruplos monómeros y dímeros han sido adicionalmente clasificados basándose en la posición de sus regiones de bucle en forma de silla (bucle lateral) o de cesta (bucle diagonal). La orientación relativa de cadena (polaridad 5' a 3') de las cuatro cadenas del cuádruplo puede ser paralela, antiparalela o mixta (Dapic, Abdomerovic et al., 2003).  
55  
60

Con objeto de alterar las interacciones por enlace de hidrógeno que facilitan las estructuras de cuádruplos de G, se sintetizaron nueve PMOs con guaninas sustituidas por inosinas en diferentes posiciones dentro de la serie de cuatro G del PMO de c-myc (ID. SEC. n° 1). Los PMOs que contienen inosina se enumeran en la Tabla 1 como ID. SEC. números 2-10. Después de la conjugación con el péptido, se llevó a cabo un análisis bajo condiciones de SCX HPLC de alta agregación. Puesto que las condiciones son de máxima agregación, debería ser un ensayo riguroso de la  
65

tendencia relativa de cada molécula a agregarse.

Se conjugó el péptido Ac-(Arg-Ahx-Arg)<sub>4</sub>-Ahx- $\exists$ Ala-OH, como sal de trifluoroacetato, con las secuencias de PMO de c-mic no modificadas y modificadas con nueve inosinas, de 20 monómeros, enumeradas en la Tabla 1 (ID. SEC. números 1-10). Las conjugaciones se llevaron a cabo de la manera habitual, usando copulación con HBTU en NMP/DMSO. Las reacciones se desarrollaron con agitación a 35 °C durante 180 minutos. Las mezclas de reacción fueron diluidas con 3 ml de H<sub>2</sub>O, cargadas en columnas de CM-Sepharose de 2 ml de capacidad, y lavadas con 2 ml de ACN y 1 ml de H<sub>2</sub>O. Los productos de conjugación fueron eluidos con 4 ml de cloruro de guanidinio 2 M. Las disoluciones saladas de producto de conjugación eluidas de las columnas de intercambio iónico fueron desaladas mediante carga en columnas de fase inversa Waters HLB de 2 ml de capacidad, lavado con 4 ml de H<sub>2</sub>O y elución con 4 ml de ACN al 50%. Finalmente, la disoluciones fueron liofilizadas.

El análisis del producto de conjugación por MALDI-TOF MS sugería un producto limpio, debiéndose las principales impurezas a N-1 secuencias de PMO truncadas. La HPLC se llevó a cabo usando un sistema Bio-Rad BioLogic HR HPLC. La columna utilizada para todos los ensayos fue una Tricorn Source 15S 4.6/100 PE (Amersham Biosciences; producto 17-5182-01). El sistema de tamponamiento utilizado fue Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM en ACN al 25% con un pH de 7,5, con elución por medio de NaCl 1,5 M. Todas las muestras se cargaron en tampón A. Para todos los ensayos se empleó un caudal de 1 ml/min, con un gradiente de B al 20-75%/14 volúmenes de columna. Los resultados cromatográficos se proporcionan a continuación en la Tabla 2, como valores de pico integrados. Ha de advertirse que en todos los cromatogramas estaba presente un pequeño pico que representa una impureza química y aproximadamente el 7% del total de integración.

La sustitución de guanina por inosina tenía un efecto obvio sobre la cantidad relativa de agregación. Con la sustitución de sólo una guanina, en la posición 9 o 10, el porcentaje de producto de conjugación en forma agregada caía del 79% a un valor medio de 56%. Tres de las secuencias con dos sustituciones, (I8, I10), (I8, I11) e (I9, I11), tenían cromatogramas con un valor medio de producto de conjugación agregado de 20%. La sustitución de las dos guaninas centrales de la serie de cuatro G tenía un efecto mayor, proporcionando sólo un 2,7% de agregado. Cuando se sustituyeron tres o más de las guaninas (I9, I10), se eliminó totalmente la agregación.

Tabla 2. Agregación de productos de conjugación de PMO sustituido con inosina-péptido

Nombre de la secuencia	ID. SEC. n°	N° de restos de inosina		% no agregado
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I10)	19	1	36,04	56,66
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I8, I10)	20	2	68,73	21,91
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I8, I11)	21	2	66,06	23,68
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I9, I10)	22	2	88,39	2,67
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I9, I11)	23	2	75,46	16,21
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I8, I9, I10)	24	3	91,74	0,0
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I9, I10, I11)	25	3	92,26	0,0
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I8, I9, I10, I11)	26	4	91,92	0,99
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc	27	0	7,72	78,93
(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx $\exists$ Ala-cmyc (I9)	28	1	37,86	55,06

Ejemplo 4: Inhibición de la traducción exenta de células usando PMO con sustituciones de guanina por inosina

Se subclonó la secuencia de codificación para luciferasa de luciérnaga (fLUC; del inglés, firefly luciferase) en el sitio de clonación múltiple del plásmido pCi-Neo (Promega), en los sitios *Sal* I y *Not* I, y se denominó pCNlucr al plásmido resultante. Se subclonó una región de 30 pares de bases que rodeaba el codón de inicio ATG del gen c-myc humano [5'-AGCCTCCCGCGACGATGCCCTCAACGTTA-3' (ID. SEC. n° 29), número de acceso de Genbank: V00568] en los sitios *Nhe* I y *Sal* I de pCNlucr y se denominó pCNmycluc. Éste colocaba las secuencias de codificación de c-myc en marco con las secuencias de codificación de aminoácidos del gen fLUC (c-myc:fLUC). Un PMO que se dirige a esta región de c-myc, AVI-4126, se enumera como ID. SEC. n° 1. PMOs sustituidos con inosina, con diversos números y posiciones de restos de guanina sustituidos por inosina, y que se dirigen a la región del codón de inicio de c-myc se enumeran como ID. SEC. números 2-10.

Todos los plásmidos anteriormente descritos tienen el promotor de RNA polimerasa de T7 cadena arriba de las secuencias de c-myc:fLUC y permitían que se produjera RNA desde el plásmido, después de linealización con *Not*I, usando el kit y el protocolo Megascript basados en polimerasa de T7 (Ambion). Se llevaron a cabo traducciones *in vitro* usando RNA transcrito en una concentración final de 1 nM en cada mezcla de reacción, con 12  $\mu$ l de lisado de reticulocitos de conejo tratado con nucleasa (Promega) además de PMO, (RAhxR)<sub>4</sub>-PMO o agua. Se mezclaron 10

5  $\mu$ l de la mezcla de reacción de traducción con 50  $\mu$ l de reactivo de ensayo para luciferasa (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se leyó la emisión lumínica en un luminómetro FLx800 para microplacas (BIO-TEK Instruments). Se examinaron las mezclas de reacción en cuanto a unidades lumínicas relativas con el programa KC Junior (BIO-TEK) usando la función de luminiscencia y un ajuste de sensibilidad de 125. Se examinaron doce mezclas de reacción a la vez, incluyendo mezclas de reacción testigo-agua en el primer y último pocillo de cada fila. Se expresaron las unidades lumínicas relativas (RLU; del inglés, relative light units) producidas por cada reacción (n = 3) en función de la concentración de PMO o (RAhxR)<sub>4</sub>-PMO, como se muestra en las Figuras 6 y 7.

10 Se examinaron diversos PMOs sustituidos con inosina que se dirigen al gen c-myc en el ensayo del lisado de reticulocitos de conejo (RRL) exento de células anteriormente descrito. Como se muestra en la Figura 6, un aumento del número de sustituciones de guanina por inosina se correlacionaba con una inhibición disminuida de la traducción. El PMO con cuatro sustituciones de guanina por inosina (ID. SEC. n° 10) era el menos eficaz en cuanto a inhibir la traducción. Los PMOs con sólo una sustitución de G por I (ID. SEC. números 2 y 3) eran los más eficaces de todos los PMOs que contenían inosina. El PMO más eficaz fue el PMO de c-myc testigo sin sustituciones por inosina (ID. SEC. n° 1). Se propone que la inhibición disminuida de traducción observada con PMOs que contienen inosina se debe a la pérdida de un enlace de hidrógeno entre pares de bases I:C en comparación con los pares de bases G:C con tres enlaces de hidrógeno.

20 Ejemplo 5: Inhibición potenciada de la traducción exenta de células con productos de conjugación de péptido-PMO sustituidos con inosina

25 Se conjugaron tres PMOs de c-myc diferentes, con diversas sustituciones de guanina por inosina, con el péptido de distribución (RAhxR)<sub>4</sub> y se examinaron en cuanto a su capacidad para inhibir la traducción exenta de células utilizando el mismo plásmido pCNmycluc y el mismo sistema de RRL descritos en el Ejemplo 4. Como se muestra en la Figura 7, se observó que el PMO menos inhibitorio era la secuencia testigo de PMO de c-myc conjugado con péptido sin sustituciones por inosina (ID. SEC. n° 14). Los compuestos con sustituciones por inosina demostraron una inhibición significativamente mayor de la traducción. En la Figura 7, se muestran productos de conjugación de PMO-péptido RAhxR con dos o tres sustituciones por inosina (ID. SEC. números 11-13). La inhibición traduccional mejorada del PMO sustituido con inosina y conjugado con péptido está en acusado contraste con la inhibición disminuida observada con los PMOs no conjugados descritos en el Ejemplo 3 y mostrados en la Figura 6. La inhibición potenciada por bloqueo estérico que los péptidos ricos en arginina confieren a PMOs antisentido supera completamente las disminuidas propiedades de bloqueo estérico observadas con PMOs no conjugados y sustituidos con inosina. Basándose en los resultados mostrados en la Figura 7, los PMOs con sustituciones por inosina resultan inesperadamente potenciados en mayor grado que los PMOs no sustituidos con inosina. Actualmente se desconoce el mecanismo de las propiedades potenciadas de bloqueo estérico que los péptidos ricos en arginina confieren a los PMOs sustituidos con inosina. Sin embargo, la utilidad de estos PMOs antisentido mejorados tanto en la síntesis como en el campo terapéutico es considerable.

Lista de Secuencias

PMOs	Secuencia (5' a 3')	ID. SEC. n°:
c-myc (AVI-4126)	ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC	1
c-myc 398	ACG TTG AGI GGC ATC GTC GC	2
c-myc 400	ACG TTG AGG IGC ATC GTC GC	3
c-myc 402	ACG TTG AIG IGC ATC GTC GC	4
c-myc 404	ACG TTG AIG GIC ATC GTC GC	5
c-myc 406	ACG TTG AGI IGC ATC GTC GC	6
c-myc 408	ACG TTG AGI GIC ATC GTC GC	7
c-myc 410	ACG TTG AII IGC ATC GTC GC	8
c-myc 412	ACG TTG AGI IIC ATC GTC GC	9
c-myc 414	ACG TTG AII IIC ATC GTC GC	10
Péptido-PMO	Secuencia (amino a carboxilo a 5' a 3')	
c-myc 36-01	(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx- $\exists$ Ala-ACGTTGAGIIGCATCGTCGC-3'	11
c-myc 36-02 (AVI-5126)	(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx- $\exists$ Ala-ACGTTGAIIGCATCGTCGC-3'	12
c-myc 36-03	(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx- $\exists$ Ala-ACGTTGAGIICATCGTCGC-3'	13
(RAhxR) <sub>4</sub> -c-myc	(RAhxR) <sub>4</sub> Ahx- $\exists$ Ala-ACGTTGAGGGGCATCGTCGC-3'	14
R <sub>9</sub> F <sub>2</sub> Ahx-c-myc	RRRRRRRRRFF-Ahx-ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	15

<b>Péptidos</b>	<b>Secuencia (amino a carboxilo)</b>	
R <sub>9</sub> F <sub>2</sub> C	RRRRRRRRRFFC	16
(RAhxR) <sub>4</sub>	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	17
(RAhx) <sub>8</sub>	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx	18

Referencias

5 Devi, G. R. (2002). "Prostate cancer: status of current treatments and emerging antisense-based therapies". *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4 (2): 138-48. Hudziak, R. M., E. Barofsky et al. (1996). "Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6 (4): 267-72.

10 Iversen, P. L. (2001). *Phosphoramidite Morpholino Oligomers. Antisense Drug Technology.* S. T. Crooke. New York, Marcel Dekker, Inc. Shafer, R. H. e I. Smirnov (2000). "Biological aspects of DNA/RNA quadruplexes". *Biopolymers* 56 (3): 209-27.

15 Stein, D. A., D. E. Skilling et al. (2001). "Inhibition of Vesivirus infections in mammalian tissue culture with antisense morpholino oligomers". *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11 (5): 317-25.

Summerton, J. y D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties". *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7 (3): 187-95.

20 Vanin, E. F. y T. H. Ji (1981). "Synthesis and application of cleavable photoactivable heterobifunctional reagents". *Biochemistry* 20 (24): 6754-60.

Dapic, V., V. Abdomerovic et al. (2003). "Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides". *Nucleic Acids Res.* 31 (8): 2097-107.

25 Kang, S. H., M. J. Cho et al. (1998). "Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development". *Biochemistry* 37 (18): 6235-9.

Knapp, D. C, J. E. Mata et al. (2003). "Resistance to chemotherapeutic drugs overcome by c-Myc inhibition in a Lewis lung carcinoma murine model". *Anticancer Drugs* 14 (1): 39-47.

30 Shafer, R. H. e I. Smirnov (2000). "Biological aspects of DNA/RNA quadruplexes". *Biopolymers* 56 (3): 209-27.

Vanin, E. F. y T. H. Ji (1981). "Synthesis and application of cleavable photoactivable heterobifunctional reagents". *Biochemistry* 20 (24): 6754-60.

LISTA DE SECUENCIAS

35 <110> AVI BioPharma, Inc.  
Iversen, Patrick L.  
Weller, Dwight D.  
Hassinger, Jed N.

40 <120> COMPUESTO OLIGÓMERO ANTISENTIDO SUSTITUIDO CON INOSINA Y CONJUGADO CON PÉPTIDO, Y MÉTODO

45 <130> 504508067WO0

<140> No asignado aún  
<141> Presentado adjunto

50 <150> No asignado aún a EE.UU.  
<151> 2005-05-23

<150> US 60/574.048  
<151> 2004-05-24

55 <160> 29

<170> PatentIn, versión 3.3

60 <210> 1  
<211> 20



<212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

<400> 1  
 acgttgaggg gcatcgtcgc 20

10

<210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

20

<220>  
 <221> características varias  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> n = inosina

<400> 2  
 acgttgagng gcatcgtcgc 20

25

<210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

35

<220>  
 <221> características varias  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> n = inosina

40

<400> 3  
 acgttgaggn gcatcgtcgc 20

45

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

50

<220>  
 <221> características varias  
 <222> (8) .. (10)  
 <223> n = inosina

55

<400> 4  
 acgttgangn gcatcgtcgc 20

60

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

<220>  
 <221> características varias  
 <222> (8) .. (11)  
 5 <223> n = inosina  
  
 <400> 5  
 acgttgangg ncatcgtcgc 20  
  
 10 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc  
  
 <220>  
 <221> características varias  
 20 <222> (9) .. (10)  
 <223> n = inosina  
  
 <400> 6  
 25 acgttgagnn gcatcgtcgc 20  
  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc  
  
 <220>  
 <221> características varias  
 35 <222> (9) .. (11)  
 <223> n = inosina  
  
 <400> 7  
 40 acgttgagng ncatcgtcgc 20  
  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 45 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc  
  
 50 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (8) .. (10)  
 <223> n = inosina  
  
 55 <400> 8  
 acgttgannn gcatcgtcgc 20  
  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

- 5 <220>  
<221> características varias  
<222> (9) .. (11)  
<223> n = inosina
- <400> 9  
acgttgagnn ncatcgtcgc 20
- 10 <210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> Oligómero sintético antisentido para c-myc
- 20 <220>  
<221> características varias  
<222> (8) .. (11)  
<223> n = inosina
- 25 <400> 10  
acgttgannn ncatcgtcgc 20
- 30 <210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Oligómero sintético antisentido para c-myc, conjugado con péptido sintético de transporte
- 35 <220>  
<221> características varias  
<222> (9) .. (10)  
<223> n = inosina
- 40 <220>  
<221> características varias  
<222> (1) .. (1)  
<223> nucleotídicamente modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico
- 45 <400> 11  
acgttgagnn gcatcgtcgc 20
- 50 <210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
<223> Oligómero sintético antisentido para c-myc, conjugado con péptido sintético de transporte
- 60 <220>  
<221> características varias  
<222> (8) .. (10)  
<223> n = inosina
- <220>  
<221> características varias  
<222> (1) .. (1)  
<223> nucleotídicamente modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg

# ES 2 375 631 T3

Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico

- 5 <400> 12  
acgttgannn gcatcgtcgc 20
- <210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> Oligómero sintético antisentido para c-myc, conjugado con péptido sintético de transporte
- 15 <220>  
<221> características varias  
<222> (9) .. (11)  
<223> Oligómero sintético antisentido para c-myc, conjugado con péptido sintético de transporte
- 20 <220>  
<221> características varias  
<222> (1) .. (1)  
<223> nucleotídicamente modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico
- 25 <400> 13  
acgttgagann ncatcgtcgc 20
- 30 <210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>  
<223> Oligómero sintético antisentido para c-myc, conjugado con péptido sintético de transporte
- 40 <220>  
<221> características varias  
<222> (1) .. (1)  
<223> nucleotídicamente modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico
- 45 <400> 14  
acgttgaggg gcatcgtcgc 20
- 50 <210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
<223> Oligómero sintético antisentido para c-myc, conjugado con péptido sintético de transporte
- 60 <220>  
<221> características varias  
<222> (1) .. (1)  
<223> nucleotídicamente modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Ahx, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico
- <400> 15  
acgttgaggg gcatcgtcgc 20
- <210> 16  
<211> 12  
<212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético de transporte  
 5  
 <400> 16  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys  
 1 5 10  
 <210> 17  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético de transporte  
 15  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es Ahx, que es el ácido 6-aminohexanoico  
 20  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa es Ahx, que es el ácido 6-aminohexanoico  
 25  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa es Ahx, que es el ácido 6-aminohexanoico  
 30  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (11) .. (11)  
 <223> Xaa es Ahx, que es el ácido 6-aminohexanoico  
 35  
 <400> 17  
 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg  
 1 5 10  
 <210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Péptido sintético de transporte  
 45  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (11) .. (11)  
 <223> Xaa es Ahx, que es el ácido 6-aminohexanoico  
 50  
 <400> 18  
 Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa  
 1 5 10 15  
 55  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 60

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

5 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico

10 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> n = inosina

15 <400> 19  
 acgttgaggn gcatcgtcgc 20

20 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

30 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico

35 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (8) .. (10)  
 <223> n = inosina

40 <400> 20  
 acgttgangn gcatcgtcgc 20

40 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

50 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico

55 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (8) .. (11)  
 <223> n = inosina

60 <400> 21  
 acgttgangg ncatcgtcgc 20

<210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc  
 5  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx be-  
 10 ta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (1) .. (10)  
 <223> n = inosina  
 15  
 <400> 22  
 acgttgagnn gcatcgtcgc 20  
 20  
 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx be-  
 30 ta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (9) .. (11)  
 <223> n = inosina  
 35  
 <400> 23  
 acgttgagng ncatcgtcgc 20  
 40  
 <210> 24  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc  
 50  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx be-  
 55 ta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico  
 <220>  
 <221> características varias  
 <222> (8) .. (10)  
 <223> n = inosina  
 60  
 <400> 24  
 acgttgannn gcatcgtcgc 20  
 <210> 25

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

<220>  
 <221> características varias

10

<222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico

<220>  
 <221> características varias

15

<222> (9) .. (11)  
 <223> n = inosina

<400> 25  
 acgttgagann ncatcgtcgc 20

20

<210> 26  
 <211> 20  
 <212> DNA

25

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

30

<220>  
 <221> características varias

<222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico

35

<220>  
 <221> características varias

<222> (8) .. (11)  
 <223> n = inosina

40

<400> 26  
 acgttgannn ncatcgtcgc 20

45

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

50

<220>  
 <221> características varias

<222> (1) .. (1)  
 <223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx beta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico

55

<400> 27  
 acgttgaggg gcatcgtcgc 20

60

<210> 28  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial



# ES 2 375 631 T3

<220>  
<223> Oligómero sintético antisentido para c-myc

5 <220>  
<221> características varias  
<222> (1) .. (1)  
<223> modificado en 5' para que incluya el péptido Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Arg Ahx Arg Ahx be-  
ta-Ala, en que Ahx = ácido 6-aminohexanoico

10 <220>  
<221> características varias  
<222> (9) .. (9)  
<223> n = inosina

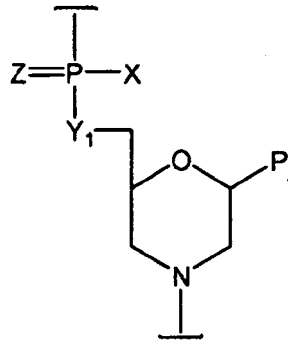
15 <400> 28  
acgttgagng gcatcgtcgc 20

20 <210> 29  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 29  
agcctccgc gacgatgcc ctcaacgtta 30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la preparación de un compuesto análogo oligonucleotídico sustancialmente no cargado, método que comprende formar un producto de conjugación del compuesto con un péptido rico en arginina eficaz para potenciar la incorporación del compuesto a células diana, en que el compuesto incluye una cadena de bases que son complementarias de cuatro o más bases de citosina contiguas de una región de ácido nucleico diana, y en que al menos una base de guanina está sustituida por una base de inosina en dicha cadena de bases con objeto de limitar a tres o menos el número de bases de guanina contiguas en dicha cadena.
- 10 2. El método de la Reivindicación 1, en que al menos una base de guanina está sustituida por una base de inosina en dicha cadena de bases con objeto de limitar a dos o menos el número de bases de guanina contiguas en dicha cadena.
- 15 3. El método de la Reivindicación 1 ó 2, en que al menos dos bases de guanina están sustituidas por bases de inosina en dicha cadena de bases.
- 20 4. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en que dicha sustitución es eficaz para potenciar la solubilidad del producto de conjugación en agua durante una operación de purificación que implica que el producto de conjugación se une a, y se libera de, una resina de intercambio catiónico, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina.
- 25 5. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en que dicha región de ácido nucleico diana incluye el codón de inicio en un mRNA, y dicha sustitución es eficaz para potenciar la capacidad del producto de conjugación para bloquear la traducción de la proteína codificada por el mRNA, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina.
- 30 6. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en que dicha región de ácido nucleico diana incluye un sitio de corte y empalme dador o aceptor en un mRNA preprocesado, y dicha sustitución es eficaz para potenciar la capacidad del producto de conjugación para enmascarar el corte y empalme de mRNA en dicha región diana, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina.
- 35 7. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en que dicha región de ácido nucleico diana incluye un elemento víricamente codificado de acción en cis implicado en la replicación vírica, y dicha sustitución es eficaz para potenciar la capacidad del producto de conjugación para bloquear la replicación vírica, con respecto al mismo producto de conjugación en ausencia de la sustitución por inosina.
- 40 8. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, en que dicho péptido rico en arginina comprende de 8 a 16 subunidades seleccionadas entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, incluyendo al menos seis subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en que > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y en que
  - 45 (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un compuesto análogo a arginina, siendo dicho compuesto análogo un  $\nabla$ -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura  $R^1N=C(NH_2)R^2$  en que  $R^1$  es H o R, y  $R^2$  es R,  $NH_2$ ,  $NHR$  o  $NR_2$ , en que R es alquilo inferior o alquenilo inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno;  $R^1$  y  $R^2$  pueden formar conjuntamente un anillo; y la cadena lateral está unida a dicho aminoácido a través de  $R^1$  o  $R^2$ ;
  - 50 (b) cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro  $-C(O)-(CHR)_n-NH-$ , en que (i) n es de 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo, o (ii) n es 1 y R es una cadena lateral neutra seleccionada entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en que dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada cuatro átomos de carbono; y
  - 55 (c) cada subunidad Z representa independientemente un aminoácido seleccionado entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicocola, histidina, lisina, metionina, serina y treonina.
- 60 9. El método de la Reivindicación 8, en que dicho compuesto análogo oligonucleotídico es un oligómero de morfolino compuesto de subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo entre el nitrógeno del morfolino de una subunidad y un carbono exocíclico en la posición 3 del morfolino de una subunidad adyacente.
10. El método de la Reivindicación 9, en que dichas subunidades de morfolino están unidas por enlaces fosfordiamidato no cargados, de acuerdo con la estructura:

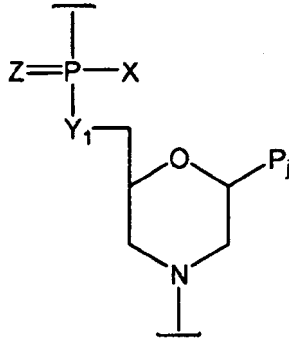


en que  $Y_1 = O$ ,  $Z = O$ ,  $P_i$  es un componente para apareamiento de bases de purina o pirimidina eficaz para unirse, mediante un enlace de hidrógeno específico de bases, con una base de un polinucleótido, y X es alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo o alquilamino.

- 5
11. Un producto de conjugación de oligómero-péptido, que comprende
- (a) un compuesto análogo oligonucleotídico sustancialmente no cargado que tiene una secuencia de bases que incluye una cadena de bases que son complementarias de cuatro o más bases de citosina contiguas de una región de ácido nucleico diana, y
- 10
- (b) conjugado con dicho compuesto, un péptido rico en arginina eficaz para potenciar la incorporación del compuesto a células diana, en que dicha cadena de bases del compuesto incluye al menos una base de inosina, dispuesta en dicha cadena con objeto de limitar a tres o menos el número de bases de guanina contiguas en dicha cadena.
- 15
12. El producto de conjugación de la Reivindicación 11, en que el producto de conjugación es como se define en la Reivindicación 2, 3, 4, 8, 9, 10 ó 14.
- 20
13. El producto de conjugación de la Reivindicación 11 ó 12, en que dicho compuesto incluye una secuencia para transporte dirigido seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 2-10.
- 25
14. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en que el compuesto análogo oligonucleotídico sustancialmente no cargado comprende una cadena principal que comprende componentes de morfolino, metilfosfonato, fosforotioato, fosfodiéster o ácido nucleico peptídico.
- 30
15. El producto de conjugación de cualquiera de las Reivindicaciones 11, 12 y 13, en que dicho péptido rico en arginina comprende de 8 a 16 subunidades seleccionadas entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, incluyendo al menos seis subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en que > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y en que
- (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un compuesto análogo a arginina, siendo dicho compuesto análogo un  $\alpha$ -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura  $R^1N=C(NH_2)R^2$  en que  $R^1$  es H o R, y  $R^2$  es R,  $NH_2$ ,  $NHR$  o  $NR_2$ , en que R es alquilo inferior o alquenilo inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno;  $R^1$  y  $R^2$  pueden formar conjuntamente un anillo; y la cadena lateral está unida a dicho aminoácido a través de  $R^1$  o  $R^2$ ;
- 35
- (b) cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro  $-C(O)-(CHR)_n-NH-$ , en que (i) n es de 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo, o (ii) n es 1 y R es una cadena lateral neutra seleccionada entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en que dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada cuatro átomos de carbono; y
- 40
- (c) cada subunidad Z representa independientemente un aminoácido seleccionado entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicocola, histidina, lisina, metionina, serina y treonina.
- 45
16. El producto de conjugación de la Reivindicación 15, en que dicho péptido rico en arginina incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 16, 17 y 18.
- 50
17. El producto de conjugación de cualquiera de las Reivindicaciones 11, 12, 13, 15 y 16, en que dicho compuesto análogo oligonucleotídico es un oligómero de morfolino compuesto de subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo entre el nitrógeno del morfolino de una subunidad y un carbono exocíclico en la po-

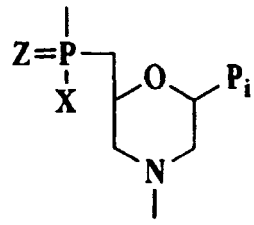
sición 3 del morfolino de una subunidad adyacente.

18. El producto de conjugación de la Reivindicación 17, en que dichas subunidades de morfolino están unidas por enlaces fosfordiamidato no cargados, de acuerdo con la estructura:

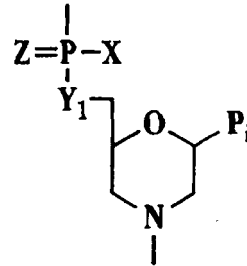


5 en que  $Y_1 = O$ ,  $Z = O$ ,  $P_j$  es un componente para apareamiento de bases de purina o pirimidina eficaz para unirse, mediante un enlace de hidrógeno específico de bases, con una base de un polinucleótido, y  $X$  es alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo o alquilamino.

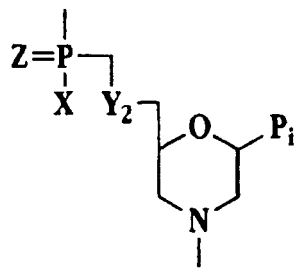
- 10 19. El producto de conjugación de cualquiera de las Reivindicaciones 11, 12, 13, 15, 16 y 17, en que el compuesto análogo oligonucleotídico sustancialmente no cargado comprende una cadena principal que comprende componentes de morfolino, metilfosfonato, fosfortioato, fosfodiéster o ácido nucleico peptídico.



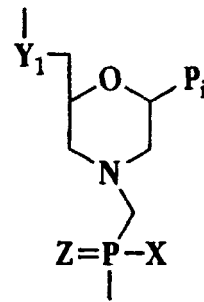
**Fig. 1A**



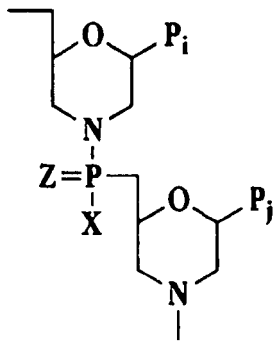
**Fig. 1B**



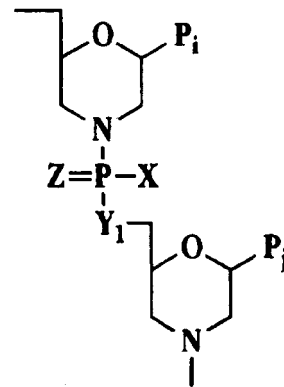
**Fig. 1C**



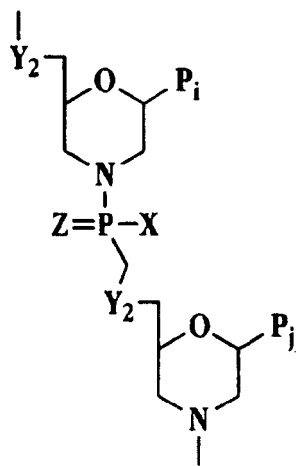
**Fig. 1D**



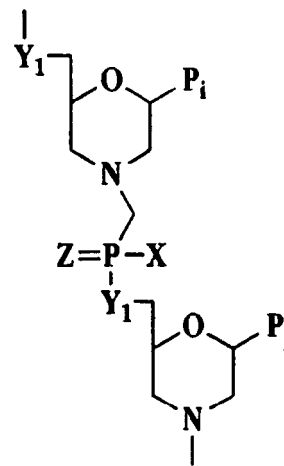
**Fig. 2A**



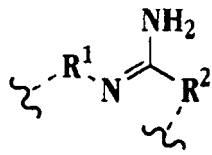
**Fig. 2B**



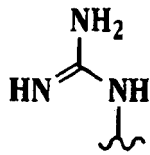
**Fig. 2C**



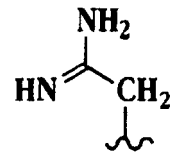
**Fig. 2D**



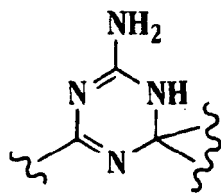
**Fig. 3A**



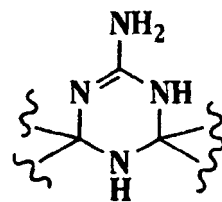
**Fig. 3B**



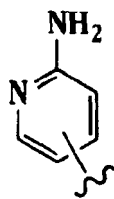
**Fig. 3C**



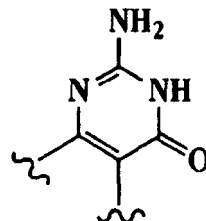
**Fig. 3D**



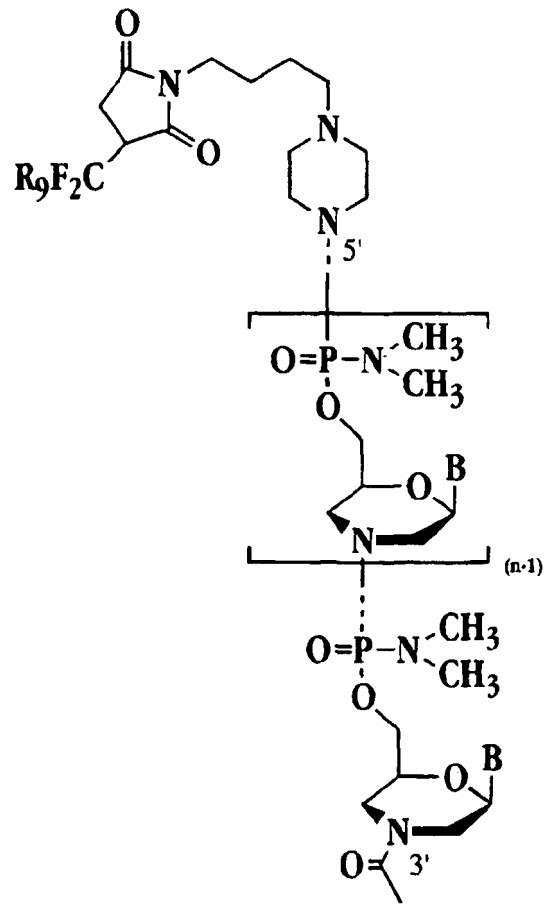
**Fig. 3E**



**Fig. 3F**

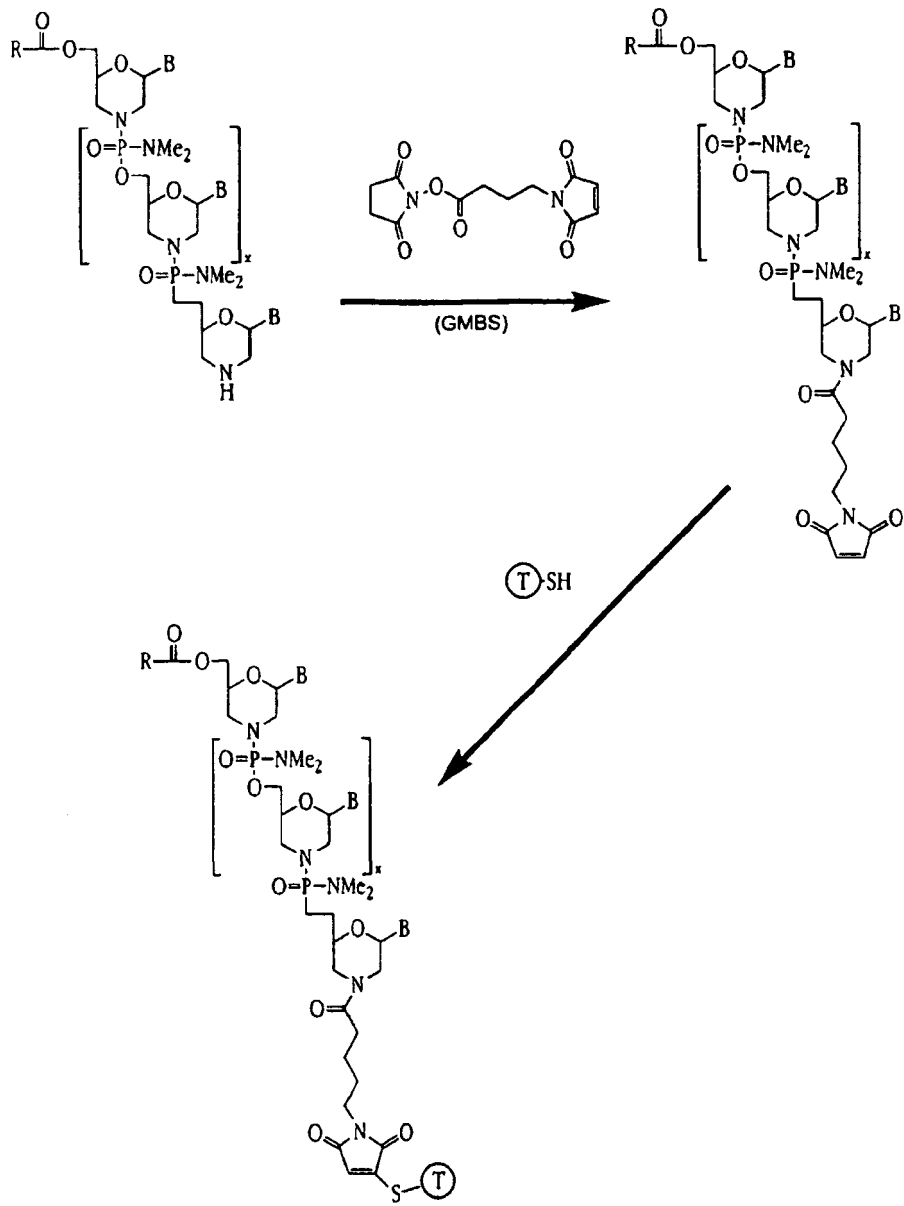


**Fig. 3G**

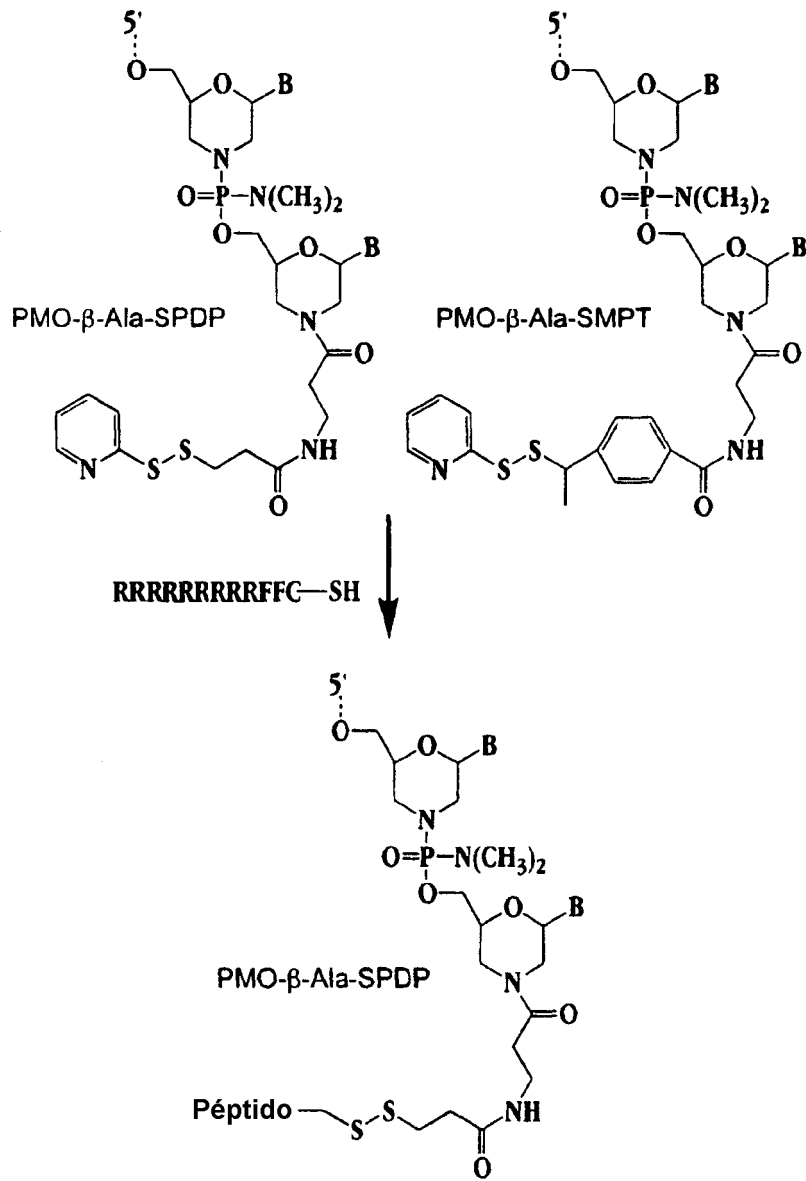


**Fig. 4A**

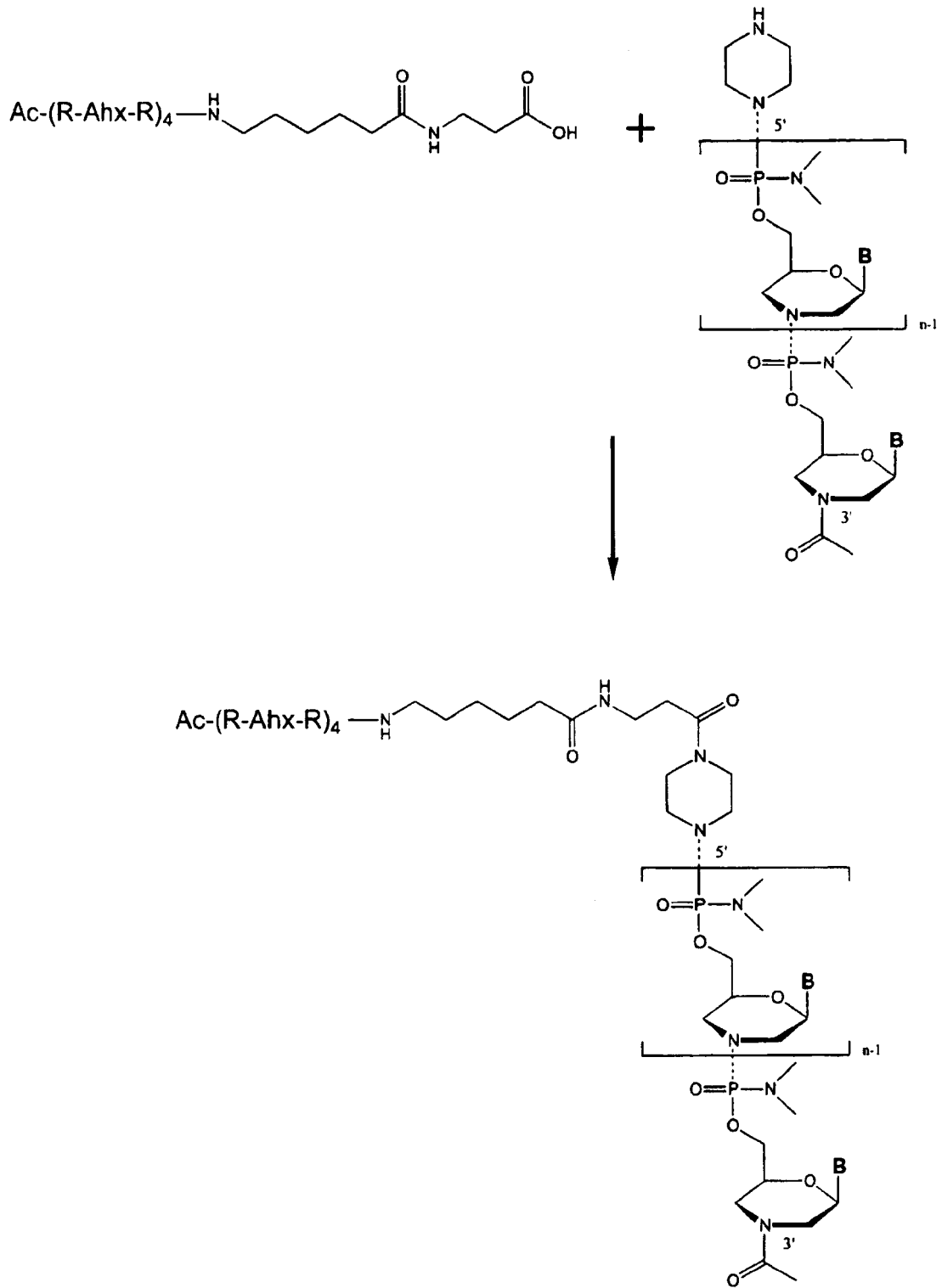




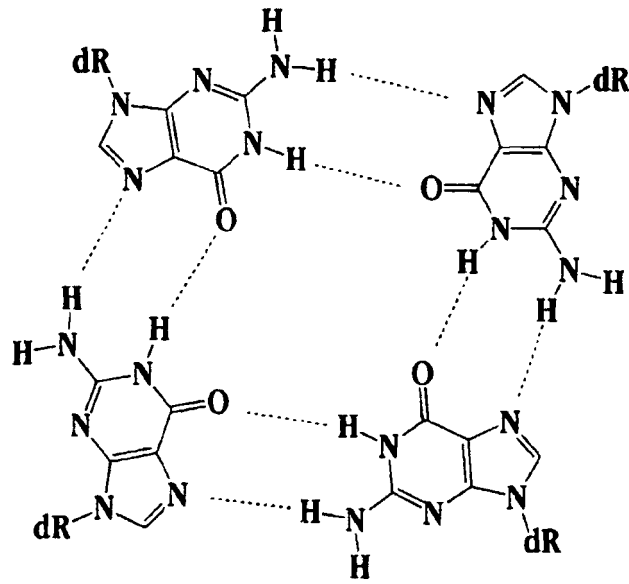
**Fig. 4B**



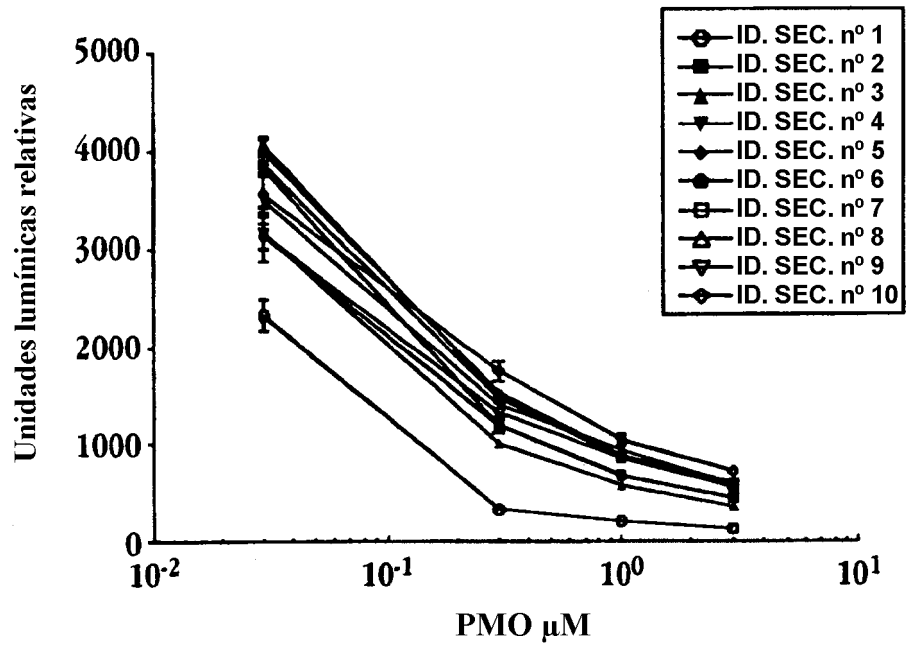
**Fig. 4C**



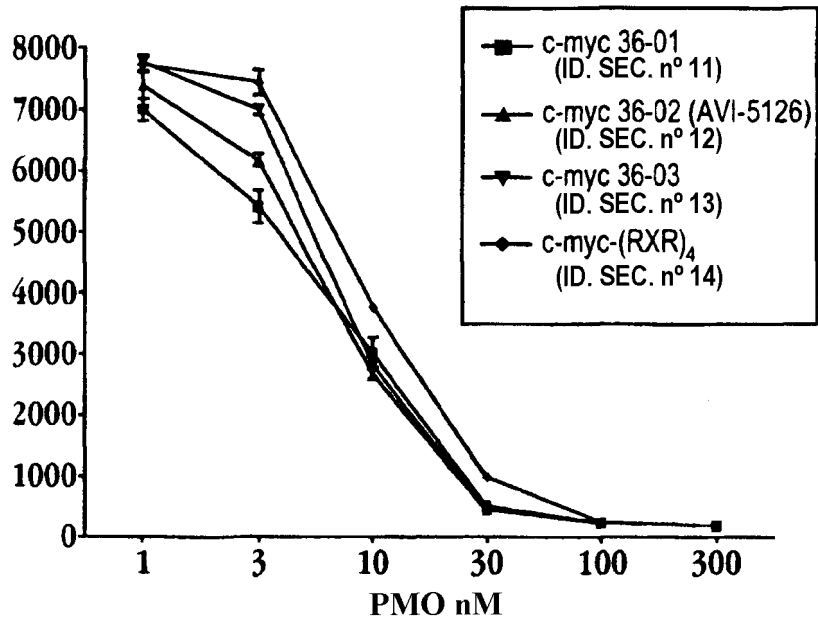
**Fig. 4D**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**