

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 921**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2004 E 10174646 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2351844**

54 Título: **Composiciones para potenciar el transporte y la eficacia antisentido de análogos de ácidos nucleicos en células**

30 Prioridad:

29.04.2003 US 466703 P

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

01.10.2014

73 Titular/es:

**SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
3450 Monte Villa Parkway, Suite 101
Bothell, Washington 98021, US**

72 Inventor/es:

**IVERSEN, PATRICK L.;
MOULTON, HONG M.;
NELSON, MICHELLE H.;
KROEKER, ANDREW D. y
STEIN, DAVID A.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 500 921 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

Composiciones para potenciar el transporte y la eficacia antisentido de análogos de ácidos nucleicos en células

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones y métodos para potenciar el suministro de moléculas, por ejemplo, agentes biológicos, a células, y en particular al suministro intracelular y la unión potenciada de análogos de ácido nucleico sustancialmente sin carga, particularmente oligómeros de morfolino con enlaces fosforodiamidato.

Referencias

- Arora, V. y P. L. Iversen (2000). "Antisense oligonucleotides targeted to the p53 gene modulate liver regeneration *in vivo*". *Drug Metab. Dispos.* 28 (2): 131-8.
- 10 Astriab Fisher, A., D. Sergueev *et al.* (2002). "Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions". *Pharm. Res.* 19 (6): 744-54.
- Astriab-Fisher, A., D. S. Sergueev *et al.* (2000). "Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates". *Biochem. Pharmacol.* 60 (1): 83-90.
- 15 Devi, G. R. (2002). "Prostate cancer: status of current treatments and emerging antisense-based therapies". *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4 (2): 138-48.
- Devi, G. R., J. R. Oldenkamp *et al.* (2002). "Inhibition of human chorionic gonadotropin beta-subunit modulates the mitogenic effect of c-myc in human prostate cancer cells". *Prostate* 53 (3): 200-10.
- 20 Heasman, J., M. Kofron *et al.* (2000). "Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach". *Dev. Biol.* 222 (1): 124-34.
- 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.
- Iversen, P. L. (2001). *Phosphoramidite Morpholino Oligomers*. Antisense Drug Technology. S. T. Crooke, New York, Marcel Dekker, Inc.
- 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.
- Khromykh, A. A., N. Kondratieva *et al.* (2003). "Significance in replication of the terminal nucleotides of the flavivirus genome". *J. Virol.* 77 (19): 10.623-9.
- 30 Kipshidze, N., E. Keane *et al.* (2001). "Local delivery of c-myc neutrally charged antisense oligonucleotides with transport catheter inhibits myointimal hyperplasia and positively affects vascular remodeling in the rabbit balloon injury model". *Catheter Cardiovasc. Interv.* 54 (2): 247-56.
- Kipshidze, N. N., H. S. Kim *et al.* (2002). "Intramural coronary delivery of advanced antisense oligonucleotides reduces neointimal formation in the porcine stent restenosis model". *J. Am. Coll. Cardiol.* 39 (10): 1686-91.
- 35 McCaffrey, A. P., L. Meuse *et al.* (2003). "A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice". *Hepatology* 38 (2): 503-8.
- Moulton, H. M., M. C. Hase *et al.* (2003). "HIV Tat peptide enhances cellular delivery of antisense morpholino oligomers". *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13 (1): 31-43.
- Moulton, H. M., M. H. Nelson *et al.* (2004). "Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides". *Bioconjug. Chem.* 15 (2): 290-9.
- 40 Nasevicius, A. y S. C. Ekker (2000). "Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish". *Nat. Genet.* 26 (2): 216-20.
- Qin, G., M. Taylor *et al.* (2000). "*In vivo* evaluation of a morpholino antisense oligomer directed against tumor necrosis factor-alpha". *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10 (1): 11-6.
- 45 Richard, J. P., K. Melikov *et al.* (2003). "Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake". *J. Biol. Chem.* 278 (1): 585-90.
- Ricker, J. L., J. E. Mata *et al.* (2002). "c-myc Antisense oligonucleotide treatment ameliorates murine ARPKD".

Kidney Int. 61 Suppl. 1: 125-131.

Rothbard, J. B., E. Kreider *et al.* (2002). "Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake". *J. Med. Chem.* 45 (17): 3612-8.

5 Stein, D., E. Foster *et al.* (1997). "A specificity comparison of four antisense types: morpholino, 2'-O-methyl RNA, DNA, and phosphorothioate DNA". *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7 (3): 151-7.

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.

10 Tisne, C., B. P. Roques *et al.* (2004). "The annealing mechanism of HIV-1 reverse transcription primer onto the viral genome". *J. Biol. Chem.* 279 (5): 3588-3595.

Wender, P. A., D. J. Mitchell *et al.* (2000). "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (24): 13.003-8.

15 Yoo, H., P. Sazani *et al.* (1999). "PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides". *Pharm. Res.* 16 (12): 1799-804.

Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction". *Nucleic Acids Res.* 31 (13): 3406-15.

Antecedentes de la Invención

20 La utilidad práctica de muchos fármacos con actividad biológica potencialmente útil se ve a menudo bloqueada por la dificultad de suministro de tales fármacos a sus dianas. Los compuestos que se han de suministrar a las células deben generalmente suministrarse desde un entorno extracelular en su mayor parte acuoso y penetrar seguidamente en una membrana celular lipofílica para poder entrar en la célula. A menos que la sustancia sea transportada activamente mediante un mecanismo de transporte específico, muchas moléculas, particularmente moléculas grandes, son muy lipofílicas para solubilizarse en la práctica o son demasiado hidrófilas para penetrar en la membrana.

25 Un segmento de la proteína Tat del HIV que consiste en los restos de aminoácido 49-57 (Tat 49-57, que tiene la secuencia RKKRRQRRR) se ha utilizado para suministrar péptidos y proteínas biológicamente activos a células (por ejemplo, Barsoum *et al.*, 1994, Publicación PCT nº WO 94/04686). Se ha utilizado Tat (49-60) para potenciar el suministro de oligonucleótidos de fosforotioato (Astriab-Fisher, Sergueev *et al.* 2000; Astriab-Fisher, Sergueev *et al.* 2002). Se ha publicado que la Tat inversa, o rTat (57-49) (RRRQRRKKR), suministra fluoresceína a las células con una eficacia potenciada en comparación con Tat (49-57) (Wender, Mitchell *et al.* 2000; Rothbard, Kreider *et al.* 2002). Rothbard y Wender han descrito también otros polímeros de transporte ricos en arginina (Publicación PCT nº WO 01/62297; Patente de EE.UU. nº 6,306,993; Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2003/0032593).

35 Los oligonucleótidos son una clase de compuestos farmacológicos potencialmente útiles cuyo suministro ha sido con frecuencia un impedimento para su uso terapéutico. Se ha descubierto que los oligómeros de morfolino con enlaces fosfordiamidato (PMOs, del inglés "phosphordiamidate-linked morpholino oligomers"; véase, por ejemplo, Summerton y Weller, 1997) son más prometedores a este respecto que los análogos de oligonucleótidos con carga tales como los fosforotioatos. Los PMOs son moléculas antisentido solubles en agua, sin carga o sustancialmente sin carga, que inhiben la expresión génica impidiendo la unión o progresión de los componentes de la maquinaria de corte y empalme o traslacional. También se ha demostrado que los PMOs inhiben o bloquean la replicación viral (Stein, Skilling *et al.* 2001; McCaffrey, Meuse *et al.* 2003). Son muy resistentes a la digestión enzimática (Hudziak, Barofsky *et al.* 1996). Los PMOs han demostrado tener una especificidad y una eficacia antisentido elevadas *in vitro* en modelos libres de células y de cultivo celular (Stein, Foster *et al.* 1997; Summerton y Weller, 1997), e *in vivo* en embriones de pez cebra, rana y erizo de mar (Heasman, Kofron *et al.* 2000; Nasevicius y Ekker, 2000), así como en modelos de animales adultos, tales como ratas, ratones, conejos, perros y cerdos (véanse, por ejemplo, Arora e Iversen 2000; Qin, Taylor *et al.* 2000; Iversen 2001; Kipshidze, Keane *et al.* 2001; Devi 2002; Devi, Oldenkamp *et al.* 2002; Kipshidze, Kim *et al.* 2002; Ricker, Mata *et al.* 2002).

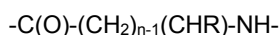
50 Se ha demostrado que los oligómeros PMO antisentido se incorporan a las células y son más consistentemente eficaces *in vivo*, con menos efectos inespecíficos, que otros oligonucleótidos antisentido generalmente utilizados (véase, por ejemplo, P. Iversen, "Phosphoramidite Morpholino Oligomers", en *Antisense Drug Technology*, redactado por S. T. Crooke, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001). Sin embargo, sería deseable una potenciación adicional de su incorporación y eficacia antisentido para poder explorar completamente su potencial.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico que comprende un péptido covalentemente unido a un análogo de ácido nucleico. El análogo de ácido nucleico comprende una cadena principal sustancialmente no cargada y una secuencia de bases de direccionamiento, y el péptido consiste en de
 5 subunidades Z opcionales. Más del 50% de la subunidades son subunidades X. Cada subunidad X es independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo el análogo de arginina un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R^1 es H o R, y R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde R es alquilo inferior o alqueniilo inferior y comprende opcionalmente oxígeno o nitrógeno, o R^1 y R^2 pueden formar conjuntamente un anillo; y en donde la cadena lateral está unida al aminoácido a través de R^1 o R^2 . Las al menos
 10 dos subunidades Y comprenden dos subunidades de α -aminoácido hidrófobo neutro que comprenden una cadena lateral de alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo o aralquilo sustituida o no sustituida en donde la cadena lateral de alquilo, alqueniilo o alquinilo incluye a lo sumo un heteroátomo por cada seis átomos de carbono, y en donde las subunidades Y son contiguas o están flanqueando un componente conector. Cada subunidad Z representa independientemente una subunidad de aminoácido seleccionada de entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina,
 15 glicina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina.

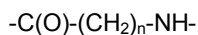
El péptido está opcionalmente unido al análogo de ácido nucleico a través de un conector seleccionado de entre:

- (i) una subunidad de cisteína;
- (ii) un componente conector no aminoácido sin carga;
- (iii) un α -aminoácido hidrófobo neutro que comprende una cadena lateral de alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo o aralquilo sustituida o no sustituida, en donde la cadena lateral de alquilo, alqueniilo o alquinilo incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos átomos de carbono; y
- (iv) un aminoácido hidrófobo neutro que tiene la estructura siguiente:



en donde n es de 2 a 7 y R es H o metilo.

En una realización del conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico, el péptido está unido al análogo de ácido nucleico a través de un conector que comprende uno o más aminoácidos artificiales que tienen la estructura siguiente:



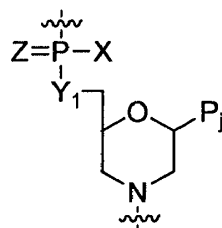
en donde n es de 2 a 7.

En una realización, el conector comprende una subunidad de β -alanina, una subunidad de ácido 6-aminohexanoico o combinaciones de las mismas. En una realización del conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico, cada subunidad Y es fenilalanina. En una realización, cada subunidad X es arginina.

En una realización del péptido-análogo de ácido nucleico, el péptido tiene la secuencia identificada como ID. SEC. nº 13 o ID. SEC. nº 20.

En una realización, el análogo de ácido nucleico es un oligómero de morfolino, que comprende subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo entre el nitrógeno morfolínico de una subunidad y un carbono exocíclico de la posición morfolínica 3 de una subunidad adyacente. En una realización, el péptido está unido al extremo 5' o al extremo 3' del análogo de ácido nucleico.

En una realización del péptido-análogo de ácido nucleico, las subunidades de morfolino están unidas por enlaces que contienen fósforo de acuerdo con la estructura:



En esta fórmula, Y_1 es O; Z es O; X es alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo o alquilamino; y P_j es un componente de purina o pirimidina que forma pares de bases, eficaz para unirse a una base de un polinucleótido mediante enlace de hidrógeno específico de bases. X es dimetilamino en una realización.

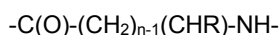
En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico comprende un péptido covalentemente unido a un análogo de ácido nucleico. El análogo de ácido nucleico comprende una cadena principal sustancialmente no cargada y una secuencia de bases de direccionamiento, y el péptido comprende la secuencia identificada como ID. SEC. n° 12, 13 o 20, en donde el péptido está opcionalmente unido al análogo de ácido nucleico a través de un conector seleccionado de entre:

(i) una subunidad de cisteína;

(ii) un componente conector no aminoácido sin carga;

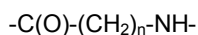
(iii) un α -aminoácido hidrófobo neutro que comprende una cadena lateral de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo sustituida o no sustituida, en donde la cadena lateral de alquilo, alquenilo o alquinilo incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos átomos de carbono; y

(iv) un aminoácido hidrófobo neutro que tiene la estructura siguiente:



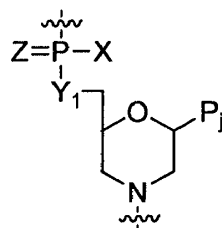
en donde n es de 2 a 7 y R es H o metilo.

En una realización, el péptido está unido al análogo de ácido nucleico a través de un conector que comprende uno o más aminoácidos artificiales que tienen la estructura siguiente:



en donde n es de 2 a 7.

En una realización del péptido-análogo de ácido nucleico, el análogo de ácido nucleico comprende un análogo de ácido nucleico morfolínico. El análogo de ácido nucleico morfolínico comprende subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo, enlaces que contienen fósforo que unen el nitrógeno morfolínico de una subunidad de morfolino con un carbono exocíclico de la posición morfolínica 3 de una subunidad de morfolino adyacente. En una realización, las subunidades de morfolino están unidas por enlaces que contienen fósforo de acuerdo con la estructura:



En esta fórmula, Y_1 es O; Z es O; X es alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo o alquilamino; y P_j es un componente de purina o pirimidina que forma pares de bases, eficaz para unirse a una base de un polinucleótido mediante enlace de hidrógeno específico de bases.

También se describe en esta memoria un método para potenciar la capacidad de un análogo de ácido nucleico, que tiene una cadena principal sustancialmente no cargada y una secuencia de bases de direccionamiento, para unirse a una secuencia diana de un ácido nucleico, método que comprende conjugar al análogo de ácido nucleico un péptido que consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y y subunidades Z opcionales, que incluye al menos seis, y preferiblemente al menos ocho, subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, donde > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y donde

(a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde 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 ;

(b) cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro $-C(O)=(CHR)_n-NH-$, donde (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 de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos, preferiblemente cada cuatro, y más preferiblemente cada seis, átomos de carbono; y

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

5 Preferiblemente, el péptido anteriormente descrito, cuando está conjugado con un oligómero antisentido que tiene dicha cadena principal sustancialmente no cargada (es decir, el mismo tipo de cadena principal que el análogo de ácido nucleico), es eficaz para potenciar la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana con respecto al oligómero antisentido en forma no conjugada, según se evidencia por:

(i) una disminución de la expresión de una proteína codificada, con respecto a la observada con el oligómero no conjugado, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un codón de inicio de la traducción para la proteína codificada, o

10 (ii) un aumento de la expresión de una proteína codificada, con respecto a la observada con el oligómero no conjugado, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un sitio de corte y empalme aberrante en un pre-mRNA que codifica dicha proteína cuando es correctamente cortado y empalmado.

15 Más adelante se describen ensayos adecuados para la medición de estos efectos. En una realización, la conjugación del péptido proporciona esta actividad en un ensayo de traducción exento de células, como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, la actividad se ve potenciada por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez. En algunas realizaciones, la actividad puede verse potenciada por factores de 50, 100 o más.

20 Alternativamente o además, el péptido es eficaz para potenciar el transporte del análogo de ácido nucleico en una célula con respecto al análogo en forma no conjugada. Preferiblemente, el transporte se ve potenciado por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez. En algunas realizaciones, la incorporación puede verse potenciada por factores de 50, 100 o más.

En los conjugados, el análogo de ácido nucleico puede conjugarse con el péptido a través de una subunidad Y, una subunidad de cisteína, o un componente conector no aminoácido sin carga, como se describe más adelante.

25 Las subunidades Z opcionales, cuando están presentes, son preferiblemente seleccionadas de entre alanina, glicina, metionina, serina y treonina. El péptido puede incluir cero, una, dos o tres subunidades Z.

30 Preferiblemente, para cada subunidad X, el componente de cadena lateral es independientemente seleccionado del grupo que consiste en guanidilo [HN=C(NH₂)NH-], amidinilo [HN=C(NH₂)C<], 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo. Más preferiblemente, para cada X, el componente de cadena lateral es guanidilo, tal como en una subunidad de arginina.

Preferiblemente, cuando Y se define como una subunidad de aminoácido neutro -C(O)-(CHR)_n-NH-, donde n es de 2 a 7, la subunidad tiene la forma -C(O)-(CH₂)_{n-1}(CHR)-NH-, donde R es H o metilo y es preferiblemente H.

En otras realizaciones preferidas, las al menos dos subunidades Y incluyen

35 (i) dos subunidades de α-aminoácido hidrófobo neutro que tienen cadenas laterales independientemente seleccionadas de entre alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral, cuando es seleccionada de entre alquilo, alqueno y alquino sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada seis átomos de carbono, y en donde dichas subunidades son contiguas o están flanqueando un componente conector, o

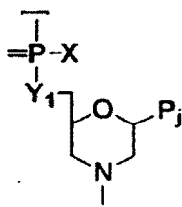
40 (ii) dos subunidades de aminoácido hidrófobo neutro -C(O)-(CH₂)_{n-1}(CHR)-NH-, donde n es de 2 a 7 y R es H o metilo y es preferiblemente H.

45 En realizaciones seleccionadas, el péptido tiene exactamente dos subunidades Y de tipo (i), que son contiguas o están flanqueando una subunidad de cisteína que actúa como un conector. Preferiblemente, las dos subunidades Y son contiguas. En esta realizaciones, cada Y representa preferiblemente una subunidad de α-aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de arilo o aralquilo, tal como, por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina o valina. En realizaciones seleccionadas del péptido, cada Y es independientemente seleccionado de entre fenilalanina y tirosina. Una de dichas realizaciones es un péptido que tiene la fórmula Arg₉Phe₂. Dicho péptido puede estar unido al análogo de ácido nucleico a través de una subunidad de cisteína unida a la Phe terminal.

50 En otras realizaciones, cada Y es una subunidad de aminoácido hidrófobo neutro -CO-(CH₂)_n-CHR-NH-, donde n es de 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, abreviada Ahx en esta memoria. En realizaciones seleccionadas de este grupo, cada X comprende un componente de cadena lateral de guanidilo, como en una subunidad de arginina. Los péptidos preferidos de este tipo incluyen aquellos que comprenden dímeros de arginina alternando con subunidades Y individuales, donde Y es preferiblemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula (RYR)₄ o la fórmula (RRY)₄, donde Y es preferiblemente Ahx. En el

segundo caso, el análogo de ácido nucleico está preferiblemente unido a una subunidad Y terminal.

El análogo de ácido nucleico con el que se conjuga el péptido, que tiene una cadena principal sustancialmente no cargada, es preferiblemente un oligómero de morfolino o un ácido nucleico peptídico. Preferiblemente, la cadena principal del oligómero está completamente sin carga. En realizaciones preferidas, el análogo de ácido nucleico es un oligómero de morfolino que comprende subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo, con una longitud de uno a tres átomos, entre el nitrógeno morfolínico de una subunidad y un carbono exocíclico de la posición morfolínica 3 de una subunidad adyacente. Las uniones son preferiblemente enlaces de tipo fosfordiamidato de dos átomos sin carga, de acuerdo con la estructura:



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

La conjugación de un péptido con un análogo de ácido nucleico como el anteriormente descrito forma un conjugado de péptido-oligómero que es más eficaz que el oligómero no conjugado en varias funciones, incluyendo: inhibir la expresión de mRNA diana en un sistema de expresión proteica; inhibir el corte y empalme de pre-mRNA diana; e inhibir la replicación de un virus, dirigiéndose a elementos que actúan en cis y controlan la replicación de ácido nucleico o la transcripción de mRNA del virus.

También se describe una realización del conjugado anteriormente descrito que incluye un péptido que, cuando se conjuga con un oligómero antisentido que tiene el mismo tipo de cadena principal sustancialmente no cargada que el análogo de ácido nucleico, es eficaz para potenciar la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana con relación al oligómero antisentido en forma no conjugada, según se pone de manifiesto por:

- (i) una disminución de la expresión de una proteína codificada, con relación a la observada con el oligómero no conjugado, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un codón de iniciación de la traducción para la proteína codificada, o
- (ii) un aumento de la expresión de una proteína codificada, con relación a la observada con el oligómero no conjugado, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un sitio aberrante de corte y empalme en un pre-mRNA que codifica dicha proteína cuando se corta y empalma correctamente.

Más adelante se describen ensayos adecuados para la medición de estos efectos. En una realización, la conjugación del péptido proporciona esta actividad en un ensayo de traducción exento de células, como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, la actividad se ve potenciada por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez. En algunas realizaciones, la actividad puede verse potenciada por factores de 50, 100 o más.

Alternativamente o además, el péptido es eficaz para potenciar el transporte del análogo de ácido nucleico en una célula con respecto al análogo en forma no conjugada. Preferiblemente, el transporte se ve potenciado por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez. En algunas realizaciones, la actividad puede verse potenciada por factores de 50, 100 o más.

En los conjugados descritos en esta memoria, el análogo de ácido nucleico se conjuga preferiblemente con el péptido a través de un componente conector que se selecciona entre una subunidad Y, una subunidad de cisteína, y un componente conector no aminoácido sin carga.

Preferiblemente, los componentes de cadena lateral de las subunidades X son independientemente seleccionados del grupo que consiste en guanidilo $[HN=C(NH_2)NH-]$, amidinilo $[HN=C(NH_2)C<]$, 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo. Más preferiblemente, cada componente de cadena lateral es guanidilo; por ejemplo, cada X puede ser una subunidad de arginina.

Las subunidades Z opcionales, cuando están presentes, son preferiblemente seleccionadas de entre alanina, glicina, metionina, serina y treonina. El péptido puede incluir cero, una, dos o tres subunidades Z e incluye preferiblemente a lo sumo una subunidad Z.

En realizaciones seleccionadas, el péptido tiene exactamente dos subunidades Y de tipo (i) que son contiguas o están flanqueando una subunidad de cisteína. Preferiblemente, las dos subunidades Y son contiguas.

5 En otras realizaciones preferidas, cada Y representa una subunidad de α -aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de arilo o aralquilo; por ejemplo, cada Y puede ser independientemente seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina y valina.

10 En realizaciones seleccionadas, cada Y es independientemente seleccionado de entre fenilalanina y tirosina; en otras realizaciones, cada Y es fenilalanina. Esto incluye, por ejemplo, conjugados que consisten en subunidades de arginina, subunidades de fenilalanina, un componente conector y el análogo de ácido nucleico. Uno de dichos conjugados incluye un péptido que tiene la fórmula Arg_9Phe_2 . El componente conector puede ser, por ejemplo, una subunidad de cisteína unida a la Phe terminal.

15 En otras realizaciones, cada Y es una subunidad de aminoácido hidrófobo neutro $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_{n-1}(\text{CHR})-\text{NH}-$, donde n es de 2 a 7 y R es H. En una de dichas realizaciones, n es 5, por lo que Y es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico. En realizaciones seleccionadas de esta clase, cada X tiene una cadena lateral de guanidilo, por ejemplo, como en subunidades de arginina. Estos incluyen conjugados en que el péptido comprende dímeros de arginina alternando con subunidades Y individuales. Los ejemplos de dichos péptidos son el péptido que tiene la fórmula $(\text{RYR})_4$ y el péptido que tiene la fórmula $(\text{RRY})_4$. En el segundo caso, el análogo de ácido nucleico está preferiblemente unido a una subunidad Y terminal.

20 El análogo de ácido nucleico con el que se conjuga el péptido, que tiene una cadena principal sustancialmente no cargada, es preferiblemente un oligómero de morfolino, como se describió anteriormente, o un ácido nucleico peptídico.

25 Los conjugados de péptido-oligómero descritos en esta memoria son más eficaces que el oligómero no conjugado en diversas funciones, incluyendo: inhibir la expresión de mRNA diana en un sistema de expresión proteica, incluyendo sistemas de traducción exentos de células; inhibir el corte y empalme de pre-mRNA diana; e inhibir la replicación de un virus, dirigiéndose a elementos que actúan en cis y controlan la replicación de ácido nucleico o la transcripción de mRNA del virus. Preferiblemente, la actividad se ve potenciada por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez.

30 Alternativamente o además, el péptido es eficaz para potenciar el transporte del análogo de ácido nucleico en una célula con respecto al análogo en forma no conjugada. Preferiblemente, el transporte se ve potenciado por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez.

35 También se describe un conjugado que comprende un agente farmacológico covalentemente unido a un péptido, en donde el péptido consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, incluyendo al menos seis, y preferiblemente al menos ocho, subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en donde > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y donde

40 (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $\text{R}^1\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{R}^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde 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 ;

45 (b) cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro $-\text{C}(\text{O})-(\text{CHR})-\text{NH}-$, donde R es una cadena lateral neutra seleccionada de entre alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada de entre alquilo, alqueno y alquino sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos, preferiblemente cada cuatro, y más preferiblemente cada seis, átomos de carbono; y

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

50 El péptido es eficaz para potenciar el transporte del agente en una célula con respecto al agente en forma no conjugada. El agente se puede conjugar con el péptido a través de una subunidad Y, una subunidad de cisteína, o un componente conector no aminoácido sin carga.

Las subunidades Z opcionales, cuando están presentes, son preferiblemente seleccionadas de entre alanina, glicina, metionina, serina y treonina. El péptido puede incluir cero, una, dos o tres subunidades Z e incluye preferiblemente a lo sumo una subunidad Z.

En realizaciones seleccionadas de X, el componente de cadena lateral es independientemente seleccionado del

grupo que consiste en guanidilo [HN=C(NH₂)NH-], amidinilo [HN=C(NH₂)C<], 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo. Preferiblemente, para cada X, el componente de cadena lateral es guanidilo; más preferiblemente, cada X es una subunidad de arginina.

5 En realizaciones seleccionadas de Y, las al menos dos subunidades Y incluyen dos subunidades de α -aminoácido hidrófobo neutro que tienen cadenas laterales independientemente seleccionadas de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada seis átomos de carbono, y en donde dichas subunidades son contiguas o están flanqueando un componente conector. Preferiblemente, el péptido tiene exactamente dos subunidades Y que son contiguas o están flanqueando una subunidad de cisteína que actúa como un componente conector; más preferiblemente, las subunidades Y son contiguas.

10 En otras realizaciones preferidas, cada Y representa una subunidad de α -aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de arilo o aralquilo; por ejemplo, cada Y puede ser independientemente seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina y valina. En realizaciones seleccionadas, cada Y es independientemente seleccionado de entre fenilalanina y tirosina; en otras realizaciones, cada Y es fenilalanina. Esto incluye, por ejemplo, conjugados que consisten en subunidades de arginina, subunidades de fenilalanina, un componente conector y el análogo de ácido nucleico. Uno de dichos conjugados incluye un péptido que tiene la fórmula Arg₉Phe₂. El componente conector puede ser, por ejemplo, una subunidad de cisteína unida a la Phe terminal.

15 Se describe además un método para potenciar la incorporación celular de un agente farmacológico, método que comprende conjugar el agente con un péptido de transporte como el anteriormente descrito; es decir, donde el péptido consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, incluyendo al menos seis, y preferiblemente al menos ocho, subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en donde > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y donde

25 (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura R¹N=C(NH₂)R², donde R¹ es H o R; R² es R, NH₂, NHR o NR₂, donde R es alquilo inferior o alquenilo inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno; R¹ y R² pueden formar conjuntamente un anillo; y la cadena lateral está unida a dicho aminoácido a través de R¹ o R²;

30 (b) cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro -C(O)-(CHR)-NH-, donde R es una cadena lateral neutra seleccionada de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos, preferiblemente cada cuatro, y más preferiblemente cada seis, átomos de carbono; y

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

40 Se describe además una composición útil para el suministro intracelular de un análogo de ácido nucleico *in vivo*, que comprende un conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico, como se describió anteriormente, y una suspensión de microburbujas que contienen gas insoluble en un vehículo acuoso que comprende al menos un compuesto filmógeno seleccionado de entre una proteína, un agente tensioactivo, un lípido, un polisacárido y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, las microburbujas se suspenden en un vehículo acuoso que comprende albúmina, y el gas insoluble se selecciona del grupo que consiste en perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropano, perfluorobutano, y perfluoropentano.

Se describe además un análogo de ácido nucleico modificado, que comprende

45 (i) una pluralidad de subunidades conectadas por enlaces intersubunitarios, y que soportan una secuencia de bases eficaz para hibridarse con un polinucleótido diana de secuencia complementaria, para formar un dúplex diana/antisentido; y

50 (ii) portado sobre al menos seis enlaces intersubunitarios contiguos, un componente cargado de estructura R¹N=C(NH₂)R², donde R¹ es H o R; R² es R, NH₂, NHR o NR₂, donde R es alquilo inferior o alquenilo inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno; R¹ y R² pueden formar conjuntamente un anillo; y el componente de cadena lateral está unido a dicha subunidad de aminoácido a través de R¹ o R².

Preferiblemente, el componente cargado se selecciona del grupo que consiste en guanidilo [-N=C(NH₂)NH-], amidinilo [-C(=NH)(NH₂)], 2-aminohexahidropirimidilo [=HN-CH(NH₂)NH-], 2-aminopiridinilo [-C(=N)(NH₂)] y 2-aminopirimidonilo [-HN-C(NH₂)=N-]. Más preferiblemente, el componente cargado es guanidilo. En una realización, las subunidades son subunidades de morfolino y los enlaces son enlaces de tipo fosfordiamidato.

55 Estos y otros objetos y características de la invención y la descripción resultarán más completamente evidentes

cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos que la acompañan.

Breve descripción de los dibujos

- Las Figuras 1A-1D muestran varias subunidades de tipo morfolino preferidas que tienen grupos conectores de 5 átomos (A), seis átomos (B) y siete átomos (C-D) adecuados para formar polímeros.
- 5 Las Figuras 2A-D muestran el segmento subunitario repetitivo de oligonucleótidos de morfolino ejemplares, construido usando las subunidades A-D, respectivamente, de la Figura 1.
- Las Figuras 3A-G muestran estructuras de cadenas laterales X ejemplares, para usar en varias realizaciones de los transportadores descritos en esta memoria.
- 10 Las Figuras 4A-D muestran conjugados de oligómero-transportador y métodos para su preparación, donde la Figura 4C muestra la preparación de un conjugado escindible *in vivo*.
- La Figura 5A muestra la adsorción de un conjugado de péptido-PMO marcado con fluoresceína (R₉F₂C-705-FL) con el tiempo, según se mide en células HeLa pLuc705 tratadas con 1 μM del conjugado.
- La Figura 5B muestra la absorción según aumenta la concentración, medida a 37 °C (□) y 17 °C (*), en células HeLa pLuc705 incubadas con R₉F₂C-705-FL durante 70 minutos.
- 15 La Figura 6 muestra la adsorción según aumenta la concentración en células HeLa pLuc705 incubadas con R₉F₂C-705-FL y con (D)-R₉F₂C-705-FL, sin tratamiento con tripsina (cuadrados y círculos rellenos, respectivamente), y con tratamiento con tripsina (cuadrados y círculos sin relleno, respectivamente).
- La Figura 7A muestra la internalización a lo largo del tiempo, según se determina por citometría de flujo en células incubadas con 1 μM de conjugado de péptido-PMO marcado con fluoresceína (R₉F₂C-705-FL) y tratadas luego con tripsina.
- 20 La Figura 7B muestra la internalización según aumenta la concentración, según se determina por citometría de flujo, en células tratadas con R₉F₂C-705-FL a 37 °C (□) o 17 °C (*) durante 70 minutos y tratadas luego con tripsina.
- La Figura 8 muestra el nivel de producción de luciferasa observado (expresado como RLU) en células HeLa pLuc705 tras 6 horas de incubación con 25 μM de cada una de las siguientes composiciones: los conjugados de PMO-transportador R₉F₂C-PMO; R₉C-PMO; rTat(57-49)-C-PMO; y rTat(57-49)-PMO; una mezcla de R₉F₂C y PMO; R₉F₂C solo; PMO solo; y tampón PBS. El PMO utilizado fue la secuencia 705 (ID. SEC. n° 1).
- La Figura 9 muestra la viabilidad de las células HeLa tras 24 horas de incubación con 25 μM de las composiciones relacionadas en la Figura 8.
- 30 La Figura 10 muestra el nivel de producción de luciferasa, normalizado a microgramo de proteína (RLU/μg de proteína), observado en células HeLa Luc705 tras 24 horas de incubación con los conjugados de PMO(705) con R₉F₂, R₉I₂, R₈F₃ y R₉F₄, respectivamente, donde en cada caso el PMO se unió a través de un resto de cisteína en el extremo C (lado derecho) del transportador peptídico tal como se muestra.
- La Figura 11 muestra (A) el nivel de producción de luciferasa (RLU/μg de proteína), como en la Figura 10, y (B) la fluorescencia en células HeLa pLuc705 tras 24 horas de incubación con conjugados de PMO(705) con R₉F₂, R₆F₂ y R₅F₂, donde en cada caso el PMO se unió a través de un resto de cisteína en el extremo C del transportador peptídico.
- 35 La Figura 12 muestra el nivel de producción de luciferasa (RLU/μg de proteína), como en la Figura 10, en células HeLa pLuc705 tras 24 horas de incubación con los conjugados de PMO con R₉F₂, R₅F₂R₄ y F₂R₉, respectivamente, donde en cada caso el PMO se unió a través de un resto de cisteína en el extremo C del transportador peptídico.
- 40 La Figura 13 muestra estructuras de agentes entrecruzantes bifuncionales que pueden usarse para enlazar polímeros transportadores a oligómeros antisentido.
- La Figura 14 muestra el nivel de producción de luciferasa (RLU/μg de proteína), como en la Figura 10, en células HeLa pLuc705 tras 24 horas de incubación con los conjugados R₉F₂-C-PMO y biotina-R₉F₂-C-PMO.
- 45 La Figura 15 muestra el nivel de producción de luciferasa (RLU/μg de proteína), como en la Figura 10, en células HeLa pLuc705 tras 24 horas de incubación con varios conjugados de PMO(705)-péptido de transporte, como se muestra en la Tabla 1 de la presente memoria, en una concentración de 25 μM, donde en cada caso el PMO está enlazado al resto C (cisteína).

La Figura 16 muestra la producción de luciferasa (RLU/ μ g de proteína) en células HeLa pLuc705 tratadas con conjugados de PMO(705) antisentido con péptidos transportadores de secuencias diferentes, en una concentración de 1 μ M (barras oscuras) o 5 μ M (barras claras) en medio libre de suero durante 6 horas, donde en cada caso el PMO está enlazado al resto C (cisteína).

5 La Figura 17 muestra la producción de luciferasa (RLU/ μ g de proteína) en células HeLa pLuc705 tratadas con R_9F_2 -C-PMO-705 (cuadrados rellenos) y los siguientes POMs de control que contenían dos o cuatro faltas de apareamiento, secuencias revueltas o irrelevantes: R_9F_2 -C-705_{2MM} (círculo relleno), R_9F_2 -C-705_{4MM} (\square), R_9F_2 -C-705_{SCR} (V) y R_9F_2 -C-cmyc (*).

10 La Figura 18 muestra la producción de luciferasa (RLU/ μ g de proteína) en células HeLa pLuc705 tratadas con R_9F_2 -C-PMO-705, medida en diferentes tiempos.

Las Figuras 19A-G muestran ejemplos de otros tipos de oligómeros antisentido sin carga que se pueden modificar para que contengan los péptidos de transporte que se describen en la presente memoria.

La Figura 20 muestra un método para preparar un PMO que tiene una cadena lateral intersubunitaria modificada que contiene componentes con carga catiónica.

15 Las Figuras 21-23 representan los resultados de la inhibición de la traducción libre de células por los conjugados de péptido-PMO dirigidos a secuencias virales situadas inmediatamente cadena arriba del gen informador de luciferasa de luciérnaga. La Figura 23 representa los resultados obtenidos con la construcción de gen informador pDCLD.

20 La Figura 24 muestra el nivel de producción de luciferasa observado (RLU por microgramo de proteína) en células HeLa pLuc/705 tras 24 horas de tratamiento con 10 μ M de cada una de las siguientes composiciones: el conjugado de PMO (705-FL) con R_9F_2 , (RRAhx)₄, (RAhxR)₄, (AhxRR)₄, (RAhxR)₃, (RAhxR)₂R, (RAhxR)₂, (RKAhx)₄ o (RHAhx)₄.

25 Las Figuras 25A-B y 26A-B muestran que un péptido de transporte que contiene ácido 6-aminohexanoico (Ahx), (RAhxR)₄, es resistente a la degradación por proteinasa K y que un péptido de transporte que contiene todos los aminoácidos naturales, R_9F_2 , no era resistente a la degradación por proteinasa K.

La Figura 27 muestra la biodisponibilidad *in vivo* y el suministro intracelular relativo de PMO marcado con fluoresceína, no conjugado y conjugado con péptido, en células de ganglio linfático y bazo de ratón y en subpoblaciones de células de esos tejidos.

30 La Figura 28 muestra los resultados de la inhibición de la traducción libre de células por conjugados de péptido-PMO dirigidos a una región del gen c-myc humano que rodea el codón de iniciación de la traducción, fusionada con el gen informador de luciferasa de luciérnaga.

La Figura 29 muestra la estructura secundaria predicha por ordenador del RNA que rodea el codón de iniciación de la traducción del virus del dengue y la diana del PMO antisentido DEN AUG (subrayados, nucleótidos 87-106). El codón de iniciación AUG está en los nucleótidos 97-99.

35 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

"Alquilo" se refiere a un radical monovalente completamente saturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser ramificado, lineal o cíclico (cicloalquilo). Son ejemplos de grupos alquilo el metilo, etilo, n-butilo, t-butilo, n-heptilo, isopropilo, ciclopropilo, ciclopentilo, etilciclopentilo y ciclohexilo. Se prefieren en general grupos alquilo que tienen de uno a seis átomos de carbono, a los que se hace referencia como "alquilo inferior", y ejemplificados por metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, isoamilo, n-pentilo e isopentilo. En una realización, alquilo inferior se refiere a alquilo C₁ a C₄.

40 "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. Se prefieren en general los grupos alquenilo que tienen de uno a seis átomos de carbono, a los que se hace referencia como "alquenilo inferior". En una realización, alquenilo inferior se refiere a alquenilo C₂ a C₄.

"Ariilo" se refiere a un radical aromático monovalente sustituido o no sustituido, que tiene generalmente un solo anillo (por ejemplo, benceno) o dos anillos condensados (por ejemplo, naftilo). Se prefieren en general los grupos ariilo que tienen un solo anillo. Preferiblemente, los anillos son anillos hidrocarbonados.

50 "Aralquilo" se refiere a un alquilo, preferiblemente un alquilo inferior (C₁-C₄, más preferiblemente C₁-C₂), sustituyente que está adicionalmente sustituido con un grupo ariilo; son ejemplos el bencilo (-CH₂C₆H₅) y el fenetilo (-CH₂CH₂C₆H₅).

5 El término "sustituido", con respecto a un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo o alcarilo en una cadena lateral neutra, se refiere a la sustitución de un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo inferior o un sustituyente neutro que contiene heteroátomo, tal como, por ejemplo, halógeno, por ejemplo, flúor, cloro o bromo; hidroxilo, alcoxilo, tiol, alquiltio, oxo (ceto), nitro, ciano, o diversos ésteres tales como ésteres carboxílicos, sulfónicos o fosfónicos. Preferiblemente, dicho sustituyentes son seleccionados de entre hidroxilo, alcoxilo inferior, tiol, alquiltio inferior y oxo (ceto).

10 Un análogo de ácido nucleico que tiene una cadena principal "sustancialmente sin carga" (al que también se hace referencia como "análogo de ácido nucleico sustancialmente sin carga") es uno que tiene a lo sumo un enlace intersubunitario con carga (a pH fisiológico) por cada cuatro enlaces sin carga (a pH fisiológico), preferiblemente a lo sumo uno por cada ocho, y más preferiblemente a lo sumo uno por cada dieciséis, enlaces sin carga. En una realización preferida, los análogos de ácido nucleico descritos en la presente memoria son completamente sin carga.

En general, los términos tales como "con carga", "sin carga" y "neutro" utilizados en la presente memoria se refieren al estado del grupo así descrito a pH fisiológico, esto es, a aproximadamente 7,4.

15 La "cadena principal" de dicho análogo se refiere a la estructura que soporta los componentes con apareamientos de bases; es decir, para un oligómero de morfolino, como se describe más adelante, la "cadena principal" incluye estructuras anulares de morfolino conectadas por enlaces que contienen fósforo.

Una "secuencia diana" se refiere a una secuencia complementaria o casi complementaria a la que se dirige un oligómero antisentido, en virtud de su secuencia de bases, y que es capaz de unirse de forma estable bajo condiciones fisiológicas de temperatura y pH.

20 La expresión "actividad antisentido", con referencia a oligómeros de bloqueo estérico, se refiere a la capacidad de un oligómero antisentido para unirse a su secuencia diana e inhibir la función de esa secuencia diana, o de secuencias muy adyacentes, tal como, por ejemplo, bloquear la traducción de un mRNA, bloquear elementos que actúan en cis en la replicación de RNA viral, o bloquear el corte y empalme precisos de pre-RNA.

I. Conjugados de compuesto-transportador

25 A. Conjugados peptídicos

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico, que comprende un análogo de ácido nucleico que tiene una cadena principal sustancialmente no cargada y una secuencia de bases de direccionamiento, y, covalentemente unido al análogo de ácido nucleico, un péptido que consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, que incluye al menos ocho subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, donde > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y donde

35 (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo una subunidad de α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$ (véase la Figura 3A), donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde 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 dicha subunidad de aminoácido a través de R^1 o R^2 ,

(b) dichas al menos dos subunidades Y incluyen

40 (i) dos subunidades de α -aminoácido neutro que tienen cadenas laterales independientemente seleccionadas de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos, preferiblemente cada cuatro, y más preferiblemente cada seis, átomos de carbono, y en donde dichas subunidades son contiguas o están flanqueando un componente conector, o

(ii) dos subunidades de aminoácido hidrófobo neutro $-C(O)-(CH_2)_{n-1}(CHR)-NH-$, donde n es de 2 a 7 y R es H o metilo; y

45 (c) Z representa una subunidad de aminoácido seleccionada de entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina.

Z puede incluir también aminoácidos que tienen cadenas laterales que son homólogos de cadenas laterales presentes en la naturaleza, de uno o dos carbonos, excluyendo cadenas laterales que están negativamente cargadas en un pH fisiológico (por ejemplo, cadenas laterales de carboxilato). Preferiblemente, las cadenas laterales son neutras. Son cadenas laterales más preferidas las cadenas laterales de aminoácidos presentes en la naturaleza. Las subunidades Z opcionales son preferiblemente seleccionadas de entre alanina, glicina, metionina, serina y treonina. El péptido puede incluir cero, una, dos o tres subunidades Z e incluye preferiblemente a lo sumo dos subunidades Z.

Preferiblemente, el conjugado incluye un péptido que, cuando está conjugado con un oligómero antisentido que tiene el mismo tipo de cadena principal sustancialmente no cargada que el análogo de ácido nucleico, es eficaz para potenciar la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana con respecto al oligómero antisentido en forma no conjugada, según se evidencia por:

- 5 (i) una disminución de la expresión de una proteína codificada, con respecto a la proporcionada por el oligómero no conjugado, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un codón de inicio de la traducción para la proteína codificada, o
- (ii) un aumento de la expresión de una proteína codificada, con respecto a la proporcionada por el oligómero no conjugado, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un sitio de corte y empalme aberrantes en un pre-mRNA que codifica dicha proteína cuando se corta y empalma correctamente.
- 10

Más adelante se describen ensayos adecuados para la medición de estos efectos. En una realización, la conjugación del péptido proporciona esta actividad en un ensayo de traducción exento de células, como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, la actividad se ve potenciada por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez.

15

Alternativamente o además, el péptido es eficaz para potenciar el transporte del análogo de ácido nucleico en una célula con respecto al análogo en forma no conjugada. Preferiblemente, el transporte se ve potenciado por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez.

- 20 En los conjugados de la invención, el análogo de ácido nucleico se conjuga preferiblemente con el péptido a través de un componente conector seleccionado de entre una subunidad Y, una subunidad de cisteína, y un componente conector no aminoácido sin carga.

Preferiblemente, los componentes de cadena lateral de las subunidades X son independientemente seleccionados del grupo que consiste en guanidilo [HN=C(NH₂)NH-], amidinilo [HN=C(NH₂)C<], 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 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).

25

- 30 En realizaciones seleccionadas, el péptido tiene exactamente dos subunidades Y de tipo (i), que son contiguas o están flanqueando una subunidad de cisteína. Preferiblemente, las dos subunidades Y son contiguas. Las cadenas laterales preferidas para la subunidades Y de tipo (i) incluyen cadenas naturales de aminoácidos presentes en la naturaleza y de homólogos de los mismos con uno o dos carbonos, excluyéndose las cadenas laterales que están cargadas en un pH fisiológico. Son cadenas laterales más preferidas las cadenas laterales de aminoácidos presentes en la naturaleza. En otras realizaciones preferidas, la cadena lateral es una cadena lateral de arilo o aralquilo; por ejemplo, cada Y puede ser independientemente seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina y valina.
- 35

En realizaciones seleccionadas, cada Y es independientemente seleccionado de entre fenilalanina y tirosina; en otras realizaciones, cada Y es fenilalanina. Esto incluye, por ejemplo, conjugados que consisten en subunidades de arginina, subunidades de fenilalanina, un componente conector y el análogo de ácido nucleico. Uno de dichos conjugados incluye un péptido que tiene la fórmula Arg₉Phe₂. El componente conector puede ser, por ejemplo, una subunidad de cisteína unida a la Phe terminal.

40

En otras realizaciones, cada Y es una subunidad de aminoácido hidrófobo neutro -C(O)-(CH₂)_{n-1}(CHR)-NH-, donde n es de 2 a 7 y R es H. En una de dichas realizaciones, n es 5, por lo que Y es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico (Ahx). En realizaciones seleccionadas de esta clase, cada X tiene una cadena lateral de guanidilo, por ejemplo, como en subunidades de arginina. Estos incluyen conjugados en que el péptido comprende dímeros de arginina alternando con subunidades Y individuales, donde Y es preferiblemente Ahx. Los ejemplos de dichos péptidos son el péptido que tiene la fórmula (RYR)₄ y el péptido que tiene la fórmula (RRY)₄, donde Y es preferiblemente Ahx. En el segundo caso, el análogo de ácido nucleico está preferiblemente unido a una subunidad Y terminal.

45

50

El análogo de ácido nucleico con el que se conjuga el péptido, que tiene una cadena principal sustancialmente no cargada, es preferiblemente un oligómero de morfolino, como se describe en esta memoria, o un ácido nucleico peptídico.

- Los conjugados de péptido-oligómero de la invención son más eficaces que el oligómero no conjugado en diversas funciones, incluyendo: inhibir la expresión de mRNA diana en un sistema de expresión proteica, incluyendo sistemas de traducción exentos de células; inhibir el corte y empalme de pre-mRNA diana; e inhibir la replicación de un virus,
- 55

dirigiéndose a elementos que actúan en cis y controlan la replicación de ácido nucleico o la transcripción de mRNA del virus. Preferiblemente, la actividad se ve potenciada por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez.

5 Alternativamente o además, el péptido es eficaz para potenciar el transporte del análogo de ácido nucleico en una célula con respecto al análogo en forma no conjugada. Preferiblemente, el transporte se ve potenciado por un factor de al menos dos, más preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez.

10 También se incluyen conjugados de otros agentes farmacológicos, no limitados a análogos de ácido nucleico, unidos a un transportador peptídico donde la subunidades Y son del tipo (i) anterior. Específicamente, el péptido consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, incluyendo al menos seis, y preferiblemente al menos ocho, subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en donde > 50% de dichas subunidades son subunidades X. Las subunidades X y Z son como se definieron anteriormente y cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro -C(O)-(CHR)-NH-, donde R es una cadena lateral neutra seleccionada de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo
15 sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos, preferiblemente cada cuatro, y más preferiblemente cada seis, átomos de carbono. El agente se puede conjugar con el péptido a través de una subunidad Y, una subunidad de cisteína o un componente conector no aminoácido sin carga.

20 El compuesto que se va a suministrar es preferiblemente un agente biológicamente activo, por ejemplo, un agente terapéutico o diagnóstico, aunque puede ser un compuesto empleado para la detección, tal como un compuesto fluorescente. Los agentes biológicamente activos incluyen sustancias farmacológicas seleccionadas de entre biomoléculas, por ejemplo, péptidos, proteínas, sacáridos o ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos antisentido, o compuestos orgánicos o inorgánicos de "molécula pequeña". Un compuesto de "molécula pequeña" puede ser definido en términos generales como un compuesto orgánico, inorgánico u organometálico que no es una biomolécula como la anteriormente descrita. Típicamente, tales compuestos tienen pesos moleculares inferiores a 1000 o, en una realización, inferiores a 500.
25

30 En una realización, el agente que se va a suministrar no incluye aminoácidos sueltos, dipéptidos ni tripéptidos. En otra realización, no incluye oligopéptidos cortos; es decir, oligopéptidos que tienen menos de seis subunidades de aminoácido. En otra realización, no incluye oligopéptidos más largos; es decir, oligopéptidos que tienen entre siete y 20 subunidades de aminoácido. En aún otra realización, no incluye polipéptidos que tengan más de 20 subunidades de aminoácido, ni proteínas.

35 El péptido de transporte es eficaz para potenciar el transporte del agente en una célula con respecto al agente en forma no conjugada y con respecto al agente conjugado con un péptido correspondiente que carece de las subunidades Y. Preferiblemente, el transporte se ve potenciado por un factor de al menos dos, preferiblemente por un factor de al menos cinco, y lo más preferiblemente por un factor de al menos diez.

B. Análogos de Ácido Nucleico

40 Los análogos de ácido nucleico incluidos en los conjugados de la invención son oligómeros sintéticos sustancialmente sin carga capaces de unirse con especificidad de base a una secuencia diana de un polinucleótido, por ejemplo, análogos de oligonucleótidos antisentido. Dichos análogos incluyen, por ejemplo, metilfosfonatos, ácidos nucleicos peptídicos, fosforamidatos N3'→P5' sustancialmente sin carga y oligómeros de morfolino.

45 Un análogo de ácido nucleico que tiene una cadena principal "sustancialmente sin carga" (al que también se hace referencia como un "análogo de ácido nucleico sustancialmente sin carga") es uno que tiene a lo sumo un enlace intersubunitario con carga (a pH fisiológico) por cada cuatro enlaces sin carga (a pH fisiológico), preferiblemente a lo sumo uno por cada ocho, y más preferiblemente a lo sumo uno por cada dieciséis, enlaces sin carga. En una realización preferida, los análogos de ácido nucleico descritos en la presente memoria son completamente sin carga.

La secuencia de bases del análogo de ácido nucleico, proporcionada por grupos que forman pares de bases soportados por la cadena principal del análogo, puede ser cualquier secuencia, donde los grupos soportados que forman pares de bases incluyen las bases A, T, C, G y U estándares o modificadas, o las bases no estándares inosina (I) y 7-desaza-G.

50 Un análogo de ácido nucleico preferido es un oligómero de morfolino, es decir, un análogo de oligonucleótido compuesto por estructuras de subunidades de morfolino que tienen la forma que se muestra en la Figura 1, donde (i) las estructuras se enlazan entre sí mediante enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, preferiblemente de dos átomos de longitud, y preferiblemente sin carga, que unen el nitrógeno morfolínico de una subunidad con el carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente, y (ii) P_i y P_j son componentes de purina o pirimidina que forman pares de bases, eficaces para unirse, mediante enlaces de hidrógeno específicos de bases, a una base de un polinucleótido. El componente de purina o pirimidina que forma pares de bases es típicamente
55

adenina, citosina, guanina, uracilo o timina. La síntesis, las estructuras y las características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan 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.

5 La subunidad que se muestra en la Figura 1B, que tiene un enlace de dos átomos, se usa 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 enlaza el carbono morfolínico 5' al 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 los enlaces de hidrógeno específicos de bases. Los grupos preferidos incluyen alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo y alquilamino, incluyendo aminas cíclicas, todos los cuales pueden estar sustituidos de forma variable, siempre que el enlace específico de bases no se rompa. Los alquilo, alcoxilo y tioalcoxilo incluyen preferiblemente 1-6 átomos de carbono. El alquilamino se refiere preferiblemente a una sustitución con alquilo inferior (C_1 a C_6), y las aminas cíclicas son preferiblemente heterociclos con nitrógeno de 5 a 7 miembros que contienen opcionalmente 1-2 heteroátomos adicionales seleccionados de entre oxígeno, nitrógeno y azufre. Z es azufre u oxígeno y es preferiblemente oxígeno.

15 Un oligómero de morfolino preferido es un oligómero de morfolino con enlaces fosfordiamidato, al que se hace referencia en la presente memoria como PMO. Tales oligómeros se componen de estructuras de subunidades de morfolino que tienen la forma que se muestra en la Figura 2B, donde las estructuras están enlazadas entre sí mediante enlaces de tipo fosfordiamidato, donde $X=NH_2$, NHR o NR_2 (donde R es alquilo inferior, preferiblemente metilo), $Y=O$ y $Z=O$, que unen el nitrógeno morfolínico de una subunidad al carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente, P_i y P_j son componentes de purina o pirimidina que forman pares de bases, eficaces para unirse, mediante enlaces de hidrógeno específicos de bases, a una base de un polinucleótido. También se prefieren estructuras que tienen un enlace de tipo fosfordiamidato alterno, donde, en la Figura 2B, $X =$ alcoxilo inferior, tal como metoxilo o etoxilo, $Y=NH$ o NR , donde R es alquilo inferior, y $Z=O$.

25 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 alta T_m , incluso con oligómeros tan cortos como aquellos de 8-14 bases, la capacidad para ser transportados de forma activa en células de mamífero, y la capacidad de un heterodúplex de oligómero:RNA para resistir la degradación por RNasa.

30 Un oligómero de morfolino "sustancialmente sin carga" incluye a lo sumo un enlace intersubunitario con carga por cada cuatro, preferiblemente por cada ocho, y más preferiblemente por cada dieciséis, enlaces intersubunitarios sin carga. Cualesquier enlaces con carga son preferiblemente enlaces de tipo fosforamidato (o tiofosforamidato) con carga, por ejemplo, un enlace como se muestra en la Figura 2B donde X es O^- o S^- . Preferiblemente, los oligómeros de morfolino son completamente sin carga.

35 En una realización preferida, el oligómero de morfolino tiene una longitud de aproximadamente 8-40 subunidades. Más típicamente, el oligómero tiene una longitud de aproximadamente 8-20, aproximadamente 8-16, aproximadamente 10-30, o aproximadamente 12-25 subunidades. Para algunas aplicaciones, tales como aplicaciones antibacterianas, pueden ser especialmente ventajosos los oligómeros cortos, por ejemplo, con una longitud de aproximadamente 8-12 subunidades, particularmente cuando se unen a un transportador peptídico como se describe en la presente memoria.

C. Conectores

40 El péptido de transporte puede enlazarse al agente que se va a suministrar mediante una variedad de métodos que están disponibles para alguien con experiencia en la técnica. Se proporcionan métodos ejemplares en los Ejemplos 2-5 posteriores y se ilustran en las Figuras 4A-D. En una realización, el péptido de transporte contiene un solo resto de cisteína cuyo tiol de la cadena lateral se usa para el enlace, tal como se muestra en las Figuras 4B y 4C, donde la cisteína es una cisteína terminal. El conector puede ser también proporcionado por una subunidad hidrófoba tal como la definida como Y, por ejemplo, una subunidad de β -alanina o de no α -aminoácido más largo, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 4D.

Como se discute más adelante, el punto de enlace puede estar en varias posiciones a lo largo del transportador. En realizaciones seleccionadas, está en un extremo del transportador. Típicamente, es adyacente a (o incluso está entre) los restos hidrófobos del transportador. Pueden unirse múltiples transportadores a un único compuesto si se desea; alternativamente, pueden conjugarse múltiples compuestos con un único transportador.

50 Cuando el compuesto es un PMO, el transportador puede ligarse en el extremo 5' del PMO a través de un componente de remate amínico, como se describe en los Ejemplos 2-3 y se ilustra en las Figuras 4A y 4D. Alternativamente, el transportador puede ligarse en el extremo 3', por ejemplo, a través del nitrógeno de un anillo de morfolino, como se describe en el Ejemplo 4 y se muestra en la Figura 4B, o a través de la cadena lateral de un enlace intersubunitario, bien en un extremo o bien en un enlace interno.

55 El conector entre el péptido de transporte y el PMO puede consistir también en aminoácidos naturales o artificiales (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico o β -alanina) añadidos al extremo C del péptido y como se describe en el

Ejemplo 2. El conector puede comprender también un enlace directo entre el extremo carboxilo de un péptido transportador y un grupo amina o hidroxilo del PMO, formado por condensación activada, por ejemplo, por carbodiimida.

5 En general, el conector puede comprender cualquier componente no reactivo que no interfiera en el transporte ni la función del conjugado. El conector incluye preferiblemente una cadena de hasta dieciséis átomos aproximadamente, incluyendo longitudes de hasta 12 o hasta 8 átomos, que comprende enlaces seleccionados de entre alquilo, éter (por ejemplo, enlaces de PEG), tioéter, éster, amida, amino, carbamato, o combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, los enlaces se seleccionan de entre alquilo, éter y amida cuando se desean enlaces que sean estables (no escindibles) *in vivo*.

10 Los conectores pueden ser seleccionados de entre aquellos que son no escindibles bajo condiciones normales de uso, por ejemplo, los que contienen un enlace éter, tioéter, amida o carbamato. En otras 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* se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ésteres de ácidos carboxílicos, que se hidrolizan enzimáticamente, y disulfuros, que se escinden en presencia de glutatión. Puede ser posible también escindir un enlace fotolíticamente escindible, tal como un éter *orto*-nitrofenílico, *in vivo* mediante la aplicación de radiación de longitud de onda apropiada.

15 Por ejemplo, la preparación de un conjugado que tiene un conector disulfuro, usando el reactivo 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP, del inglés "N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate") o succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (SMPT, del inglés "succinimidyl oxycarbonyl α -methyl- α -(2-pyridyldithio) toluene"), se describe en el Ejemplo 5 y se ilustra en la Figura 4C. Los agentes conectores heterobifuncionales ejemplares que contienen además un grupo disulfuro escindible incluyen 3-[(4-azidofenil)ditio]propionato de N-hidroxisuccinimidilo y otros que se describen en Vanin, E.F. y Ji, T.H., *Biochemistry* 20: 6754-6760 (1981).

D. Péptidos y conjugados ejemplares

25 A continuación se proporciona una Tabla de secuencias de péptidos de transporte y PMOs ejemplares que se discuten en las siguientes secciones. En general, los péptidos incluyen un grupo amino N-terminal y un grupo amida (por ejemplo, NH₂-CYGRKKRRQRRR-CONH₂) o carboxilo libre (por ejemplo, NH₂-CYGRKKRRQRRR-COOH) C-terminal, o incluyen una acetamida N-terminal y un ácido C-terminal [por ejemplo, Ac-NH(RAhxR)₄Ahx β Ala-OH]. Los restos "Y" de los péptidos designados por las ID. SEC. números 13-32 se indican en negrita, y los restos de cisteína internos que se utilizan para la unión con el PMO se muestran en cursiva. (Cuando no se muestra un conector de cisteína, el péptido se enlaza típicamente a través de su extremo C, esto es, por el lado derecho según se muestra).

30 En la Tabla 1 se muestran péptidos ejemplares que contienen subunidades de ácido 6-aminohexanoico (Ahx) como ID. SEC. números 33-41. En la Figura 4D se muestra la estructura del péptido de transporte (RAhxR)₄ (ID. SEC. n° 34) conjugado con un PMO a través de un conector Ahx- β Ala.

35 Tabla 1

PMO	Secuencia (5' a 3')	ID. SEC. n°
705	5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA -acetilo-3'	1
705-FL	5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA -fluoresceína-3'	1
705 _{2MM}	5'- CCT CTT AAC TCC GTT ACA - acetilo-3'	2
705 _{4MM}	5'- CCT ATT AAC TCC GTT CCA - acetilo-3'	3
705 _{SCR}	5'- CTC TCT CAC CAT TGA CAT - acetilo-3'	4
c-myc	5'- ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC-acetilo-3'	5
DENS'CS	5'- CGT TTC AGC ATA TTG AAA GG-3'	6
DEN3'CS	5'- CCC AGC GTC AAT ATG CTG-3'	7
DEN AUG	5'- GGT TAT TCA TCA GAG ATC TG-3'	8
MHV 1ab	5'- GCC CAT CTT TGC CAT TAT GC-3'	9
DSscr	5'-AGT CTC GAC TTG CTA CCT CA-3	10
Péptido	Secuencia (N-terminal a C-terminal)	
pTat	CYGRKKRRQRRR	11
rTat	RRRQRRKKR	12

R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	13
2d-R ₉ F ₂	_D R _D RRRRRRRRFF (isómero mixto)	14
D-R ₉ F ₂	_D R _D R _D R _D R _D R _D R _D R _D R _D R _D F _D F _D (isómero D)	15
R ₉ CF ₂	RRRRRRRRRCFF	16
R ₈ CF ₂ R	RRRRRRRRCFFR	17
R ₆ CF ₂ R ₃	RRRRRRCFFRRR	18
R ₅ FCFR ₄	RRRRRRCFFRRR	19
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	20
R ₄ CF ₂ R ₅	RRRRCFFRRRRR	21
R ² CF ₂ R ₇	RRCFFRRRRRRR	22
CF ₂ R ₉	CFFRRRRRRRRR	23
CR ₉ F ₂	CRRRRRRRRRFF	24
F ₂ R ₉	FFRRRRRRRRR	25
R ₅ F ₂ CF ₂ R ₄	RRRRRFFCFFRRRR	26
R ₉ I ₂	RRRRRRRRRII	27
R ₈ F ₃	RRRRRRRRFFF	28
R ₉ F ₄	RRRRRRRRRFFFF	29
R ₈ F ₂	RRRRRRRRFF	30
R ₆ F ₂	RRRRRRFF	31
R ₅ F ₂	RRRRRFF	32
(RAhx) ₄	RAhxRAhxRAhxRAhx	33
(RAhxR) ₄	RAhxRAhxRAhxRAhxR	34
(AhxRR) ₄	AhxRAhxRAhxRAhxRR	35
(RAhx) ₆	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx	36
(RAhxR) ₃	RAhxRAhxRAhxR	37
(RAhxR) ₂ R	RAhxRAhxRR	38
(RAhxR) ₂	RAhxRAhxR	39
(RKAhx) ₄	RKAhxRKAhxRKAhxRKAhx	40
(RHAhx) ₄	RHAhxRHAhxRHAhxRHAhx	41

II. Actividad biológica de conjugados de transportador-PMO

Los transportadores peptídicos descritos en la presente memoria facilitan el suministro de oligómeros sustancialmente sin carga a células eucariotas vivas, a la vez que potencian significativamente la actividad antisentido, como se demuestra más adelante para los PMOs. En una realización, el oligómero es un oligómero de morfolino sustancialmente sin carga como se describió anteriormente.

El suministro celular puede implicar compartimentos tanto citoplasmáticos como nucleares de la célula. Por consiguiente, en realizaciones seleccionadas, el oligómero antisentido incluye una secuencia de bases eficaz para hibridarse con una secuencia diana que incluye un sitio de corte y empalme en un mRNA preprocesado (pre-mRNA) seleccionado. El oligómero antisentido puede incluir también una secuencia de bases eficaz para hibridarse con una secuencia diana que incluye un sitio de iniciación de la traducción en un mRNA seleccionado. El oligómero antisentido puede incluir también una secuencia específica de bases eficaz para hibridarse con una secuencia diana requerida para la replicación viral. En otro aspecto, el oligómero antisentido puede ser un agente antibacteriano, por ejemplo, al dirigirse a RNA ribosómico u otros ácidos nucleicos bacterianos, como se describe, por ejemplo, en las Publicaciones de Patentes PCT otorgadas en propiedad común con el solicitante de la presente números WO 01/49775 y WO 01/42457 (Publicación de los EE.UU. n° 2002/0082226).

Como se demuestra en la presente memoria, los péptidos de transporte como los anteriormente descritos potencian enormemente la entrada en la célula de compuestos ligados, con relación a la incorporación del compuesto en ausencia del componente peptídico de transporte ligado, y con relación a la incorporación mediante un componente de transporte ligado que no tiene las subunidades Y. Tal incorporación potenciada se pone de manifiesto

preferiblemente por un factor de aumento de al menos uno, y preferiblemente por un factor de aumento de más de dos, en la incorporación del compuesto a células de mamíferos, con relación a la incorporación del agente mediante un componente de transporte ligado que no tiene las subunidades Y. La incorporación se potencia preferiblemente por un factor de al menos veinte, y más preferiblemente por un factor de al menos cuarenta, con relación al compuesto no conjugado.

La incorporación se mide preferiblemente en células HeLa o en células sanguíneas mononucleares, particularmente células linfáticas o derivadas del bazo, tales como linfocitos o fibroblastos, mediante procedimientos tales como los descritos más adelante en Materiales y Métodos, para las células HeLa, bajo los encabezamientos "Cultivo Celular" por "Citometría de Flujo". Véanse también el Ejemplo 6, el Ejemplo 9, la Sección A posterior para la evaluación sólo del transporte, y la Sección B posterior para la evaluación del transporte y la actividad antisentido.

Un beneficio adicional del componente de transporte es la potenciación de la unión de un análogo ligado de ácido nucleico a su secuencia diana. En la presente memoria se muestra que los componentes de transporte disminuyen la concentración de un oligómero antisentido sin carga, eficaz para conseguir actividad antisentido, según se mide tanto en cultivo tisular como en sistemas libres de células. Experimentos en cultivo tisular proporcionan indicaciones de una actividad antisentido potenciada, debida a un suministro intracelular potenciado, una actividad antisentido potenciada, por ejemplo, la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana, o una combinación de estos fenómenos.

Los sistemas de traducción libres de células proporcionan un medio para evaluar, independientemente del transporte, el efecto de potenciación del péptido conjugado sobre la capacidad del oligómero antisentido para unirse a su diana y, por bloqueo estérico, inhibir la traducción de secuencias cadena abajo (o inhibir el corte y empalme aberrantes, como en el ensayo del Ejemplo 6). Los ensayos de traducción libres de células diseñados para probar el efecto antisentido de los conjugados R_9F_2 -PMO y $(RAHxR)_4$ -PMO demuestran un factor de potenciación de la actividad antisentido de entre 10 y 500 en comparación con el PMO no conjugado (véanse, por ejemplo, el Ejemplo 8 y las Figuras 21-23 y 28). Las expresiones "potenciar la capacidad para inhibir la traducción" y "capacidad potenciada para inhibir la traducción" proporcionados por el péptido conjugado, tal como se usan en la presente memoria, se refieren preferiblemente a la actividad antisentido (inhibidora de la traducción) según se mide en dicho sistema libre de células, tal como se describe más adelante en Materiales y Métodos bajo el encabezamiento "Ensayos de traducción libres de células". Véanse también el Ejemplo 9 y la Sección C posteriores.

A. Suministro de oligómeros de morfolino a células, mediado por transportador

La incorporación celular de tres sustancias de ensayo, que incluían (1) PMO no conjugado (ID. SEC. nº 1; también designado en la presente memoria "705" o "PMO 705"), (2) una mezcla de PMO no conjugado y el péptido de transporte R_9F_2 (ID. SEC. nº 13)-C, y (3) un conjugado covalente del PMO y el péptido de transporte (R_9F_2 -C-705), se determinó por microscopía de fluorescencia en cuatro líneas celulares: HeLa pLuc705 derivada de HeLa S3, HeLa, NIH3T3, y Jurkat. HeLa pLuc/705 (Kang, Cho *et al.* 1998) es una línea celular HeLa S3 transfectada de manera estable con un plásmido que lleva la secuencia codificadora de luciferasa, interrumpida por un intrón 2 mutado de β -globina humana (Gene Tools, Philomath, Oregon, EE.UU.). Otras líneas celulares se obtuvieron de la ATCC (Manassas, Virginia, EE.UU.). Los PMOs se marcaron en 3' con fluoresceína como se describe en el Ejemplo 1. Para evitar artefactos, todas las imágenes de fluorescencia se tomaron de células vivas, y no se usó agente de fijación ni medios de montaje.

En las cuatro líneas celulares, las imágenes de fluorescencia de las células tratadas con 705-FL (ID. SEC. nº 2) solo, o con una mezcla de PMO 705-FL no conjugado y R_9F_2 -C (ID. SEC. nº 13), estaban esencialmente desprovistas de fluorescencia. En las células tratadas con el conjugado R_9F_2 -C-PMO, se observó fluorescencia en el 100% de las células, aunque los patrones variaban entre las diferentes líneas celulares del modo siguiente. Las células NIH3T3 tenían una fluorescencia citosólica y nuclear muy brillante y difusa con menos zonas punteadas que otras líneas celulares. Las células HeLa tenían mayormente fluorescencia difusa con más zonas punteadas distinguibles que NIH3T3. Se vio que las células HeLa S3 tenían una fluorescencia citosólica difusa menos intensa pero con una zona fluorescente muy brillante localizada cerca del núcleo o en él. Las células Jurkat tenían el menor nivel de fluorescencia de estas líneas celulares.

La asociación del conjugado con las células es un proceso bastante rápido. Como se muestra en la Figura 5A, la fluorescencia de las células incubadas con R_9F_2 -C-PMO aumentó en minutos y alcanzó la intensidad máxima entre los 30 y 45 minutos en un periodo de estudio de 900 minutos. La fluorescencia de las células incubadas a 37 °C era similar a la de las incubadas a 17 °C en un intervalo de concentraciones de 0,1 a 5 μ M (Figura 5B). La adsorción resultó ser saturable, con un aumento en la fluorescencia observada entre 0,1 y 1 μ M pero no entre 1 y 5 μ M.

Como se comunicó previamente (Moulton, Hase *et al.* 2003), la mayor parte del péptido Tat que se llega a asociar con las membranas celulares no se internaliza. Debido a que el conjugado unido a la membrana puede potenciar artificialmente la aparición de fluorescencia celular, se usó un tratamiento con tripsina en el presente caso para reducir o eliminar la contribución del conjugado unido a la membrana (Moulton, Hase *et al.* 2003; Richard, Melikov *et al.* 2003).

Por lo tanto, se incubaron células HeLa o NIH3T3 con el conjugado, y seguidamente se trataron con tripsina, como se describe más adelante en Materiales y Métodos, se lavaron y se volvieron a sembrar en placas. Las células tratadas con tripsina tenían mucha menos fluorescencia que las células no tratadas con tripsina (Figura 6), aunque los patrones de fluorescencia eran similares.

- 5 Como se muestra también en la Figura 6, ambos conjugados con L-transportador y D-transportador dieron perfiles de asociación e internalización idénticos; por lo tanto, la disminución de la fluorescencia tras el tratamiento con tripsina no puede atribuirse únicamente a la digestión del péptido R_9F_2C por la tripsina. Esto sugiere que el conjugado se asocia con proteína(s) de membrana, que son digeridas por la tripsina.

- 10 Habiéndose mostrado que la tripsina puede eliminar eficazmente la mayor parte del conjugado unido a la membrana, los factores que afectan a la internalización del conjugado pudieron estudiarse por citometría de flujo en células tratadas con tripsina. Como se muestra en la Figura 7A, se observan aumentos graduales de fluorescencia, debidos a la internalización del conjugado, hasta los 700 minutos desde la incubación. Se ve también que la internalización es dependiente de la temperatura y la concentración, como se muestra en la Figura 7B. El perfil mostrado en la Figura 7B es similar al mostrado por el marcador de endocitosis FM4-64 (un colorante lipófilo fluorescente que marca la membrana plasmática y sufre luego endocitosis de manera dependiente del tiempo, la temperatura y la energía). La internalización del conjugado resultó casi completamente inhibida en las células pre-incubadas con el inhibidor metabólico NaN_3 , lo que indica que la internalización del conjugado de péptido-PMO es un proceso dependiente de la energía.

B. Actividad antisentido en cultivo celular

- 20 Se ensayaron varios conjugados de oligómero-componente transportador conforme a la invención para determinar su actividad antisentido *in vitro* (Ejemplo 6). Los datos descritos más adelante se obtuvieron dirigiendo una secuencia de corrección de corte y empalme de β -globina, fusionada a luciferasa. Específicamente, en el ensayo se utilizan células HeLa transfectadas de manera estable con el plásmido pLuc/705, que tiene un gen de luciferasa interrumpido por un intrón de β -globina humana mutado en el nucleótido 705, causando así un corte y empalme incorrectos. Un oligonucleótido antisentido que se dirige al sitio de corte y empalme 705, cuando se suministra eficazmente, corrige el corte y empalme y permite la expresión de la luciferasa. Para una descripción adicional del plásmido y el ensayo, véanse, por ejemplo, Kang, Cho *et al.* 1998; Yoo, Sazani *et al.* 1999. Dado que el núcleo celular es el sitio de corte y empalme del pre-mRNA, estos datos demuestran el suministro del oligómero al núcleo celular.

- 30 Se ha mostrado previamente que un conjugado de un PMO antisentido de 18 monómeros (ID. SEC. n° 1) con el oligopéptido rTat(57-49) (ID. SEC. n° 12) inhibe el corte y empalme aberrantes en este ensayo (Moulton, Hase *et al.* 2003). Se llevaron a cabo ensayos comparativos usando conjugados de rTat(57-49) y conjugados que contenían moléculas transportadoras, como se muestra en la Figura 8.

- 35 Como se muestra en la Figura, un conjugado que consistía en el PMO antisentido enlazado, a través de un resto de cisteína, a un péptido que tiene la secuencia Arg_9Phe_2 (R_9F_2 , ID. SEC. n° 13), era mucho más eficaz en cuanto a suprimir el corte y empalme aberrantes que los conjugados que contenían los péptidos rTat(57-49) (RRRQRRKKR) y R_9 , enlazados también al PMO a través de un resto de cisteína.

La Figura 9 proporciona el nivel de células HeLa viables tras 24 horas de incubación con varios de estos conjugados en una concentración de 25 μ M, mostrando la baja toxicidad de los conjugados.

- 40 Las Figuras 10-14 muestran el efecto de varias modificaciones estructurales del transportador sobre la actividad antisentido de los conjugados de PMO-transportador. En cada figura, los resultados se expresan en unidades lumínicas relativas (RLU; del inglés, relative light units) normalizadas a microgramo de proteína, basadas en la expresión de luciferasa en el ensayo pLuc705 descrito anteriormente. En los conjugados representados en estas figuras, el PMO está ligado, a través de un resto de cisteína, al extremo C o lado derecho de la secuencia del transportador según se ha escrito, y al extremo 5', o lado izquierdo según se ha escrito, del PMO.

La Figura 10 muestra el efecto de variar la naturaleza o longitud del segmento hidrófilo del transportador. Como se muestra, los transportadores que contenían fenilalanina (Phe o F) resultaron ser más eficaces que los transportadores que contenían isoleucina (Ile o I). No pareció que el aumento de la longitud del segmento hidrófobo de 2 a 3 y a 4 subunidades de aminoácido aumentara la eficacia.

- 50 Parece que el número total de argininas en el transportador es significativo a la vista de los datos que se muestran en la Figura 11. Como se muestra en ella, en los oligopéptidos de la serie R_nF_2 , los oligopéptidos donde n era 6 o menos eran mucho menos eficaces que aquellos donde n era 8 o 9. Véase también Moulton, Nelson *et al.*, 2004.

- 55 Como se muestra en la Figura 12, se puede alterar la posición del segmento hidrófobo. En los datos representados por F_2R_9 , el segmento R_9 está en el extremo C y está ligado al PMO. De manera significativa, los datos muestran que la secuencia de subunidades catiónicas puede ser no contigua ($R_5F_2R_4$). Más adelante se proporcionan más ejemplos en la Figura 15.

La Tabla 2 inferior muestra el nivel de producción de luciferasa (esto es, la actividad antisentido) en células HeLa pLuc705 tras 24 horas de incubación con los conjugados R₉F₂-PMO, enlazados por un conector escindible o un conector no escindible de longitudes variables, donde en cada caso el PMO estaba ligado a través de un resto de cisteína al extremo C del transportador peptídico. Las estructuras de los agentes entrecruzantes bifuncionales usados en este estudio se muestran en la Figura 13. Como se muestra en la Tabla, el uso de un conector escindible (disulfuro) (véase, por ejemplo, la Figura 4C), no tuvo un efecto importante sobre la actividad. Véase también Moulton, Nelson *et al.*, 2004.

Tabla 2. Efecto del conector sobre la actividad antisentido de los conjugados R₉F₂C-PMO (705-FL).

Tratamiento	Tipo de conector	Longitud del conector	RLU/ μ g de proteína
Vehículo testigo (H ₂ O)	N/A	N/A	(intervalo)
R ₉ F ₂ C-705-FL	tio-maleimida	6,8	102 (4,9)
R ₉ F ₂ C-EMCS-705-FL	tio-maleimida	9,4	141 (4,3)
R ₉ F ₂ C-KMUS-705-FL	tio-maleimida	15,7	171 (14,3)
R ₉ F ₂ C-SMPB-705-FL	tio-maleimida	11,6	123 (2,1)
R ₉ F ₂ C-SMCC-705-FL	tio-maleimida	11,6	86 (1,4)
R ₉ F ₂ C-SBAP-705-FL	tio-éter	6,2	98 (3,2)
R ₉ F ₂ C-SPDP-705-FL	disulfuro	6,8	109 (2,9)
R ₉ F ₂ C-LCSPDP-705-FL	disulfuro	15,6	181 (7,8)

Como se muestra en la Figura 14, pareció que la ligación de biotina al conjugado (biotina-R₉F₂-PMO) aumentaba la actividad a dosis altas tras 6 horas de incubación (datos no mostrados), pero no se vio efecto alguno, o se vio muy poco, a las 24 horas.

Se realizaron experimentos adicionales para evaluar el efecto de la posición tanto del segmento hidrófobo como del punto de ligación del PMO en el transportador. Las Figuras 15 y 16 muestran los resultados del ensayo pLuc/705 llevado a cabo con los conjugados de PMO 705 (ID. SEC. n° 1) enlazado a los péptidos de transporte que tienen las ID. SEC. números 13 y 16-26 como se muestra en la Tabla 1. En cada conjugado, el PMO está enlazado a través de un resto de cisteína (C) C-terminal o interno. Como muestran los datos, los transportadores en que las subunidades Y son internas (esto es, están flanqueadas por subunidades X) actuaron en general tan bien o mejor que aquellas en que las subunidades Y están en un extremo. El punto de enlace podía ser adyacente a las subunidades Y o estar alejado de las subunidades Y.

Para determinar si la presencia del transportador afecta negativamente a la especificidad antisentido del PMO, como se ha observado para los transportadores Tat (Moulton, Hase *et al.* 2003), el ensayo se llevó a cabo con conjugados R₉F₂-C-PMO de tres PMOs testigo con secuencias faltas de apareamiento, denominados 705_{2MM} (dos faltas de apareamiento, ID. SEC. n° 2), 705_{4MM} (cuatro faltas de apareamiento, ID. SEC. n° 3) y 705_{SCR} (secuencia revuelta, ID. SEC. n° 4) (véase la Tabla 1 para ver la secuencias). Hasta con la concentración más alta ensayada, los tres conjugados testigo no mostraron actividad antisentido; esto es, no restablecieron la actividad luciferasa corrigiendo el defecto en el sitio de corte y empalme 705 (Figura 17). Por consiguiente, no hubo indicación de efectos negativos sobre la especificidad por parte del transportador.

También se usaron la microscopía de fluorescencia y el ensayo de corrección del corte y empalme para determinar el tiempo requerido para que el conjugado entrara en el citoplasma y el núcleo de las células. Se trataron células HeLa, NIH3T3 o HeLapLuc/705 con el conjugado R₉F₂-C-PMO durante 20 minutos y se adquirieron las imágenes. Se usó un tinte nuclear, dihidroetidio (DHE, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.), para localizar el núcleo. Se vio fluorescencia verde difusa tanto en el citoplasma como en el núcleo, y superpuesta con el rojo intenso del DHE en el núcleo.

En el ensayo de corrección del corte y empalme, se monitorizó la producción de luciferasa funcional a lo largo del tiempo, mostrándose que la luciferasa se producía tan solo después de 120 minutos de incubación con el R₉F₂-C-705-PMO (Figura 18).

C. Actividad antisentido en sistemas libres de células

Para investigar la actividad antisentido de los conjugados de manera independiente del transporte celular, se ensayaron PMOs conjugados con péptidos y no conjugados en un sistema de traducción libre de células, para determinar su capacidad para bloquear estéricamente la traducción de un gen informador cadena abajo. Los efectos de varios PMOs antisentido sobre la traducción de RNA transcrito *in vitro* a partir de plásmidos que contenían varias secuencias de nucleótidos virales fusionadas directamente cadena arriba de la región codificadora de la luciferasa

de luciérnaga (fLUC), se midieron mediante reacciones de traducción *in vitro* en un sistema comercialmente disponible de lisados de reticulocitos de conejo (RRL, del inglés "rabbit reticulocyte lysate"), como se describe en el Ejemplo 9. Específicamente, se fusionaron tres regiones diferentes del virus de tipo 2 del dengue al gen fLUC y a una región que rodea el codón de iniciación AUG del gen c-myc humano. También se eligió como diana una secuencia del virus de la hepatitis murina (MHV, del inglés "murine hepatitis virus") que rodea el codón de inicio del gen lab (Neuman, B. W, *et al.*, J. Virol. 2004, en imprenta).

Como se muestra en las Figuras 21-23 y 28, se descubrió que la conjugación de los oligómeros antisentido con transportadores peptídicos de la invención aumentaba la eficacia de los PMOs antisentido por un factor de entre 10 y 500, según quedó reflejado por la concentración requerida para alcanzar un 50% de inhibición de la expresión de la diana (EC₅₀). La conjugación con R₉F₂ potenció la eficacia antisentido del PMO en comparación con el PMO no conjugado por un factor tan alto como 500 (Figuras 21-23). Como se muestra en la Figura 28, se obtuvieron resultados similares utilizando el péptido (RAhxR)₄ (ID. SEC. n° 34) conjugado con un PMO anti-c-myc (ID. SEC. n° 5).

La potenciada actividad antisentido observada con los conjugados peptídicos de la invención en los sistemas de traducción libres de células puede deberse a una alteración localizada de la estructura secundaria del RNA por parte del péptido. Una construcción usada en los ensayos con RRL, pDCLD, contiene las 204 bases más hacia el extremo 5' del genoma del virus del dengue, que codifican los 35 aminoácidos iniciales de la poliproteína, colocada en marco con el gen fLUC. La estructura del RNA predicha por ordenador para esta región, mostrada en la Figura 29, que se generó usando el programa de plegadura de RNA "mfold" (Zuker 2003), indica abundante estructura secundaria. La estructura secundaria mostrada en la Figura 29 coincide también con la predicha por Khromykh *et al.* para la misma región de un flavivirus distinto pero relacionado, el virus Kunjin (Khromykh, Kondratieva *et al.* 2003).

La capacidad de los PMOs antisentido no conjugados para hibridarse y bloquear la traducción puede resultar inhibida por ciertas estructuras secundarias, como parece ser el caso para este segmento de RNA, como se muestra en la Figura 23. En este ejemplo, el PMO no conjugado fue incapaz de producir un 50% de reducción de la traducción a pesar de aumentarse su concentración. Sin embargo, el PMO conjugado con el péptido R₉F₂ tiene una actividad antisentido muy potenciada, produciendo cerca del 100% de supresión de la traducción del gen informador a la misma concentración (Figura 23).

D. Biodistribución *in vivo*

Los experimentos con cultivos tisulares de varios sistemas experimentales demuestran claramente que los péptidos de transporte de la invención potencian el suministro a los compartimentos intracelulares, incluyendo el citoplasma y el núcleo. Para ampliar estas observaciones a un sistema *in vivo*, se realizó un análisis comparativo de incorporación de PMO y PMO conjugado con péptido en células de bazo y ganglio linfático en ratones. Como se describe en el Ejemplo 10 y se muestra en la Figura 27, el péptido de transporte R₅F₂R₄ (ID. SEC. n° 20) potenció enormemente el suministro a células de bazo y ganglio linfático en total, y a subpoblaciones específicas de células de estos tejidos, incluyendo linfocitos positivos para CD4 y CD8, monocitos, macrófagos y células B. Además, como se describe en el Ejemplo 10, se mostró que los PMOs conjugados con péptidos tienen un tiempo de permanencia importante en las células derivadas de bazo y ganglio linfático cuatro días después de que hubiera terminado un régimen de tratamiento con multidosis de PMO en ratones.

III. Aplicaciones

Los transportadores y conjugados son particularmente útiles para dirigir un oligómero antisentido sustancialmente sin carga, tal como un PMO, a un núcleo celular, exponiendo la célula a un conjugado que comprende el oligómero enlazado covalentemente a un péptido de transporte como se describió anteriormente. Los transportadores son eficaces para suministrar el oligómero antisentido a través tanto de la membrana celular como de la nuclear, y para potenciar la actividad antisentido del oligómero, como se demostró anteriormente.

El suministro nuclear permite dirigirse a sitios de corte y empalme, lo que puede implementarse para generar proteínas dominantes/negativas, que conserven, por ejemplo, la función de retroalimentación de una proteína pero no su actividad enzimática. Esto se consigue inhibiendo selectivamente sitios donadores o aceptores de corte y empalme en el pre-mRNA que eliminan del mRNA maduro cortado y empalmado uno o más exones que codifican funciones no deseadas. Las dianas génicas útiles para esta estrategia incluyen, pero no se limitan a, CD86, c-FLIP, CTLA-4, TGF- β y c-myc.

El sitio de iniciación de la traducción (esto es, el codón de iniciación AUG) es otra diana útil para la terapia antisentido, como lo son los elementos que actúan en cis requeridos para la replicación o la transcripción virales.

La inhibición de la replicación viral puede ser llevada a cabo bloqueando la traducción de proteínas virales esenciales o dirigiéndose a regiones del genoma viral requeridas para la replicación de ácidos nucleicos o para la transcripción del mRNA. Estos elementos que actúan en cis se localizan con frecuencia en las regiones no traducidas (UTRs, del inglés "untranslated regions") del genoma viral y se encuentran típicamente en uno de los

extremos 5' y 3' del genoma, o en ambos. Los ejemplos de estos elementos incluyen sitios internos de entrada al ribosoma (IRES, del inglés "internal ribosome entry sites") como los que se encuentran en el virus de la hepatitis C (VHC), secuencias reguladoras de la transcripción (TRS, del inglés "transcriptional regulatory sequences") como las que se encuentran en el coronavirus humano que causa el síndrome sistémico respiratorio adquirido (SARS, del inglés "systemic acquired respiratory syndrome"), secuencias de ciclación (CS, del inglés "cyclization sequences") como las que se encuentran en flavivirus, y el sitio de unión del cebador tRNA (PBS, del inglés "primer binding site") encontrado en retrovirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Con frecuencia, estos elementos tienen características estructurales secundarias abundantes y son recalcitrantes en cuanto a la unión de oligómeros antisentido. Se cree que la conjugación de péptidos como los descritos en la presente memoria con oligómeros antisentido sustancialmente sin carga permite la alteración de tales estructuras secundarias y, por lo tanto, la unión potenciada de los oligómeros a sus dianas. Por lo tanto, los métodos y composiciones de la invención descritos en la presente memoria proporcionan la capacidad para dirigirse más eficazmente a estas regiones de los genomas virales e inhibir la replicación viral.

Los conjugados de PMO encuentran uso, en general, en cualquier indicación en la que se desee el suministro de un oligonucleótido a una célula, incluyendo aplicaciones antisentido. Tales indicaciones incluyen, pero no se limitan a, trastornos proliferativos o isquemia, dirigiéndose a p53; enfermedad del riñón poliquístico, reestenosis y cáncer, dirigiéndose a c-myc; inflamación pulmonar o choque séptico, dirigiéndose a TNF- α ; alteración del metabolismo de los fármacos, dirigiéndose a enzimas P450; cáncer de próstata, dirigiéndose al receptor de β -HCG o de andrógenos; y glioblastoma, dirigiéndose a la integrina α V. El tratamiento de células pluripotenciales con oligonucleótidos antisentido dirigidos a genes que se expresan preferentemente en tales células puede usarse también para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. en tramitación junto con la presente y otorgada en propiedad común con el solicitante de la presente 09/679.475; Publicación PCT n° WO 01/25405). Los tratamientos de enfermedades infecciosas usando oligonucleótidos antisentido dirigidos a genes virales o a secuencias que actúan en cis implicadas en la replicación o transcripción pueden usarse como tratamientos terapéuticos antivirales (por ejemplo, las Solicitudes de Patentes de EE.UU. en tramitación junto con la presente y otorgadas en propiedad común con el solicitante de la presente 10/272.865, publicación n° US 2002/0171335; 10/422671, publicación n° US 2003/0224353; 60/493.990; 60/493.043; 60/514.064; y 60/532.701). El tratamiento de ciertos estados inmunológicos puede verse facilitado al usar oligonucleótidos antisentido conjugados con péptidos que pueden proporcionar un suministro intracelular específicamente a linfocitos naífs o activados (por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. en tramitación junto con la presente y otorgada en propiedad común con el solicitante de la presente 60/505.418).

Los conjugados son particularmente útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos vasculares tales como la reestenosis. Las áreas de lesión de los vasos incluyen, por ejemplo, reestenosis o estrechamiento repetido de la luz vascular después de una intervención vascular, tal como la angioplastia de arterias coronarias con balón, con o sin inserción de estent. Se cree que la reestenosis se produce en aproximadamente un 30% a 60% de las lesiones tratadas por angioplastia y en aproximadamente un 20% de las lesiones tratadas con estents de 3 a 6 meses después del procedimiento (véase, por ejemplo, Dev, N. B. et al. *Cathet. Cardiovasc. Diagn.* 45(3): 337-45, 1998). También se puede producir una estenosis después de una operación de baipás de arterias coronarias, en la que se realiza cirugía cardíaca para redirigir, o hacer un baipás de, la sangre alrededor de las arterias obstruidas y mejorar el suministro de sangre y oxígeno al corazón. En tales casos, se puede producir estenosis en los segmentos de vasos sanguíneos trasplantados, y particularmente en la juntura de vasos reemplazados. También se puede producir una estenosis en las juntas anastomóticas creadas para diálisis.

En este aspecto, se emplea un conjugado de PMO, que se dirige preferiblemente a c-myc, en un estent revestido, en una disolución de impregnación para el tratamiento de las venas safenas, o suministrado de otra forma al sitio de la lesión vascular. Se ha hallado que las composiciones de microburbujas, tal como se describe más adelante, son particularmente útiles en el suministro de moléculas ligadas, tales como oligonucleótidos, a áreas de trombosis o lesión vascular, por ejemplo, al endotelio dañado (véanse, por ejemplo, Kipshidze *et al.*, 2001, 2002; Kim *et al.* 2001; Publicación PCT n° WO 2000/02588) así como a órganos seleccionados tales como el hígado y el riñón. Una composición anti-reestenosis preferida es un PMO anti-c-myc (por ejemplo, ID. SEC. n° 5) conjugado con un péptido de transporte (RAhxR)₄ (ID. SEC. n° 34) mediante un conector Ahx- β Ala (como se muestra en la Figura 4D).

IV. Composiciones que contienen conjugados de PMO-transportador y suspensiones portadoras de microburbujas

Se ha mostrado que las suspensiones acuosas de microburbujas que contienen gas insoluble son vehículos eficaces para el suministro de oligonucleótidos, incluyendo los PMOs, como se describe, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. otorgadas en propiedad común con el solicitante de la presente 5.849.727 y 6.117.858 y la Solicitud de Patente de EE.UU. en tramitación 10/668.988. En general, la composición comprende una suspensión líquida, preferiblemente una suspensión acuosa, de microburbujas que contienen un gas insoluble en la sangre. Las microburbujas tienen preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 10 μ m de diámetro. En general, puede usarse cualquier gas insoluble en la sangre que sea atóxico y gaseoso a la temperatura corporal. El gas insoluble debería tener un coeficiente de difusión y una solubilidad en sangre más bajos que el nitrógeno o el oxígeno, que se difunden en la atmósfera interna del vaso sanguíneo. Son ejemplos de gases útiles los gases nobles, por ejemplo,

helio o argón, así como gases fluorocarbonados y hexafluoruro de azufre. En general, se prefieren los gases perfluorocarbonados, tales como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropano, perfluorobutano y perfluoropentano.

5 Las microburbujas gaseosas se estabilizan mediante un revestimiento fluido filmógeno para evitar la coalescencia y proporcionar una interfase para la unión de moléculas a las microburbujas. El fluido es preferiblemente una disolución o suspensión acuosa de uno o más componentes seleccionados de entre proteínas, agentes tensioactivos, lípidos, incluyendo fosfolípidos, y polisacáridos. En realizaciones preferidas, los componentes se seleccionan de entre proteínas, compuestos tensioactivos y polisacáridos. Las proteínas adecuadas incluyen, por ejemplo, albúmina, gammaglobulina, apotransferrina, hemoglobina, colágeno y ureasa. Se prefieren las proteínas humanas, por ejemplo, albúmina de suero humana (HSA, del inglés "human serum albumin").

10 Los agentes tensioactivos convencionales incluyen compuestos tales como alcoholes de poliéteres alquílicos, alcoholes de poliéteres alquilfenólicos, y etoxilatos de alcohol, que tienen grupos alquilo superiores (por ejemplo, de 6-20 átomos de carbono), alcanolamidas de ácidos grasos o aductos de óxido de alquileo de las mismas, y monoésteres de glicerol y ácidos grasos. Se describen agentes tensioactivos particularmente destinados a usarse en las composiciones de agentes de contraste en forma de microburbujas en, por ejemplo, las Patentes de Nycomed Imaging US 6.274.120 (ácidos grasos, ésteres polihidroalquílicos tales como ésteres de pentaeritrol, etilenglicol o glicerol, alcoholes y aminas grasos, y ésteres o amidas de los mismos, aldehídos y cetonas lipófilos, derivados lipófilos de azúcares, etc.), US 5.990.263 (PEG terminado en metoxilo y acilado con, por ejemplo, 6-hexadecanoiloxihexadecanoilo), y US 5.919.434.

15 Pueden usarse también otros polímeros filmógenos sintéticos; véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 6.068.857 (Weitschies) y 6.143.276 (Unger), en las que se describen microburbujas que tienen una cubierta de polímero biodegradable, donde el polímero se selecciona de entre, por ejemplo, poli(ácido láctico), un polímero de acrilato, poliacrilamida, policianoacrilato, un poliéster, poliéter, poliamida, polisiloxano, policarbonato o polifosfazeno, y varias combinaciones de copolímeros de los mismos, tal como un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico.

20 Tales composiciones se han usado como agentes de contraste para ultrasonido diagnóstico y se han descrito también para aplicaciones terapéuticas, tales como la potenciación de la penetración de fármacos (Tachibana *et al.* Patente de EE.UU. nº 5.315.998), como agentes trombolíticos (Porter, Patente de EE.UU. nº 5.648.098) y para el suministro de fármacos (Unger, Patente de EE.UU. nº 6.143.276; Klaveness *et al.*, Patente de EE.UU. nº 6.261.537; Porter *et al.*, Patente de EE.UU. nº 6.117.858).

25 En una realización, el portador es una suspensión de microburbujas de dextrosa/albúmina que contienen perfluorocarbono, conocidas como PESDA (del inglés, "perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose/albumin", dextrosa/albúmina sonicadas expuestas a perfluorocarbono). La albúmina de suero humana (HSA) se metaboliza fácilmente en el cuerpo y ha sido ampliamente utilizada como agente de contraste. La composición puede prepararse como se describe en las Patentes de EE.UU. en propiedad común con el solicitante de la presente 5.849.727 y 6.117.858. Brevemente, se sonica una disolución de dextrosa/albúmina a la vez que se perfunde el gas perfluorocarbonado. Las microburbujas se forman preferiblemente en un ambiente con N₂ reducido, preferiblemente libre de N₂, típicamente introduciendo un gas con N₂ reducido (en comparación con el aire ambiental) o libre de N₂ en la interfase entre la sonda de sonicación y la disolución. Se ha hallado que las microburbujas formadas de esta forma son significativamente más pequeñas y estables que las formadas en presencia de aire ambiental (véase, por ejemplo, Porter *et al.*, Patente de EE.UU. nº 6.245.747.)

30 Las microburbujas se conjugan con un compuesto que va a ser suministrado, tal como un conjugado de PMO-transportador, simplemente incubando la suspensión de microburbujas, con agitación si es necesario, con una formulación líquida del compuesto. La incubación puede llevarse a cabo a temperatura ambiental o a temperaturas moderadamente más altas, siempre que no se comprometa la estabilidad del fármaco ni las microburbujas. Se cree que los compuestos incubados con tales suspensiones se unen no covalentemente en la interfase entre gas y fluido de las microburbujas, y que, tras la administración, la propiedad del gas insoluble (por ejemplo, perfluorocarbono) de fluidizar la membrana celular potencia la entrada del compuesto en la célula.

V. Oligonucleótidos Antisentido Modificados

35 En otro aspecto, se describen oligómeros antisentido que están modificados con componentes cargados de estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R¹ es H o R, y R² es R, NH₂, NHR o NR₂, donde R es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno; R¹ y R² pueden formar conjuntamente un anillo; y el componente de cadena lateral está unido a la subunidad de aminoácido a través de R¹ o R². Específicamente, el oligómero comprende una secuencia de subunidades conectadas por enlaces intersubunitarios, donde la secuencia de subunidades soporta una secuencia de bases eficaz para hibridarse con un polinucleótido diana de secuencia complementaria, para formar un dúplex diana/antisentido; y, portado sobre al menos seis enlaces intersubunitarios contiguos, un componente cargado como el anteriormente descrito. En una realización preferida, los componentes cargados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en guanidilo [-HN=C(NH₂)NH-], amidinilo [-

C(=NH)(NH₂), 2-aminohexahidropirimidilo [=HN-CH(NH₂)NH-], 2-aminopiridinilo [-C(=N)(NH₂)] y 2-aminopirimidonilo [-HN-C(NH₂)=N-] (véase la Figura 3).

Preferiblemente, el oligómero es un oligómero sin carga. En las Figuras 19A-G se muestran ejemplos de oligómeros antisentido sin carga. Puede incorporarse también a los oligómeros un número pequeño de enlaces con carga, por ejemplo, fosforioato o, más preferiblemente, fosforamido con carga, preferiblemente menos de un enlace con carga por cada cuatro enlaces sin carga. Los enlaces sin carga que se muestran en la Figura 19 incluyen enlaces carbonato (19A, R = O) y carbamato (19A, R = NH₂); enlaces alquilfosfonato y fosfotriéster (19B, R = alquilo u O-alquilo); enlaces amida (19C); sulfonas (19D, R₁, R₂ = CH₂); sulfonamidas (19D, R₁ = NH, R₂ = CH₂, o viceversa); sulfamatos (19D, R₁, R₂ = NH); tioformacetilo (19E) y 3'-metilen-N-metilhidroxiamino (19F). Los tipos preferidos de oligómeros antisentido sin carga incluyen oligonucleótidos con enlaces alquilfosfonato, fosfotriéster y fosforamido o fosforodiamidato. En las Figuras 19A-G, B representa un componente de purina o pirimidina que forma pares de bases, eficaz para unirse, mediante enlaces de hidrógeno específicos de bases, a una base de un polinucleótido, preferiblemente seleccionada de entre adenina, citosina, guanina, timina y uracilo. Aunque las Figuras 19A-F representan anillos de desoxirribosa, las subunidades pueden comprender también, por ejemplo, anillos de ribosa sustituidos o anillos de morfolino, como se describió anteriormente.

En una realización preferida, el oligómero comprende subunidades de morfolino, por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, unidas por enlaces de tipo fosforodiamidato, como se muestra en la Figura 2B. En este caso, el componente cargado está preferiblemente fijado al átomo de fósforo del enlace a través del grupo lateral X, que es típicamente amino.

Por ejemplo, en la Figura 20 se muestra la preparación de un oligómero de morfolino con enlaces fosforodiamidato que tiene una cadena lateral de tipo amino modificada. Los PMOs se sintetizan convenientemente a través de subunidades de morfolino activadas en 5' que tienen protegido un nitrógeno morfolínico, como se muestra, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n° 5.185.444. Tales subunidades que tienen cadenas laterales de dialquilamino pueden almacenarse a baja temperatura durante meses antes de usarse (véase, por ejemplo, Summerton y Weller, *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.* 7: 187-195, 1997). Como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n° 5.378.841, dicha subunidad que tiene una cadena lateral de dimetilamino se preparó por reacción de la subunidad de 5'-hidroxi-morfolino N-protegida, con diclorofosfato de dimetilamino (POCl₂N(CH₃)₂). Tales dicloruros fosforamídicos N-sustituidos (POCl₂NRR') pueden prepararse por reacción de la amina deseada, es decir, dimetilamina-HCl en este caso, con oxiclورو de fósforo.

30 Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

Materiales y Métodos

Síntesis de Péptidos y Morfolinos

Todos los péptidos fueron sintetizados, por encargo, por Global Peptide Services (Ft. Collins, Colorado, EE.UU.) o en AVI BioPharma (Corvallis, Oregon, EE.UU.) y se purificaron hasta una pureza > 90% (véase el Ejemplo 2 posterior). Los PMOs se sintetizaron en AVI BioPharma conforme a métodos conocidos, como se describe, por ejemplo, en Summerton y Weller, 1993, 1997, y la Patente de EE.UU. n° 5.185.444.

Cultivo Celular

HeLa pLuc/705 (Kang, Cho *et al.* 1998) es la línea celular HeLa S3 transfectada de manera estable con un plásmido que lleva la secuencia que codifica luciferasa interrumpida por un intrón 2 mutado de β-globina humana (Gene Tools, Philomath, Oregon, EE.UU.). Otras líneas celulares se obtuvieron de la ATCC (Manassas, Virginia, EE.UU.). Todas las líneas celulares se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con glutamina 2 mM, 100 µg/ml de estreptomina, 100 U/ml de penicilina (DME/F12) y suero bovino fetal (FBS, del inglés "fetal bovine serum") (Hyclone, Ogden, Utah, EE.UU.) al 10%. Todos los ensayos se llevaron a cabo con células en crecimiento exponencial en medios de cultivo que contenían suero bovino fetal (FBS) al 10% a menos que se especifique otra cosa.

Microscopía de Fluorescencia

Se sembraron las células en una placa de 48 pocillos. Al día siguiente se retiró el medio acondicionado y se añadieron a los pocillos las sustancias de ensayo en medio fresco. Tras la incubación, las células se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés "phosphate-buffered saline") tres veces y se visualizaron directamente en el medio de cultivo con un microscopio invertido Nikon Diaphot 300. Las imágenes se capturaron con una cámara digital Olympus conectada a un ordenador usando el software MagnaFire (Optronics, Goleta, California, EE.UU.).

Fluorometría

Células HeLa pLuc/705 sembradas en una placa de 48 pocillos fueron tratadas con medio que contenía la sustancia de ensayo. Tras la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS.

5 Para medir la suma de la fluorescencia unida a membrana y la internalizada, las células se lisaron directamente en los pocillos por adición de 100 µl de tampón de lisis celular (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) a cada pocillo. Se recogieron los lisados celulares. La fluorescencia total se determinó mezclando 20 µl de lisado celular y 80 µl de Na₂CO₃ 0,1 M (pH de 11) y midiendo con un lector de microplacas para fluorescencia/luminiscencia Flx 800 con excitación a 485 nm y emisión a 524 nm.

10 Para medir el conjugado internalizado, el conjugado unido a membrana se eliminó por tratamiento con tripsina, del modo siguiente. Se añadió tripsina (100 µl, 10%, Hyclone, Logan, Utah, EE.UU.) a cada pocillo y se incubó durante 6 minutos a 37 °C, y a continuación se añadieron 300 µl de medio de cultivo. Las células se centrifugaron y se lavaron con PBS y luego se lisaron con 100 µl de tampón de lisis celular. La fluorescencia del lisado celular se midió como se describió anteriormente.

Citometría de Flujo

15 Para analizar por citometría de flujo la internalización de los conjugados de péptido-PMO marcados con fluoresceína, se trataron células HeLa pLuc/705 en una placa de 48 pocillos con medio que contenía la sustancia de ensayo. Tras la incubación, se lavaron tres veces las células con PBS y se añadieron 100 µl de tripsina (véase arriba) a cada pocillo, y a continuación se incubó durante 6 minutos a 37 °C y luego se añadieron 300 µl de medio de cultivo. Las células se centrifugaron y se lavaron una vez con PBS y luego se suspendieron en 500 µl de un tampón que contenía PBS con FBS al 1% y NaN₃ al 0,2%. Los datos de flujo se recogieron usando un citómetro BD FACSCalibur™, y los datos se analizaron usando FCS Express 2 (De Novo Software, Thornhill, Ontario, Canadá).

Ensayos de traducción libres de células

25 Plásmidos. Se subclonó la secuencia que codifica la luciferasa de luciérnaga (fLUC) en el sitio de clonación múltiple del plásmido pCi-Neo (Promega), en los sitios *SalI* y *NotI*, y el plásmido resultante se denominó pCNlucr. Posteriormente se subclonaron dos regiones de nucleótidos diferentes del virus tipo 2 del dengue (DEN2, número de entrada en GenBank AY037116) en los sitios *NheI* y *SalI* de pCNlucr. Esto colocó las secuencias de DEN2 inmediatamente cadena arriba del codón de iniciación del gen fLUC. Se construyeron dos plásmidos diferentes: pCNDEN3'CsLucr, que contenía los nucleótidos 10.606 a 10.646 de DEN2, y pCNDEN5'CsLucr, que contenía los nucleótidos 119 a 161 de DEN2. Los PMOs dirigidos a estas regiones (DEN3'CS y DEN5'CS) se indican en la Tabla 1 como ID. SEC. números 7 y 6, respectivamente.

30 Se construyó en el mismo vector (pCNlucr) una construcción similar usando una porción del genoma del virus de la hepatitis murina (MHV), insertando los nucleótidos 188 a 230 de MHV (número de entrada de GenBank AF029248) en los sitios *NheI* y *SalI* de pCNlucr. Este fragmento de MHV contiene los nucleótidos -22 a +21 con relación a la "A" del AUG del gen *Orf1a* de MHV y genera una proteína de fusión con el gen informador de luciferasa. El PMO que se dirige a esta región es la ID. SEC. n° 9.

35 Se preparó una cuarta construcción plasmídica (pDCLD) usando un vector derivado de pUC que colocaba una porción mayor de la secuencia de DEN2 (número de entrada de GenBank U87411, nucleótidos 1 a 204), que contenía el extremo 5' de la secuencia que codifica la poliproteína de DEN2, inmediatamente cadena arriba y en marco con el gen fLUC. Un PMO que se dirige a esta región (DEN AUG) se indica como ID. SEC. n° 8 en la Tabla 1. El PMO DEN AUG se dirige al codón de iniciación de la poliproteína de DEN2 y su diana está resaltada en la Figura 29 (nucleótidos 87-106).

45 Se creó una quinta construcción plasmídica con una región de 30 pares de bases que rodea el codón de iniciación ATG del gen c-myc humano (5'-AGCCTCCC GCGACGATGCCCCCTCAACGTTA-3', ID. SEC. n° 42, número de entrada de GenBank V00568), subclonada en los sitios *NheI* y *SalI* de pCNlucr y denominada pCNmycluc. Esto colocó las secuencias que codifican c-myc en marco con las secuencias codificadoras de aminoácidos del gen fLUC (c-myc:fLUC). Un PMO que se dirige a esta región de c-myc, denominado AVI-4126, se indica como ID. SEC. n° 5.

Transcripción y traducción. Todos los plásmidos descritos anteriormente incluyen el promotor de la RNA polimerasa de T7 cadena arriba de las secuencias virales:fLUC y permiten que se produzca RNA a partir de estos plásmidos, tras linearizarlos con *NotI* o *SnaBI*, usando el kit y el protocolo Megascript (Ambion) basados en la polimerasa de T7.

50 Se llevaron a cabo traducciones *in vitro* usando RNA transcrito, en una concentración final de 1 nM en cada mezcla de reacción, con 12 µl de lisado de reticulocitos de conejo tratados con nucleasa (Promega), además de PMO, R₉F₂-PMO o agua. La mezcla de reacción de traducción (10 µl) se mezcló luego con 50 µl del reactivo para ensayo de luciferasa (Promega) según las instrucciones del fabricante, y se leyó la emisión de luz en un luminómetro FLx800 para microplacas (BIO-TEC Instruments). Se examinaron las reacciones en cuanto a unidades relativas de luz con el programa KC Junior (BIO-TEC) usando la función de luminiscencia y un ajuste de sensibilidad de 125. En los experimentos aquí descritos, se examinaron doce reacciones al mismo tiempo, incluyendo las reacciones testigo con agua en el primer y último pocillo de cada fila. Las unidades relativas de luz (RLU) producidas por cada reacción

se normalizaron a la media de todas las reacciones testigo y se expresaron bien como el porcentaje de inhibición de la expresión de luciferasa o bien como unidades relativas de luz en función de la concentración de PMO, como se describe en el Ejemplo 8.

Digestión por Proteasa de los Conjugados de Péptido-PMO

5 Los experimentos para medir la resistencia de los conjugados de péptido-PMO a la digestión por proteasa se realizaron del modo siguiente. Se colocó proteinasa K (10 unidades) en 0,1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH de 7,2), CaCl₂ 5 mM, y se añadieron 40 µg de conjugado de péptido-PMO (R₉F₂-C-705) (ID. SEC. n° 13-C-ID. SEC. n° 1). Después de 5 minutos o 2 horas a 37 °C, las muestras se congelaron en nieve carbónica hasta su análisis por espectroscopía de masas MALDI-TOF.

10 Ejemplo 1. Incorporación de fluoresceína 3' a un PMO

Se disolvió una carboxifluoresceína protegida y activada, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida y dipivalato de 6-carboxifluoresceína, comercialmente disponible de Berry & Associates, Inc. (Dexter, Michigan, EE.UU.), en NMP (0,05 M) y se añadió la disolución a una columna de síntesis de PMOs (véase "Síntesis de Morfolinos", más atrás) en un volumen suficiente para cubrir la resina. La mezcla se incubó a 45 °C durante 20 minutos, y luego se purgó la columna y se añadió una segunda porción similar de carboxifluoresceína protegida y activada a la columna y se incubó a 45 °C durante 60 minutos. La columna se purgó y se lavó con NMP, y el oligómero se escindió de la resina usando 1 ml de disolución de escisión (ditiotreitól 0,1 M en NMP que contenía trietilamina al 10%). La resina se lavó tres veces con 300 µl de disolución de escisión, e inmediatamente se añadieron 4 ml de hidróxido de amonio concentrado y se incubó 16 horas a 45 °C para retirar los grupos protectores de las bases. El oligómero de morfolino se precipitó añadiendo 8 volúmenes de acetona, la mezcla se centrifugó y el sedimento se lavó con 15 ml de CH₃CN. El sedimento lavado se disolvió de nuevo en 4 ml de H₂O y se liofilizó. El producto se analizó por espectrometría de masas MALDI-tiempo de vuelo (MALDI-TOF, del inglés "time of flight") y cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC, del inglés "high pressure liquid chromatography").

Ejemplo 2. Síntesis Peptídica y Ligación del Péptido de Transporte

25 Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis peptídica en fase sólida de tipo Fmoc, a la que se hace referencia en la presente memoria como SPPS (del inglés "Solid Phase Peptide Synthesis"). Se utilizó 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 típico de síntesis comenzaba con la desprotección N-terminal mediante piperidina al 20%. A continuación, los aminoácidos protegidos con N-α-Fmoc se copulaban con la cadena peptídica creciente por activación con hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU, del inglés "2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate") en presencia de N,N-diisopropiletilamina (DIEA). Las cadenas laterales de arginina se protegieron con el grupo protector 2,2,4,6,7-pentametilidihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf), la cisteína con tritilo, y las cadenas laterales de lisina con t-butoxicarbonilo (Boc). El ciclo se repitió hasta que se añadieron todos los aminoácidos, en dirección carboxilo a amino, en la secuencia deseada. La escisión de la resina de síntesis y la desprotección de las cadenas laterales se llevaron a cabo simultáneamente tratando la peptidil-resina con una disolución de H₂O 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 usando un exceso de diez volúmenes de éter dietílico.

Para la purificación se usó HPLC de intercambio catiónico fuerte utilizando la resina Source 15S (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, EE.UU.), lo que fue seguido de una desalación en fase inversa empleando la resina Amberchrom 300M (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, Pennsylvania, EE.UU.). Los péptidos desalados se liofilizaron y se analizaron para determinar su identidad y pureza por espectrometría de masas (MS, del inglés "mass spectrometry") MALDI-TOF, HPLC de intercambio catiónico fuerte (SCX) y electroforesis capilar (CE, del inglés "capillary electrophoresis").

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

Se prepararon secuencias peptídicas que contenían cadenas laterales con grupos amina, tales como rTat y pTat (Tabla 1), usando el grupo protector 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)etilo (Dde) de cadenas laterales con grupos amina. Los grupos lisina-Dde resistieron la escisión de la resina y la desprotección de otros grupos protectores de cadenas laterales de aminoácidos. Las aminas de las cadenas laterales permanecen enmascaradas por Dde durante la conjugación con el PMO y se desprotegen posteriormente por tratamiento con hidrazina al 2% en

DMF.

La ligación en 5' de un péptido de transporte a través de un enlace de tipo amida se realizó del modo siguiente. Se preparó un éster benzotriazolílico-péptido C-terminalmente reactivo disolviendo el péptido-ácido (15 micromoles), HBTU (14,25 micromoles) y HOBt (15 micromoles) en 200 μ l de NMP y añadiendo DIEA (22,5 micromoles). Inmediatamente después de la adición de DIEA, la disolución peptídica se añadió a 1 ml de una disolución 12 mM de 3'-acetil-PMO, funcionalizado en 5' con piperazina, en DMSO. Después de 180 minutos a 30 °C, la mezcla de reacción se diluyó con exceso de agua a cuatro veces su volumen. El conjugado crudo se purificó primero a través de una columna de intercambio catiónico débil de CM-Sepharose (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.), para retirar el PMO no conjugado, y seguidamente a través de una columna de fase inversa (columna HLB, Waters, Milford, Massachusetts, EE.UU.). El conjugado se liofilizó y se analizó por MS-MALDI-TOF, HPLC SCX y CE.

Ejemplo 3. Acetilación en 3' del PMO y ligación en 5' del péptido de transporte

Se añadió anhídrido acético (0,1 M), disuelto en N-metil-2-pirrolidinona (NMP) que contenía N-etil-morfolina al 1% (v/v), a un producto de síntesis de PMO mientras el oligómero estaba todavía unido a la resina de síntesis. Después de 90 minutos a temperatura ambiental, el oligómero se lavó con NMP, se escindió de la resina de síntesis, y se procesó del modo descrito anteriormente. El producto se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-TOF) y HPLC. El producto deseado incluía un grupo acetilo en posición 3' y se protegió en su extremo 5' con piperazina, que se usó para la conjugación, como se describe más adelante y se muestra en la Figura 4A.

El reactivo conector, éster de N-(γ -maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBS), se disolvió en 50 μ l de DMSO, y la disolución se añadió al oligómero (2-5 mM) en tampón de fosfato sódico (50 mM, pH de 7,2) en una relación molar de PMO/GMBS de 1:2. La mezcla se agitó a temperatura ambiental en oscuridad durante 30 minutos, y el producto se precipitó usando un exceso de 30 volúmenes de acetona y seguidamente se disolvió de nuevo en agua. El aducto de PMO-GMBS se liofilizó y se analizó por MALDI-TOF y HPLC. Se disolvió luego el aducto en tampón de fosfato (50 mM, pH de 6,5, EDTA 5 mM) que contenía CH₃CN al 20% y se añadió el péptido de transporte, en una relación molar de péptido a PMO de 2:1 (basada en una concentración de PMO determinada por su absorbancia a 260 nm). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiental en oscuridad durante 2 horas. El conjugado se purificó primero a través de una columna de intercambio catiónico de CM-Sepharose (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.), para retirar el PMO no conjugado, y seguidamente a través de una columna de fase inversa (columna HLB, Waters, Milford, Massachusetts, EE.UU.). El conjugado se liofilizó y se analizó por MALDI-TOF y electroforesis capilar (CE). El producto final contenía aproximadamente un 70% de material que correspondía al PMO de longitud completa conjugado con el péptido de transporte, componiéndose el resto de conjugados de secuencias más cortas, una pequeña cantidad de PMO no conjugado, tanto de longitud completa como en fragmentos, y una cantidad muy pequeña (aproximadamente un 2%) de péptido no conjugado. La determinación de concentración usada en todos los experimentos se basó en la absorbancia total a 260 nm, incluyendo todas las secuencias de PMO más cortas en la muestra.

Ejemplo 4. Ligación en 3' del péptido de transporte

Se disolvió un PMO que tenía una amina secundaria libre (nitrógeno del anillo de morfolina) en el extremo 3' (véase la Figura 4B) en tampón de fosfato sódico 100 mM, pH de 7,2, para obtener una disolución 2-5 mM. El reactivo conector, GMBS, se disolvió en 100 μ l de DMSO y se añadió a la disolución de PMO en una proporción de PMO/GMBS de 1:2. La mezcla se agitó a temperatura ambiental en oscuridad durante 30 min y seguidamente se pasó a través de una columna de filtración en gel P2 (Biorad) para retirar el exceso de GMBS y los subproductos de la reacción.

El aducto GMBS-PMO se liofilizó y se disolvió de nuevo en tampón de fosfato 50 mM, pH de 6,5, para obtener una disolución 2-5 mM. Se añadió un péptido de transporte, representado por T-SH en la Figura 4B, a la disolución de GMBS-PMO en una proporción molar de péptido a PMO de 2:1. (El tiol -SH es la cadena lateral de un único resto de cisteína.) La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiental durante 2 horas o a 4 °C durante una noche. El conjugado se purificó haciéndolo pasar a través de una columna de filtración en gel de Excellulose (Pierce Chemical) para retirar el exceso de péptido, a continuación a través de una columna de intercambio catiónico de CM-Sepharose (Sigma) para retirar el PMO no conjugado, y finalmente a través de una columna de fase inversa Amberchrom (Rohm and Haas) para retirar la sal. El conjugado se liofilizó y se caracterizó por MS y HPLC.

Ejemplo 5. Preparación de un conjugado de PMO-péptido que tiene un conector escindible

Se repite el procedimiento del Ejemplo 3 o el Ejemplo 4, empleando 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) o succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (SMPT) como reactivo conector (véase la Figura 4C), en lugar de GMBS.

Ejemplo 6. Incorporación de conjugados de PMO-péptido marcados

Se transfectaron de manera estable células HeLa con el plásmido pLuc/705, que tiene un gen de luciferasa interrumpido por un intrón de la β -globina humana mutado en el nucleótido 705, causando así un corte y empalme

incorrectos (Kang *et al.*, 1998; Kole *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2002). Debido a que los transcritos cortados y empalmados incorrectamente no producen proteínas informadoras funcionales, no se observan señales del informador a menos que se induzca el corte y el empalme de tipo silvestre con un oligómero corrector del corte y el empalme. Un oligómero antisentido que se dirige al sitio de corte y empalme 705 (que tiene la ID. SEC. n° 1, también denominada "PMO 705"), cuando se suministra eficazmente, corrige el corte y empalme y permite la expresión de la luciferasa.

Este ensayo permite medir la capacidad de los oligómeros bloqueadores estéricos para entrar en las células y los núcleos, bloquear el corte y empalme incorrectos del pre-mRNA y ocasionar así la expresión de un gen informador. Evita la confusión de la citotoxicidad con la actividad, que puede afectar a los ensayos de infraregulación, ya que las células deben ser capaces de llevar a cabo el procesamiento y traducción del RNA para producir una señal. Debido a que los oligómeros deben entrar en las células y en los núcleos de las células para producir una señal en el ensayo, resulta muy útil para medir la incorporación y la eficacia de los componentes de suministro. Además, como no hay señal, o hay muy poca, antes de la corrección del corte y empalme, el ensayo tiene unas relaciones favorables de señal frente a ruido. Estas lecturas inequívocamente positivas permiten hacer comparaciones cuantitativas convenientes entre los efectos de diferentes transportadores sobre el suministro del oligómero (Moulton *et al.*, 2003, Astriab-Fisher *et al.*, 2002).

Se estudió por espectroscopía de fluorescencia el transcurso de la incorporación de varios conjugados de PMO-transportador-fluoresceína, como se describió anteriormente, en células HeLa pLuc/705. Los experimentos se realizaron generalmente por triplicado. Según el procedimiento general, se añadió el medio de cultivo que contenía la sustancia de ensayo en una concentración especificada a células HeLa pLuc/705 sembradas en una placa de 48 pocillos. Tras la incubación, en cada tiempo, las células se lavaron con PBS tres veces, y el lisado celular se recogió como se describe en el anterior apartado "Fluorometría". La cantidad de luciferasa funcional producida se determinó mezclando 30 µl de lisado celular y 50 µl del Reactivo para Ensayo de Luciferasa (LAR, del inglés "Luciferase Assay Reagent") (Promega, Wisconsin, EE.UU.) y midiendo la producción de luz usando un lector de microplacas para fluorescencia/luminiscencia Flx 800 (Bio-tek, Vermont). Las unidades relativas de luz se normalizaron a µg de proteína determinados por el método del ácido bicínico (BCA, del inglés "bicinchonic acid"), siguiendo el procedimiento del fabricante (Pierce, Illinois, EE.UU.).

Ejemplo 7. Preparación de PMO que tiene enlaces intersubunitarios modificados

A. Preparación de $\text{Cl}_2\text{P}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$

Se pone a reflujo durante 12 horas una suspensión que contiene 0,1 moles de $\text{RNH}_2\text{-HCl}$, donde $\text{R} = -(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ (por ejemplo, hidrocloreto de 2-aminoetilguanidina; donde $n = 2$), en 0,2 moles de oxiclورو de fósforo (POCl_3) y seguidamente se destila bajo presión reducida para obtener la diclorofosforamida N-sustituida.

B. Preparación de la subunidad de morfolino activada

Se disuelve un milimol de una subunidad 5'-hidroxilada, con bases protegidas y tritilada en el nitrógeno del morfolino (Estructura 1, Figura 20), preparada por métodos estándares (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 5.378.841), en 5 ml de diclorometano. Se añaden seis milimoles de N-etilmorfolina y 2 milimoles de $\text{Cl}_2\text{P}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$, preparado como se describió anteriormente, y a continuación 0,5 milimoles de N-metilimidazol. Cuando la reacción ha terminado, según se evalúa por cromatografía en capa fina, la mezcla de reacción se lava con NaH_2PO_4 acuoso y se concentra. El residuo se separa en fracciones en una columna de gel de sílice, eluyendo con acetona/cloroformo en proporción 1:4, para obtener la subunidad activada (Estructura 2, Figura 20).

C. Oligomerización

El monómero 2 activado se hace reaccionar con una subunidad unida a un soporte por el O en 5' para obtener el dímero 3 unido al soporte. El dímero se somete a destritilación y se hace reaccionar de manera similar con más subunidades activadas, preparadas del modo descrito anteriormente.

Ejemplo 8. Los PMOs conjugados con péptidos presentan propiedades de bloqueo estérico potenciadas en reacciones de traducción libres de células en comparación con el PMO no conjugado

Para investigar la actividad antisentido de los conjugados de manera independiente del transporte celular, se examinaron PMOs conjugados con péptidos y no conjugados en un sistema de traducción libre de células para determinar su capacidad para bloquear estéricamente la traducción de un gen informador cadena abajo.

Se midió el efecto de varios PMOs antisentido y de conjugados de PMO y péptido sobre la traducción *in vitro* de RNA libre de células, RNA transcrito *in vitro* a partir de plásmidos que contenían varias secuencias nucleotídicas víricas directamente fusionadas cadena arriba de la región codificadora de la luciferasa de luciérnaga (fLUC), en un sistema de lisados de reticulocitos de conejo (RRL). Como se muestra en las Figuras 21-23, la conjugación de R_9F_2 (ID. SEC. n° 13) con los PMOs aumentó la eficacia de los PMOs antisentido por un factor comprendido entre 10 y

500, basado en la concentración requerida para alcanzar un 50% de inhibición de la expresión de la diana. Las Figuras 21-23 representan los resultados de estos análisis usando tres regiones diferentes del virus de tipo 2 del dengue fusionadas con el gen fLUC, como se describió anteriormente en Materiales y Métodos. Se sabe que la región del genoma de RNA del virus del dengue usada en la construcción pDCLD tiene abundante estructura secundaria (Khromykh, Kondratleva *et al.*, 2003), como se muestra en la Figura 29.

Una construcción plasmídica con una región de 30 pares de bases que rodea el codón de iniciación ATG del gen c-myc humano se puso en marco con las secuencias codificadoras de aminoácidos del gen fLUC (c-myc:fLUC). Un PMO que se dirige a esta región de c-myc, AVI-4126, se indica como ID. SEC. n° 5. La Figura 28 muestra el efecto antisentido potenciado que la conjugación del péptido (RAhxR)₄ confiere al PMO de c-myc en el sistema de RRL para traducción *in vitro*.

También se obtuvieron resultados dirigiéndose a una secuencia de MHV que rodea el codón de iniciación del gen 1ab (Neuman, B. W. *et al.*, J. Virol. (2004), en imprenta). En todos los casos descritos anteriormente, la conjugación con R₉F₂ potenció la eficacia antisentido del PMO en comparación con el PMO no conjugado por un factor tan alto como 500.

Ejemplo 9. Los péptidos de transporte que contienen aminoácidos artificiales muestran suministro potenciado a células, actividad antisentido potenciada y resistencia a la proteólisis enzimática

Se investigaron la incorporación celular y la actividad antisentido, usando el ensayo de corrección del corte y empalme en la posición 705 descrito en el Ejemplo 6, para varios conjugados de la invención que comprendían PMOs conjugados con péptidos que contenían dímeros de aminoácidos catiónicos alternando con ácido 6-aminohexanoico (Ahx). En la Figura 24 se muestran los datos para una diversidad de tales conjugados que emplean péptidos de transporte que contienen Ahx (ID. SEC. números 33-35 y 37-41). La Figura 24 muestra el nivel de producción de luciferasa en células HeLa pLuc/705 tras 24 horas de tratamiento con cada una de las siguientes composiciones: el PMO (705-FL, ID. SEC. n° 1) conjugado con R₉F₂ (ID. SEC. n° 13), (RRAhx)₄ (ID. SEC. n° 33), (RAhxR)₄ (ID. SEC. n° 34), (AhxRR)₄ (ID. SEC. n° 35), (RAhxR)₃ (ID. SEC. n° 37), (RAhxR)₂R (ID. SEC. n° 38), (RAhxR)₂ (ID. SEC. n° 39), (RKAhx)₄ (ID. SEC. n° 40), o (RHAhx)₄ (ID. SEC. n° 41). Se observó que los péptidos de transporte que contenían Ahx, que tenían al menos ocho restos de arginina, actuaban tan bien o mejor que R₉F₂ en este ensayo.

Se investigó también la sensibilidad a proteasa de los péptidos de transporte del modo siguiente. Cada uno de los conjugados de péptido-PMO, R₉F₂-705-FL y (RAhxR)₄-705-FL, se mezcló con proteinasa K en 100 µl de tampón de Tris 50 mM, CaCl₂ 5 mM. La muestra se incubó a 37 °C durante 5 minutos o, en un análisis diferente, durante 2 horas, y seguidamente se colocó sobre nieve carbónica hasta su análisis por espectroscopía de masas MALDI-TOF. Los resultados se muestran en las Figuras 25 y 26, respectivamente.

La Figura 25 muestra que el péptido de transporte que contenía todos los aminoácidos naturales, R₉F₂-C (pico de peso molecular a 8331), no era resistente a la degradación por proteinasa K ya que se convertía rápidamente en el PMO libre de péptido (pico de peso molecular a 6632). El conjugado de R₉F₂-C-PMO también era sensible a la degradación por tripsina (datos no mostrados). La Figura 26 muestra que el péptido de transporte que contenía Ahx, (RAhxR)₄ (pico de peso molecular a 8332), era resistente a la degradación por proteinasa K.

Ejemplo 10. Distribución y biodisponibilidad *in vivo* del PMO conjugado con Péptido en comparación con el PMO no conjugado

Los resultados en cultivo tisular de varios sistemas experimentales demuestran claramente que los péptidos de transporte descritos en la presente memoria potencian el suministro a compartimentos intracelulares, incluyendo el citoplasma y el núcleo. Para ampliar estas observaciones a un sistema *in vivo*, se realizó un análisis comparativo de incorporación de PMO y de PMO conjugado con péptido a células de bazo y ganglio linfático de ratones.

Se inyectaron por vía intravenosa (vena de la cola) 0,5 ml de PBS que contenía 150 µg de un PMO marcado en 3' con fluoresceína (secuencia revuelta DSscr, 5'-AGT CTC GAC TTG CTA CCT CA-3'-FL; ID. SEC. n° 10) o del mismo PMO conjugado con R₅F₂R₄ (ID. SEC. n° 20) a través de un conector de cisteína en el extremo 5' (R₅F₂R₄-C-DSscr-FL), a hembras de ratón Y10A de nueve meses de edad (F1 de B10.A y A.B1; dos ratones por tratamiento). Después de 24 horas, se sacrificaron los ratones, se extrajeron el bazo y cuatro ganglios linfáticos de cada ratón, y se prepararon suspensiones celulares individuales y se analizaron sin teñir para detectar la fluorescencia por citometría de flujo. El aparato se configuró para detectar linfocitos por dispersión frontal/lateral.

La Figura 27 muestra que las células tanto de los bazos como de los ganglios linfáticos presentaban una incorporación sustancialmente mayor del PMO conjugado con péptido (R₅F₂R₄-PMO-FL) en comparación con el PMO no conjugado (PMO-FL). Además, los esplenocitos se teñieron para detectar subpoblaciones diferentes de linfocitos mediante marcadores de la superficie celular específicos (CD4 y CD8 para linfocitos, CD19 para células B y CD11b para monocitos/macrófagos). Se realizó un análisis citométrico de flujo de los linfocitos teñidos para detectar la fluorescencia del PMO marcado con fluoresceína. Todas estas subpoblaciones mostraron una

incorporación potenciada del PMO conjugado con péptido en comparación con el PMO no conjugado, como se muestra en la Figura 27.

5 El efecto de múltiples inyecciones de PMO conjugado con péptido sobre la incorporación relativa y el tiempo de permanencia *in vivo* se analizó del modo siguiente. Se inyectaron por vía intravenosa (vena de la cola) 150 µg de R₅F₂R₄-C-DSscr-FL a hembras de ratón Y10A de nueve meses de edad (n = 3) los días 0, 3, 5 y 7. Once días después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se prepararon suspensiones celulares individuales a partir del bazo y cuatro ganglios linfáticos de cada ratón. El análisis citométrico de flujo sin tinción de ambas preparaciones celulares se realizó como se describió anteriormente. Un porcentaje sustancial tanto de esplenocitos (6,6% ± 2,6) como de linfocitos (4,3% ± 0,7) resultó positivo con respecto a la incorporación de R₅F₂R₄-C-DSscr-FL.

10

Tabla de Lista de Secuencias

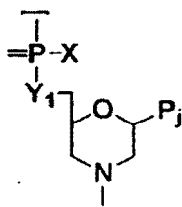
Denominación	Secuencia (5' a 3' o N-terminal a C-terminal)	ID. SEC. n°
705	5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA - acetilo-3'	1
705-FL	5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA - fluoresceína-3'	1
705 _{2MM}	5'- CCT CTT AAC TCC GTT ACA - acetilo-3'	2
705 _{4MM}	5'- CCT ATT AAC TCC GTT CCA - acetilo-3'	3
705 _{SCR}	5'-CTC TCT CAC CAT TGA CAT - acetilo-3'	4
c-myc	5'- ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC-acetilo-3'	5
DEN5'CS	5'- CGT TTC AGC ATA TTG AAA GG-3'	6
DEN3'CS	5'- CCC AGC GTC AAT ATG CTG-3'	7
DEN AUG	5'- GGT TAT TCA TCA GAG ATC TG-3'	8
MHV lab	5'- GCC CAT CTT TGC CAT TAT GC-3'	9
DSscr	5'-AGT CTC GAC TTG CTA CCT CA-3	10
pTat	CYGRKKRRQRRR	11
rTat	RRRQRRKKR	12
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	13
2d-R ₉ F ₂	_D RRRRRRRRRFF (isómero mixto)	14
D-R ₉ F ₂	_D R _D R _D R _D R _D R _D R _D R _D R _D R _D R _D F _D F _D (isómero D)	15
R ₉ CF ₂	RRRRRRRRRCFF	16
R ₈ CF ₂ R	RRRRRRRRRCFFR	17
R ₆ CF ₂ R ³	RRRRRRRCFFRRR	18
R ₅ FCFR ₄	RRRRRRCFFRRRR	19
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	20
R ₄ CF ₂ R ₅	RRRRCFFRRRRR	21
R ² CF ₂ R ⁷	RRCCFFRRRRRRR	22
CF ₂ R ₉	CCFFRRRRRRRRR	23
CR ₉ F ₂	CRRRRRRRRRFF	24
F ₂ R ₉	FFRRRRRRRRR	25
R ₅ F ₂ CF ₂ R ₄	RRRRRFFCFFRRRR	26
R ₉ I ₂	RRRRRRRRRII	27
R ₈ F ₃	RRRRRRRRRFFF	28
R ₉ F ₄	RRRRRRRRRFFFF	29
R ₈ F ₂	RRRRRRRRRFF	30
R ₆ F ₂	RRRRRRRFF	31
R ₅ F ₂	RRRRRFF	32
(RRAhx) ₄	RRAhxRRAhxRRAhxRRAhx	33
(RAhxR) ₄	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	34
(AhxRR) ₄	AhxRRAhxRRAhxRRAhxRR	35

(RAhx) ₆	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx	36
(RAhxR) ₃	RAhxRRAhxRRAhxR	37
(RAhxR) ₂ R	RAhxRRAhxRR	38
(RAhxR) ₂	RAhxRRAhxR	39
(RKAhx) ₄	RKAhxRKAhxRKAhxRKAhx	40
(RHAhx) ₄	RHAhxRHAhxRHAhxRHAhx	41
región ATG de c-myc humano	AGCCTCCCGCGACGATGCCCTCAACGTTA	42

Se describen también los puntos siguientes:

- 5 1. Un método para potenciar la capacidad de un análogo de ácido nucleico, que tiene una cadena principal sustancialmente no cargada y una secuencia de bases de direccionamiento, para unirse a una secuencia diana de un ácido nucleico, método que comprende conjugar al análogo de ácido nucleico un péptido que consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, que incluye al menos seis subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, donde > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y donde
 - 10 (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α-aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde 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 ;
 - 15 (b) cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro $-C(O)-(CHR)_n-NH-$, donde (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 de entre alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada de entre alquilo, alqueno y alquino sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada cuatro átomos de carbono; y
 - 20 (c) cada subunidad Z representa independientemente un aminoácido seleccionado de entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina.
2. El método del punto 1, en donde dicho péptido, cuando está conjugado con un oligómero antisentido que tiene dicha cadena principal sustancialmente no cargada, es eficaz para potenciar la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana con respecto al oligómero antisentido en forma no conjugada, según se evidencia por:
 - 25 (i) una disminución de la expresión de una proteína codificada, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un codón de inicio de la traducción para la proteína codificada, o
 - (ii) un aumento de la expresión de una proteína codificada, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un sitio de corte y empalme aberrante en un pre-mRNA que codifica dicha proteína cuando es correctamente cortado y empalmado.
3. El método del punto 1, en donde dicho análogo de ácido nucleico se conjuga con dicho péptido a través de una subunidad Y, una subunidad de cisteína o un componente conector no aminoácido sin carga.
4. El método del punto 1, en donde dicha subunidad de aminoácido neutro $-C(O)-(CHR)_n-NH-$, donde n es de 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo, tiene la forma $-C(O)-(CH_2)_{n-1}(CHR)-NH-$.
5. El método del punto 1, en donde el péptido incluye al menos ocho subunidades X.
6. El método del punto 1, en donde dichas al menos dos subunidades Y incluyen
 - 35 (i) dos subunidades de α-aminoácido hidrófobo neutro que tienen cadenas laterales independientemente seleccionadas de entre alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral, cuando es seleccionada de entre alquilo, alqueno y alquino sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada seis átomos de carbono, y en donde dichas subunidades son contiguas o están flanqueando un componente conector, o
 - 40 (ii) dos subunidades de aminoácido hidrófobo neutro $-C(O)-(CH_2)_{n-1}(CHR)-NH-$, donde n es de 2 a 7 y R es H o metilo.
7. El método del punto 6, en donde cada X es una subunidad de arginina.

8. El método del punto 1, en donde el péptido tiene exactamente dos subunidades Y de tipo (i) que son contiguas o están flanqueando una subunidad de cisteína.
9. El método del punto 8, en donde cada Y representa una subunidad de α -aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de arilo o aralquilo.
- 5 10. El método del punto 9, en donde cada Y es independientemente seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina y valina.
11. El método del punto 9, en donde cada Y es independientemente seleccionado de entre fenilalanina y tirosina.
12. El método del punto 11, en donde el péptido tiene la fórmula Arg_9Phe_2 .
- 10 13. El método del punto 1, en donde cada Y es una subunidad de aminoácido hidrófobo neutro $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n-1}\text{CHR}-\text{NH}-$, donde n es de 2 a 7 y R es H.
14. El método del punto 13, en donde n es 5, por lo que Y es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico.
15. El método del punto 14, en donde cada X es una subunidad de arginina.
16. El método del punto 14, en donde dicho péptido comprende dímeros de arginina alternando con subunidades Y individuales.
- 15 17. El método del punto 16, en donde el péptido tiene la fórmula $(\text{RYR})_4$.
18. El método del punto 16, en donde el péptido tiene la fórmula $(\text{RRY})_4$ y el análogo de ácido nucleico está unido a una subunidad Y terminal.
19. El método del punto 1, en donde el análogo de ácido nucleico es un oligómero de morfolino que comprende subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo entre el nitrógeno morfolínico de una subunidad y un carbono exocíclico de la posición morfolínica 3 de una subunidad adyacente.
- 20 20. El método del punto 19, en donde dichas subunidades de morfolino están unidas por enlaces de tipo fosfordiamidato sin carga, de acuerdo con la estructura:



- 25 donde $Y_1=O$, $Z=O$, P_j es un componente de purina o pirimidina que forma pares de bases, eficaz para unirse, mediante un enlace de hidrógeno específico de bases, a una base de un polinucleótido, y X es alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo o alquilamino.
21. El método del punto 1, en donde dicha conjugación forma un conjugado de péptido-oligómero que es eficaz para:
- (a) inhibir la expresión de mRNA diana en un sistema de expresión proteica;
- (b) inhibir el corte y empalme de pre-mRNA diana; o
- 30 (c) inhibir la replicación de un virus, dirigiéndose a elementos que actúan en cis y controlan la replicación de ácido nucleico o la transcripción de mRNA del virus;

en mayor grado que dicho oligómero en forma no conjugada.

22. Un conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico, que comprende un análogo de ácido nucleico que tiene una cadena principal sustancialmente no cargada y una secuencia de bases de direccionamiento, y, covalentemente unido al análogo de ácido nucleico, un péptido que consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, que incluye al menos ocho subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en donde > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y donde
- 40 (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo una subunidad de α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $\text{R}^1\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{R}^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde R es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir

además oxígeno o nitrógeno; R¹ y R² pueden formar conjuntamente un anillo; y la cadena lateral está unida a dicha subunidad de aminoácido a través de R¹ o R²;

(b) dichas al menos dos subunidades Y incluyen

5 (i) dos subunidades de α-aminoácido neutro que tienen cadenas laterales independientemente seleccionadas de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada cuatro átomos de carbono, y en donde dichas subunidades son contiguas o están flanqueando un componente conector, o

10 (ii) dos subunidades de aminoácido hidrófobo neutro -C(O)-(CH₂)_{n-1}(CHR)-NH-, donde n es de 2 a 7 y R es H o metilo; y

(c) Z representa una subunidad de aminoácido seleccionada de entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina.

15 23. El conjugado del punto 22, en donde dicho péptido, cuando está conjugado con un oligómero antisentido que tiene dicha cadena principal sustancialmente no cargada, es eficaz para potenciar la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana con respecto al oligómero antisentido en forma no conjugada, según se evidencia por:

(i) una disminución de la expresión de una proteína codificada, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un codón de inicio de la traducción para la proteína codificada, o

20 (ii) un aumento de la expresión de una proteína codificada, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un sitio de corte y empalme aberrante en un pre-mRNA que codifica dicha proteína cuando es correctamente cortado y empalmado.

24. El conjugado del punto 22, en donde dicho péptido, cuando está conjugado con un oligómero antisentido que tiene dicha cadena principal sustancialmente no cargada, es eficaz para potenciar la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana con respecto al oligómero antisentido en forma no conjugada, según se evidencia por:

25 (i) una disminución de la expresión de una proteína codificada en un sistema de traducción libre de células, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un codón de inicio de la traducción para la proteína codificada, o

(ii) un aumento de la expresión de una proteína codificada en un sistema de traducción libre de células, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia diana es eficaz para bloquear un sitio de corte y empalme aberrante en un pre-mRNA que codifica dicha proteína cuando es correctamente cortado y empalmado.

30 25. El conjugado del punto 22, en donde dicho péptido es eficaz para potenciar el transporte del análogo de ácido nucleico en una célula con respecto al análogo en forma no conjugada.

26. El conjugado del punto 22, en donde dicho análogo de ácido nucleico se conjuga con dicho péptido a través de un componente conector seleccionado de entre una subunidad Y, una subunidad de cisteína y un componente conector no aminoácido sin carga.

35 27. El conjugado del punto 22, en donde, para cada X, el componente de cadena lateral es guanidilo.

28. El conjugado del punto 27, en donde cada X es una subunidad de arginina.

29. El conjugado del punto 22, en donde el péptido tiene exactamente dos subunidades Y de tipo (i) que son contiguas o están flanqueando una subunidad de cisteína.

40 30. El conjugado del punto 29, en donde cada Y representa una subunidad de α-aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de arilo o aralquilo.

31. El conjugado del punto 30, en donde cada Y es independientemente seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina y valina.

32. El conjugado del punto 31, en donde cada Y es independientemente seleccionado de entre fenilalanina y tirosina.

45 33. El conjugado del punto 32, que consiste en subunidades de arginina, subunidades de fenilalanina, un componente conector y el análogo de ácido nucleico.

34. El conjugado del punto 33, en donde el péptido tiene la fórmula Arg₉Phe₂.

35. El conjugado del punto 22, en donde cada Y es $-C(O)-(CH_2)_{n-1}(CHR)-NH-$, donde n es de 2 a 7 y R es H.

36. El conjugado del punto 35, en donde n es 5, por lo que Y es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico.

37. El conjugado del punto 36, en donde cada X es una subunidad de arginina.

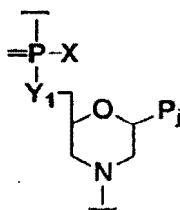
5 38. El conjugado del punto 36, en donde el péptido comprende dímeros de arginina alternando con subunidades Y individuales.

39. El conjugado del punto 38, en donde el péptido tiene la fórmula $(RYR)_4$.

40. El conjugado del punto 38, en donde el péptido tiene la fórmula $(RRY)_4$ y el análogo de ácido nucleico está unido a una subunidad Y terminal.

10 41. El conjugado del punto 22, en donde el análogo de ácido nucleico es un oligómero de morfolino que comprende subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo entre el nitrógeno morfolínico de una subunidad y un carbono exocíclico de la posición morfolínica 3 de una subunidad adyacente.

42. El conjugado del punto 41, en donde dichas subunidades de morfolino están unidas por enlaces de tipo fosfordiamidato sin carga, de acuerdo con la estructura:



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

43. El conjugado del punto 29, en donde dicho conjugado es eficaz para:

(a) inhibir la expresión de mRNA diana en un sistema de expresión proteica;

20 (b) inhibir el corte y empalme de pre-mRNA diana; o

(c) inhibir la replicación de un virus, dirigiéndose a elementos que actúan en cis y controlan la replicación de ácido nucleico o la transcripción de mRNA del virus;

en mayor grado que dicho oligómero en forma no conjugada.

44. El conjugado del punto 43, en donde dicha inhibición es en un sistema libre de células.

25 45. Un método para potenciar la incorporación celular de un agente farmacológico, método que comprende conjugar al agente un péptido que consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, que incluye al menos seis subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en donde $> 50\%$ de dichas subunidades son subunidades X, y donde

30 (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde 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 $-C(O)-(CHR)-NH-$, donde R es una cadena lateral neutra seleccionada de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada cuatro átomos de carbono; y

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

40 46. El método del punto 45, en donde dicho agente se conjuga con dicho péptido a través de una subunidad Y, una subunidad de cisteína o un componente conector no aminoácido sin carga.

47. El método del punto 45, en donde dichas al menos dos subunidades Y incluyen dos subunidades de α -aminoácido hidrófobo neutro que tienen cadenas laterales independientemente seleccionadas de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada seis átomos de carbono, y en donde dichas subunidades son contiguas o están flanqueando un componente conector.
48. El método del punto 47, en donde cada X es una subunidad de arginina.
49. El método del punto 45, en donde el péptido tiene exactamente dos subunidades Y que son contiguas o están flanqueando una subunidad de cisteína.
50. El método del punto 49, en donde cada Y representa una subunidad de α -aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de arilo o aralquilo.
51. El método del punto 50, en donde cada Y es independientemente seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina y valina.
52. El método del punto 51, en donde el péptido tiene la fórmula Arg_9Phe_2 .
53. Un conjugado que comprende un agente farmacológico covalentemente unido a un péptido, en donde el péptido consiste en de 8 a 16 subunidades seleccionadas de entre subunidades X, subunidades Y, y subunidades Z opcionales, que incluye al menos seis subunidades X, al menos dos subunidades Y y a lo sumo tres subunidades Z, en donde > 50% de dichas subunidades son subunidades X, y donde
- (a) cada subunidad X representa independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $\text{R}^1\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{R}^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde 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 ;
- (b) cada subunidad Y representa independientemente un aminoácido neutro $-\text{C}(\text{O})-(\text{CHR})-\text{NH}-$, donde R es una cadena lateral neutra seleccionada de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral neutra, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada cuatro átomos de carbono; y
- (c) cada subunidad Z representa independientemente un aminoácido seleccionado de entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina.
54. El conjugado del punto 53, en donde dicho péptido es eficaz para potenciar el transporte del agente en una célula con respecto al agente en forma no conjugada.
55. El conjugado del punto 53, en donde dicho agente se conjuga con dicho péptido a través de una subunidad Y, una subunidad de cisteína o un componente conector no aminoácido sin carga.
56. El conjugado del punto 53, en donde el péptido incluye al menos ocho subunidades X.
57. El conjugado del punto 53, en donde dichas al menos dos subunidades Y incluyen dos subunidades de α -aminoácido hidrófobo neutro que tienen cadenas laterales independientemente seleccionadas de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituidos o no sustituidos, en donde dicha cadena lateral, cuando es seleccionada de entre alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos, incluye a lo sumo un heteroátomo por cada seis átomos de carbono, y en donde dichas subunidades son contiguas o están flanqueando un componente conector.
58. El conjugado del punto 53, en donde, para cada X, el componente de cadena lateral es guanidilo.
59. El conjugado del punto 58, en donde cada X es una subunidad de arginina.
60. El conjugado del punto 53, en donde el péptido tiene exactamente dos subunidades Y que son contiguas o están flanqueando una subunidad de cisteína.
61. El conjugado del punto 60, en donde cada Y representa una subunidad de α -aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de arilo o aralquilo.
62. El conjugado del punto 61, en donde cada Y es independientemente seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina y valina.
63. El conjugado del punto 61, en donde cada Y es independientemente seleccionado de entre fenilalanina y tirosina.

64. El conjugado del punto 63, en donde el péptido tiene la fórmula Arg₉Phe₂.

5 65. Una composición para el suministro intracelular *in vivo* de un análogo de ácido nucleico sustancialmente no cargado, que comprende un conjugado como el proporcionado en el punto 1 y una suspensión de microburbujas que contienen gas insoluble en un vehículo acuoso que comprende al menos un compuesto filmógeno seleccionado de entre una proteína, un agente tensioactivo, un lípido, un polisacárido, y combinaciones de los mismos.

66. La composición del punto 65, en donde las microburbujas se suspenden en un vehículo acuoso que comprende albúmina, y el gas insoluble se selecciona del grupo que consiste en perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropano, perfluorobutano y perfluoropentano.

67. Una composición antisentido que tiene

10 (i) una pluralidad de subunidades conectadas por enlaces intersubunitarios y que soportan una secuencia de bases eficaz para hibridarse con un polinucleótido diana de secuencia complementaria, para formar un dúplex diana/antisentido; y

15 (ii) portado sobre al menos seis enlaces intersubunitarios contiguos, un componente cargado de estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH₂, NHR o NR₂, donde 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 dicha subunidad de aminoácido a través de R^1 o R^2 .

68. La composición del punto 67, en donde las subunidades son subunidades de morfolino y los enlaces son enlaces de tipo fosforodiamidato.

<110> AVI Biopharma, Inc.
Iversen, Patrick L
Moulton, Hong M.
Nelson, Michelle H.
5 Kroeker, Andrew D.
Stein, David A.

<120> Composiciones para potenciar el transporte de moléculas en células

10 <130> L2710 EP/1 S3

<150> US 60/466,703
<151> 2003-04-29

15 <160> 44

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
20 <211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
25 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

<400> 1
cctcttacct cagttaca
30 18

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
35 <213> Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

40 <400> 2
cctcttaact cagttaca
18

45 <210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

<400> 3
55 cctattaact cagttaca
18

<210> 4
<211> 18
60 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

5 <400> 4

ctctctcacc attgacat
18

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

<400> 5

acgttgaggg gcatcgtcgc
20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

30 <400> 6

cgtttcagca tattgaaagg
20

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

45 <400> 7

cccagcgtca atatgctg
18

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

55 <400> 8

ggttattcat cagagatctg
20

60

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"
 10 <400> 9
 gcccatcttt gccattatgc
 20
 15 <210> 10
 <211> 20 ,
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"
 <400> 10
 agttctgact tgctacctca
 25 20
 30 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"
 35 <400> 11
 Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10
 40 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"
 <400> 12
 50 Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
 1 5
 55 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <221> fuente
 60 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

ES 2 500 921 T3

<400> 13

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
1 5 10

5 <210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 14

15 Asp Arg Asp Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
1 5 10

20 <210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> fuente
25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 15

Asp Arg Asp Arg Asp Arg Asp Arg Asp Arg Asp Arg Asp Arg Asp Arg
1 5 10 15
Asp Arg Asp Phe Asp Phe Asp
20

30 <210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys Phe Phe
1 5 10

45 <210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 17

55 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys Phe Phe Arg
1 5 10

<210> 18
<211> 12

ES 2 500 921 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys Phe Phe Arg Arg Arg
10 1 5 10

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

20 <400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Cys Phe Arg Arg Arg Arg
1 5 10

25 <210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 20

35 Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 21
<211> 12
40 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> fuente
45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 21

Arg Arg Arg Arg Cys Phe Phe Arg Arg Arg Arg Arg
50 1 5 10

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

60 <400> 22

ES 2 500 921 T3

Arg Arg Cys Phe Phe Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 23
<211> 12
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 23

Cys Phe Phe Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

15 <210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

25 <400> 24

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
1 5 10

30 <210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 25

Phe Phe Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
40 1 5 10

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 26

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys Phe Phe Arg Arg Arg Arg
1 5 10

55 <210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>

ES 2 500 921 T3

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 27

5 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ile Ile
1 5 10

<210> 28
<211> 11
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> fuente
15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 28

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Phe
1 5 10

20 <210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

30 <400> 29

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Phe Phe
1 5 10

35 <210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
45 1 5 10

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

55 <400> 31
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
1 5

60 <210> 32
<211> 7

ES 2 500 921 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 32

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
10 1 5

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

20 <220>
<221> característica varia
<222> 3, 6, 9, 12
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

25 <400> 33

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa
1 5 10

30 <210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<220>
40 <221> característica varia
<222> 2, 5, 8, 11
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<400> 34

45 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

<210> 35
<211> 12
50 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> fuente
55 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<220>
<221> característica varia
<222> 1, 4, 7, 10
60 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<400> 35

ES 2 500 921 T3

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg
1 5 10

5 <210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

15 <220>
<221> característica varia
<222> 2, 4, 6, 8, 1C, 12
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<400> 36

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa
20 1 5 10

25 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

35 <220>
<221> característica varia
<222> 2, 5, 8
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<400> 37

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
40 1 5

45 <210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: proteína de transporte sintética"

55 <220>
<221> característica varia
<222> 2, 5
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<400> 38

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg
60 1 5

<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 500 921 T3

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

10 <220>
<221> característica varia
<222> 2, 5
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

15 <400> 39

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5

20 <210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

30 <220>
<221> característica varia
<222> 3, 6, 9, 12
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

35 <400> 40

Arg Lys Xaa Arg Lys Xaa Arg Lys Xaa Arg Lys Xaa
1 5 10

40 <210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

50 <220>
<221> característica varia
<222> 3, 6, 9, 12
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

55 <400> 41

Arg His Xaa Arg His Xaa Arg His Xaa Arg His Xaa
1 5 10

60 <210> 42
<211> 30
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

65 <400> 42

agcctcccg c gacgatgcc ctcaacgtta 30

70 <210> 43
<211> 12

ES 2 500 921 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

<400> 43

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys
10 1 5 10

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido de transporte sintético"

20 <220>
<221> característica varia
<222> 2, 5, 8, 11, 13
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

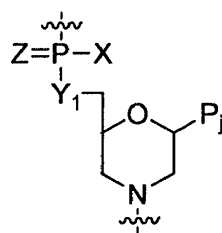
25 <220>
<221> característica varia
<222> 14
<223> beta-alanina

30 <400> 44

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Ala
35 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico, que comprende un péptido covalentemente unido a un análogo de ácido nucleico, análogo de ácido nucleico que comprende una cadena principal sustancialmente no cargada y una secuencia de bases de direccionamiento, y péptido que consiste en de ocho a dieciséis subunidades y que comprende al menos seis subunidades X, al menos dos subunidades Y y hasta tres subunidades Z opcionales, donde > 50% de las subunidades son subunidades X, en donde
- (a) cada subunidad X es independientemente arginina o un análogo de arginina, siendo el análogo de arginina un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR_2 , donde R es alquilo inferior o alqueno inferior y comprende opcionalmente oxígeno o nitrógeno, o R^1 y R^2 pueden formar conjuntamente un anillo; y en donde la cadena lateral está unida al aminoácido a través de R^1 o R^2 ;
- (b) las al menos dos subunidades Y comprenden dos subunidades de α -aminoácido hidrófobo neutro que comprenden una cadena lateral de alquilo, alqueno, alquino, arilo o aralquilo sustituida o no sustituida, en donde la cadena lateral de alquilo, alqueno o alquino incluye a lo sumo un heteroátomo por cada seis átomos de carbono, y en donde las subunidades Y son contiguas o están flanqueando un componente conector; y
- (c) cada subunidad Z representa independientemente una subunidad de aminoácido seleccionada de entre alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina;
- en donde el péptido está opcionalmente unido al análogo de ácido nucleico a través de un conector seleccionado de entre:
- (i) una subunidad de cisteína;
- (ii) un componente conector no aminoácido sin carga;
- (iii) un α -aminoácido hidrófobo neutro que comprende una cadena lateral de alquilo, alqueno, alquino, arilo o aralquilo sustituida o no sustituida, en donde la cadena lateral de alquilo, alqueno o alquino incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos átomos de carbono; y
- (iv) un aminoácido hidrófobo neutro que tiene la estructura siguiente:
- $$-C(O)-(CH_2)_{n-1}(CHR)-NH-$$
- en donde n es de 2 a 7 y R es H o metilo.
2. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 1, en donde el péptido está unido al análogo de ácido nucleico a través de un conector que comprende uno o más aminoácidos artificiales que tienen la estructura siguiente:
- $$-C(O)-(CH_2)_n-NH-$$
- en donde n es de 2 a 7.
3. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 2, en donde el conector comprende una subunidad de β -alanina, una subunidad de ácido 6-aminohexanoico o combinaciones de las mismas.
4. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 1, en donde cada subunidad Y es fenilalanina.
5. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 1, en donde cada subunidad X es arginina.
6. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 1, en donde el péptido tiene la secuencia identificada como ID. SEC. n° 13 o ID. SEC. n° 20.
7. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 1, en donde el análogo de ácido nucleico es un oligómero de morfolino que comprende subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo entre el nitrógeno morfolínico de una subunidad y un carbono exocíclico de la posición morfolínica 3 de una subunidad adyacente.
8. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 7, en donde las subunidades de morfolino están unidas por enlaces que contienen fósforo según la estructura:



en donde:

Y_1 es O;

Z es O;

5 X es alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo o alquilamino; y

P_j es un componente de purina o pirimidina que forma pares de bases, eficaz para unirse a una base de un polinucleótido mediante enlace de hidrógeno específico de bases.

9. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 8, en donde X es dimetilamino.

10. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 7, en donde el péptido está unido al extremo 5' o el extremo 3' del análogo de ácido nucleico.

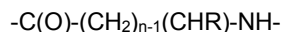
11. Un conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico, que comprende un péptido covalentemente unido a un análogo de ácido nucleico, análogo de ácido nucleico que comprende una cadena principal sustancialmente no cargada y una secuencia de bases de direccionamiento, y péptido que comprende la secuencia identificada como ID. SEC. n° 12, 13 o 20, en donde el péptido está opcionalmente unido al análogo de ácido nucleico a través de un conector seleccionado de entre:

(i) una subunidad de cisteína;

(ii) un componente conector no aminoácido sin carga;

(iii) un α -aminoácido hidrófobo neutro que comprende una cadena lateral de alquilo, alqueno, alquino, arilo o aralquilo sustituida o no sustituida, en donde la cadena lateral de alquilo, alqueno o alquino incluye a lo sumo un heteroátomo por cada dos átomos de carbono; y

(iv) un aminoácido hidrófobo neutro que tiene la estructura siguiente:



en donde n es de 2 a 7 y R es H o metilo.

12. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 11, en donde el péptido está unido al análogo de ácido nucleico a través de un conector que comprende uno o más aminoácidos artificiales que tienen la estructura siguiente:

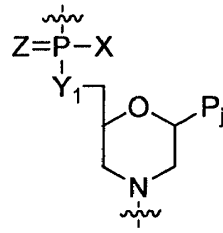


en donde n es de 2 a 7.

13. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 12, en donde el conector comprende una subunidad de β -alanina, una subunidad de ácido 6-aminohexanoico o combinaciones de las mismas.

14. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 11, en donde el análogo de ácido nucleico comprende un análogo de ácido nucleico morfolínico, análogo de ácido nucleico morfolínico que comprende subunidades de morfolino unidas por enlaces que contienen fósforo, enlaces que contienen fósforo que unen el nitrógeno morfolínico de una subunidad de morfolino con un carbono exocíclico de la posición morfolínica 3 de una subunidad de morfolino adyacente.

15. El conjugado de péptido-análogo de ácido nucleico de la Reivindicación 14, en donde la subunidades de morfolino están unidas por enlaces que contienen fósforo según la estructura:



en donde

Y_1 es O;

Z es O;

5 X es alquilo, alcoxilo, tioalcoxilo o alquilamino; y

P_j es un componente de purina o pirimidina que forma pares de bases, eficaz para unirse a una base de un polinucleótido mediante enlace de hidrógeno específico de bases.

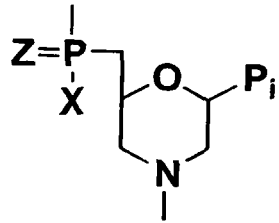


Fig. 1A

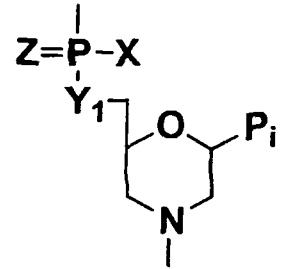


Fig. 1B

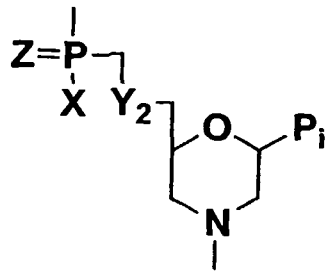


Fig. 1C

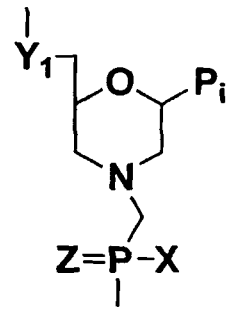


Fig. 1D

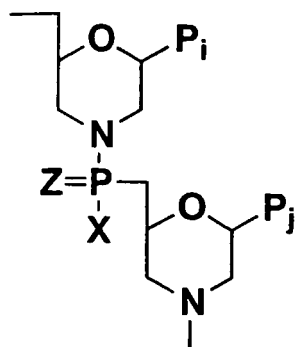


Fig. 2A

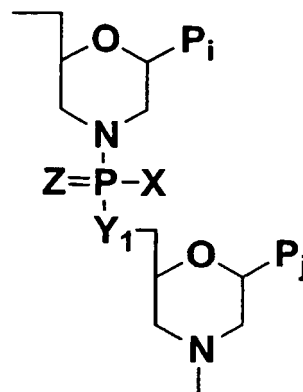


Fig. 2B

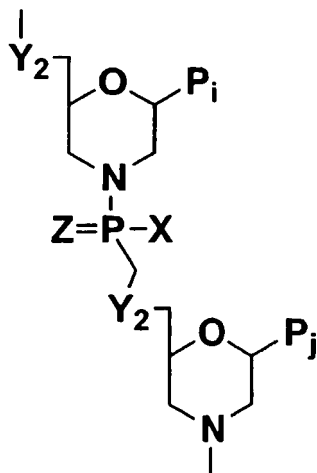


Fig. 2C

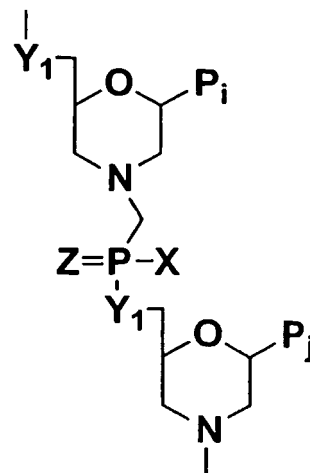


Fig. 2D

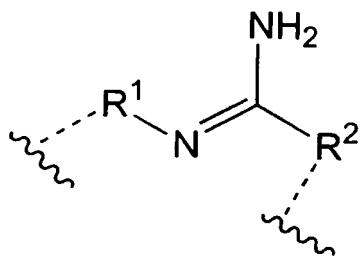


Fig. 3A

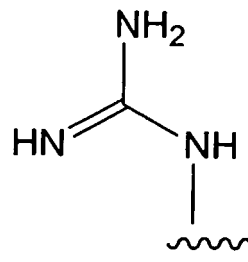


Fig. 3B

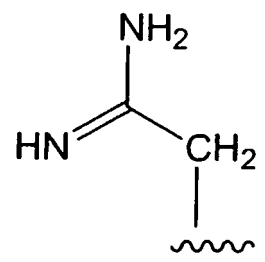


Fig. 3C

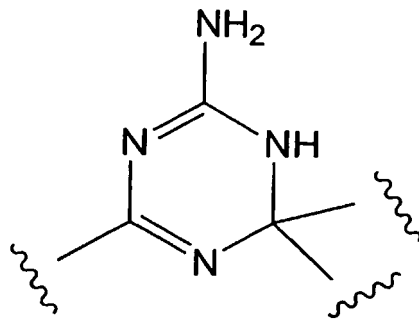


Fig. 3D

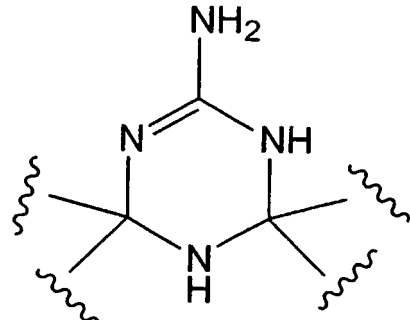


Fig. 3E

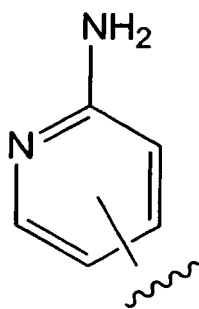


Fig. 3F

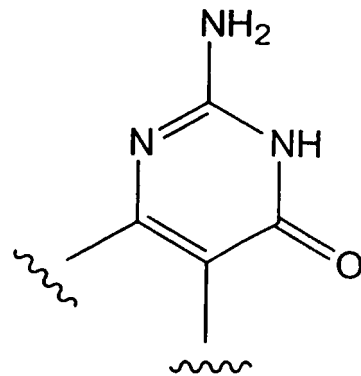


Fig. 3G

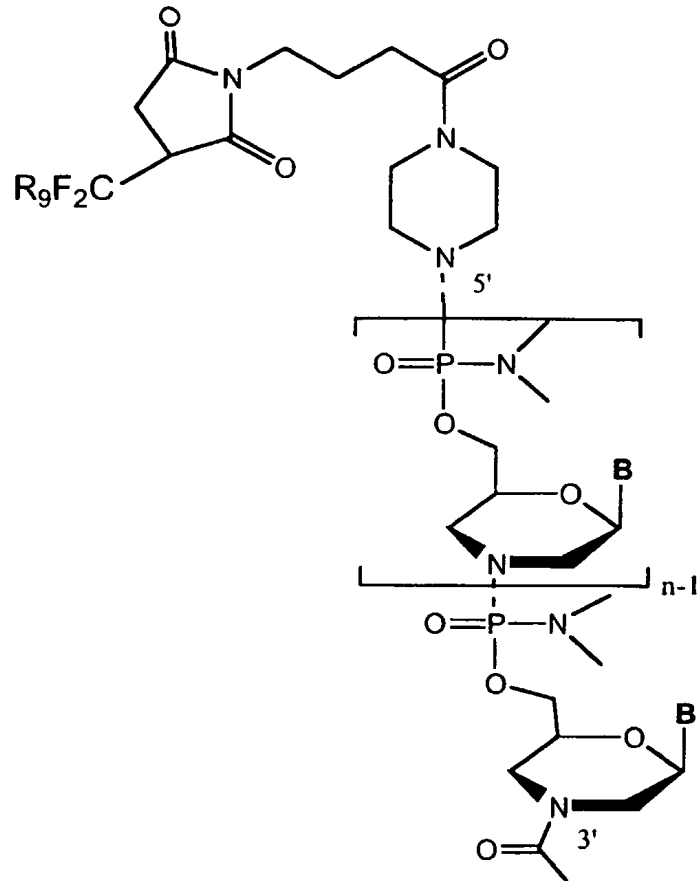


Fig. 4A

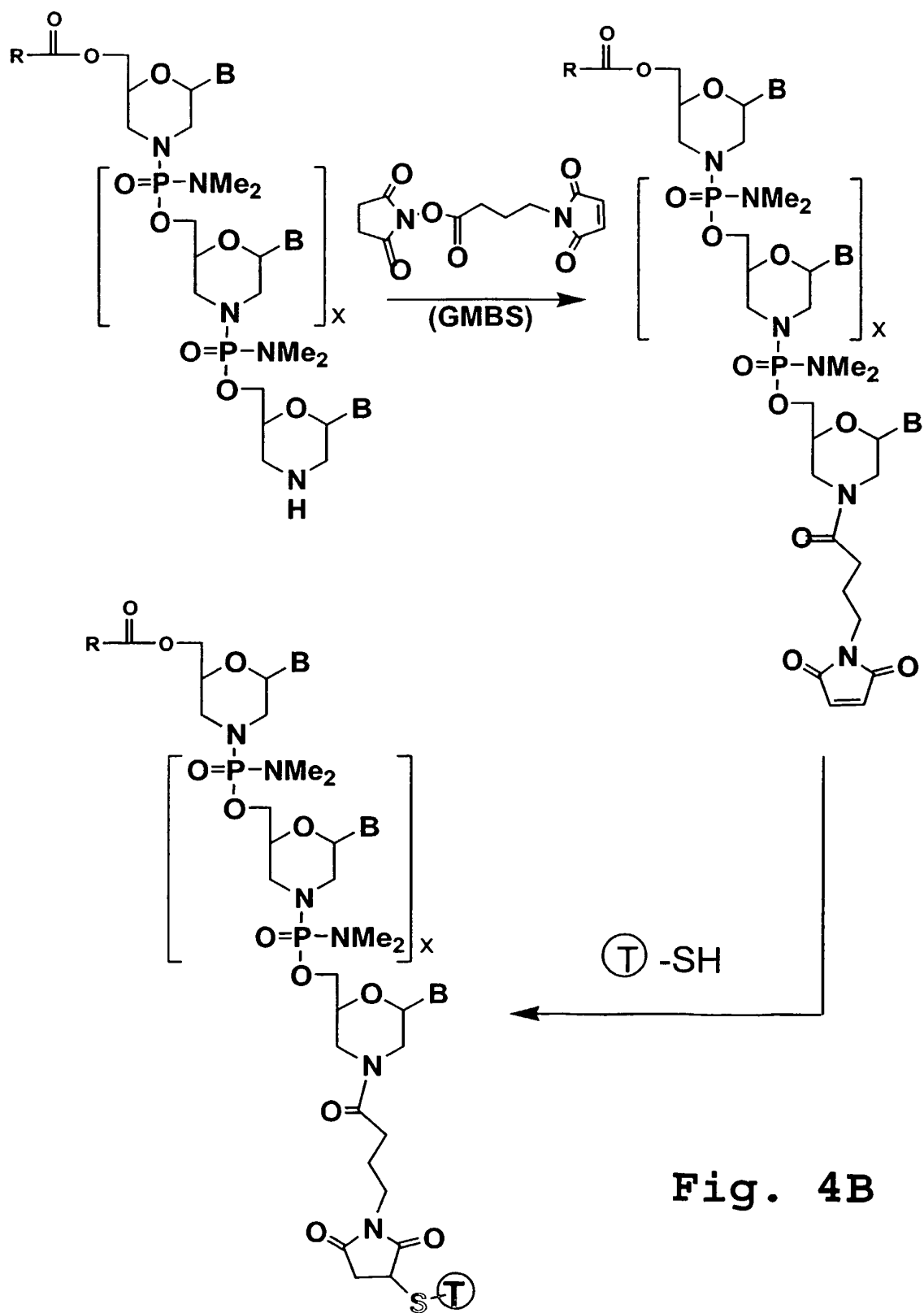


Fig. 4B

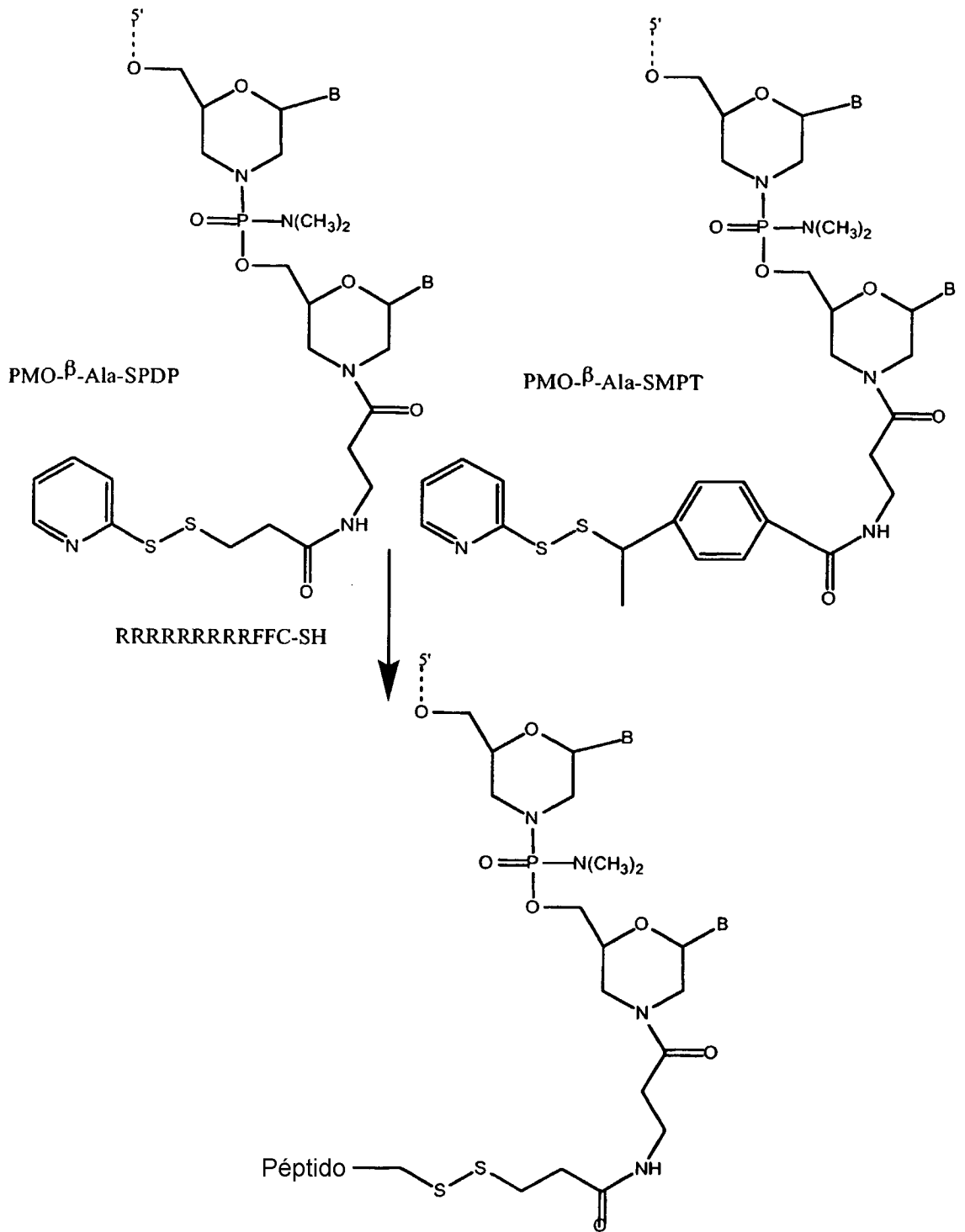


Fig. 4C

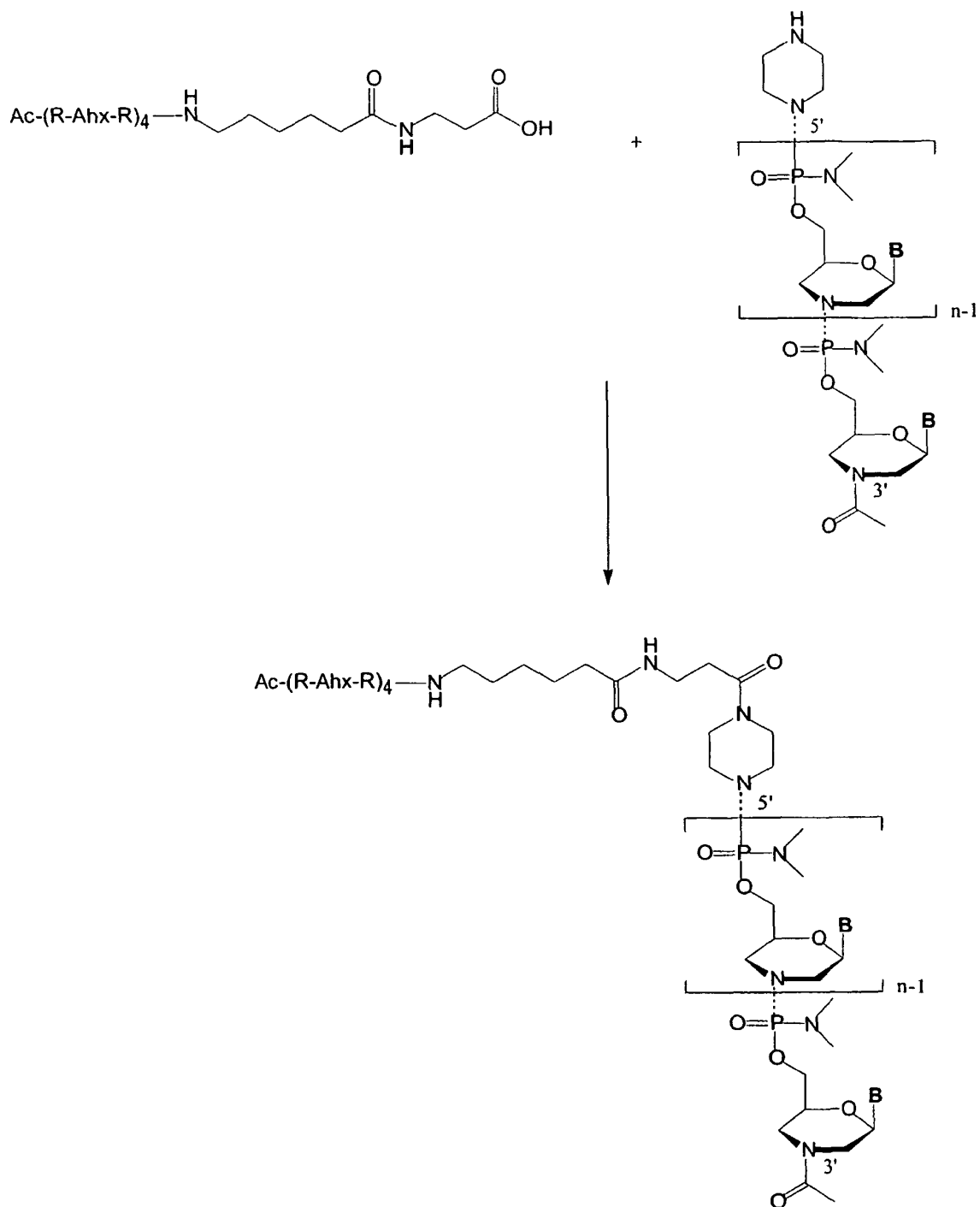


Fig. 4D

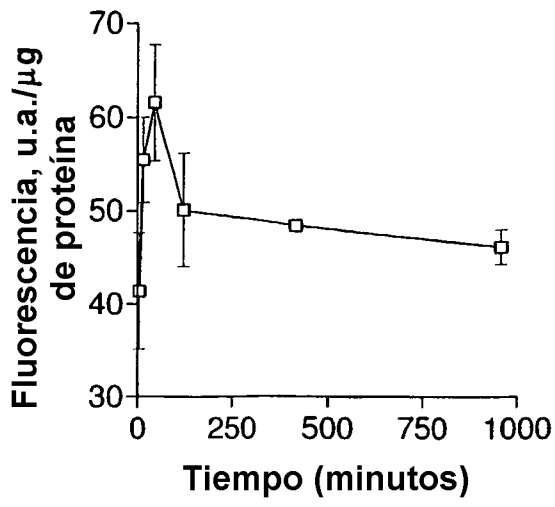


Fig. 5A

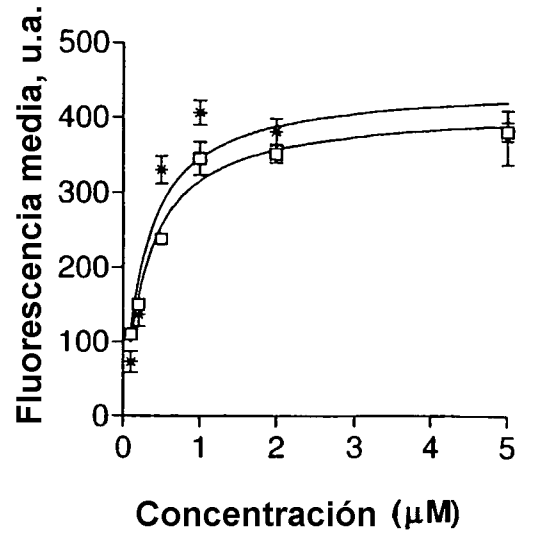


Fig. 5B

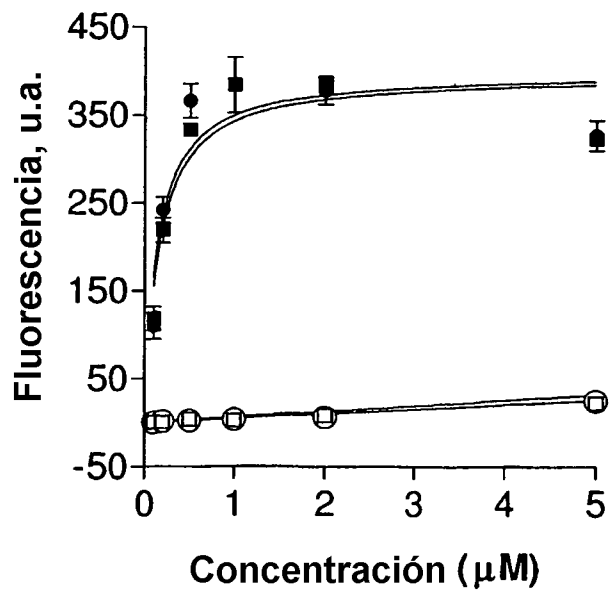


Fig. 6

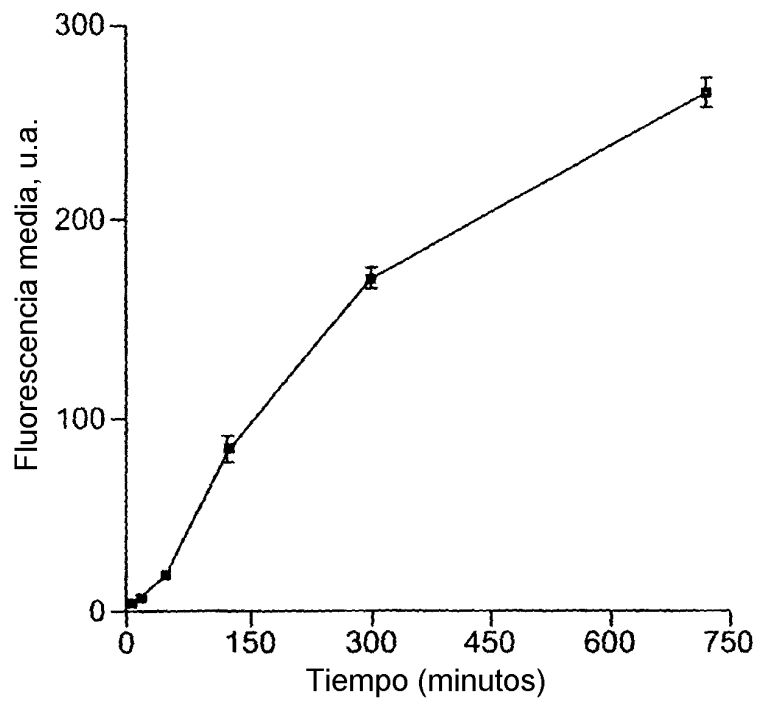


Fig. 7A

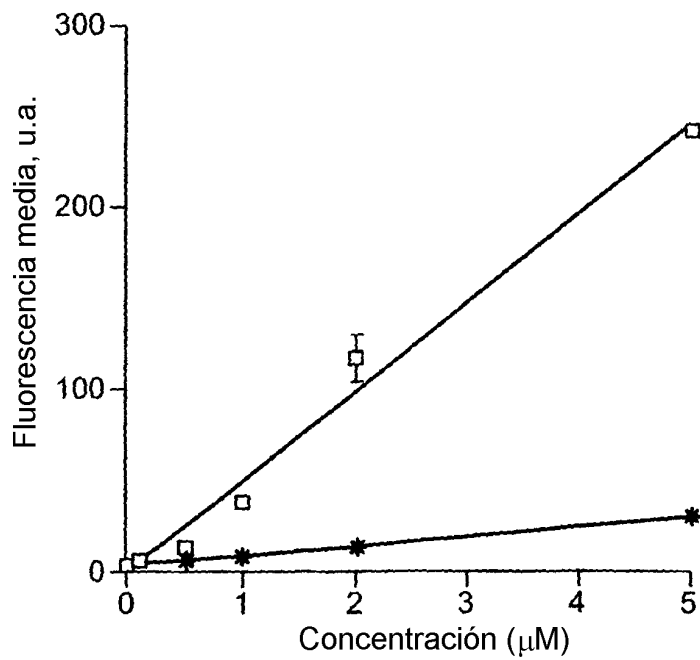


Fig. 7B

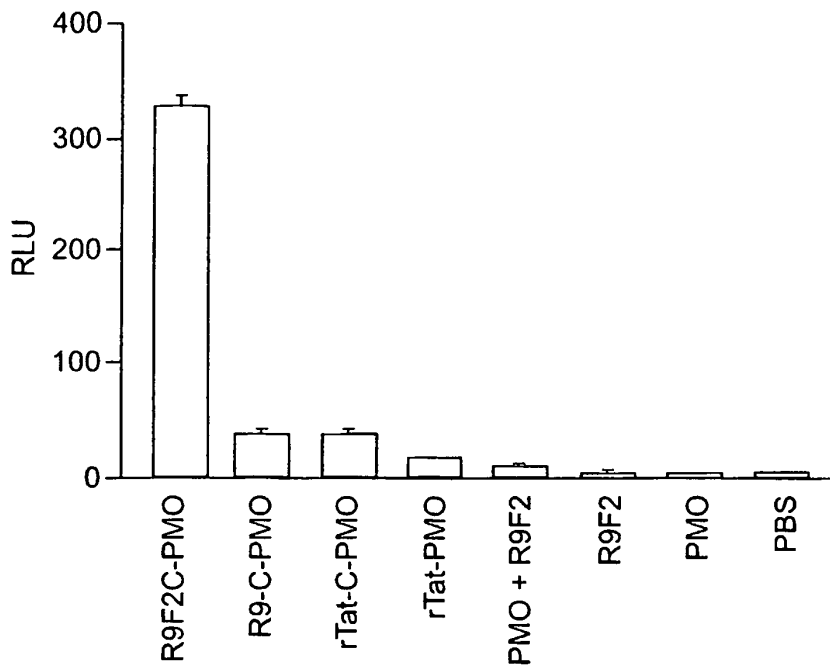


Fig. 8

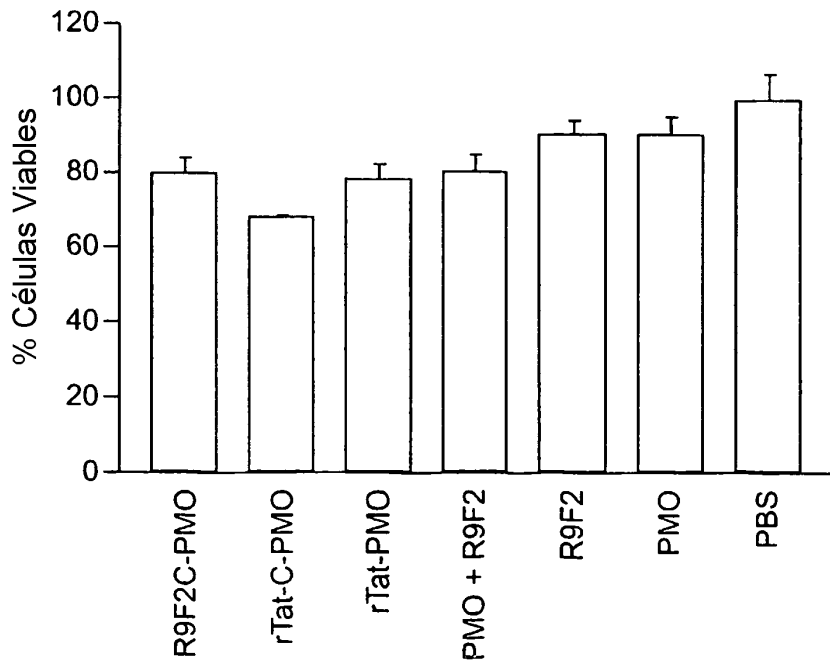


Fig. 9

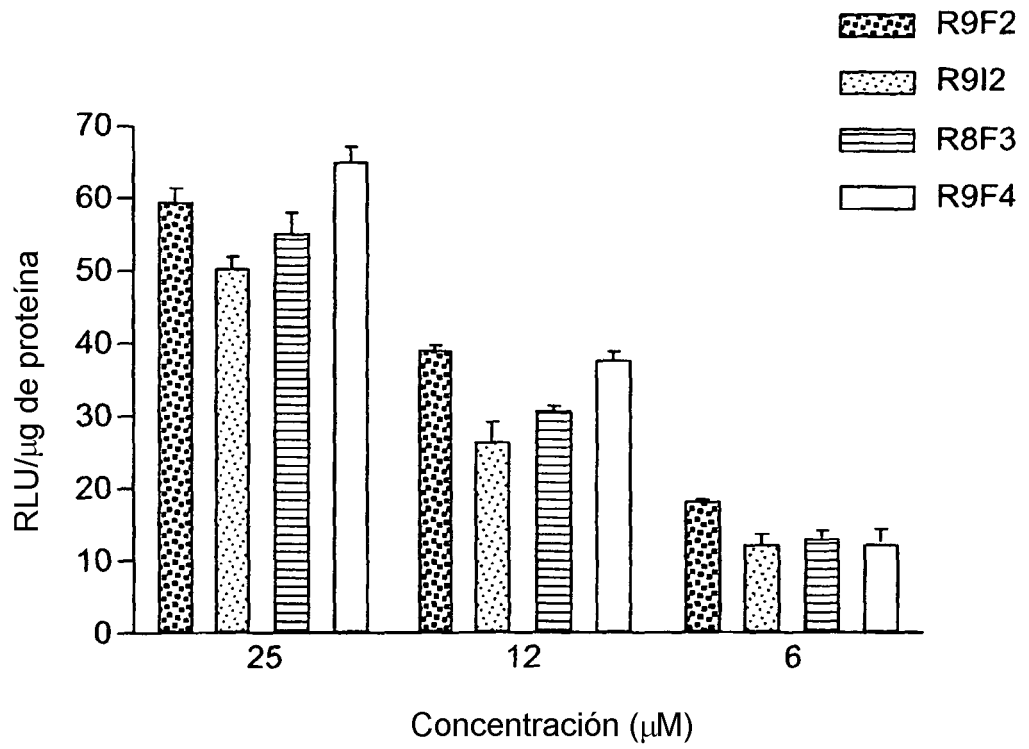


Fig. 10

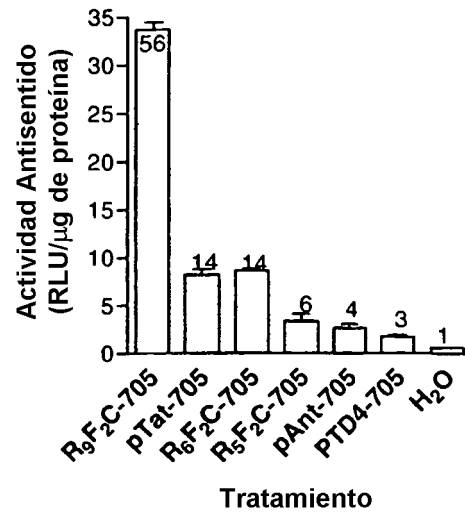


Fig. 11A

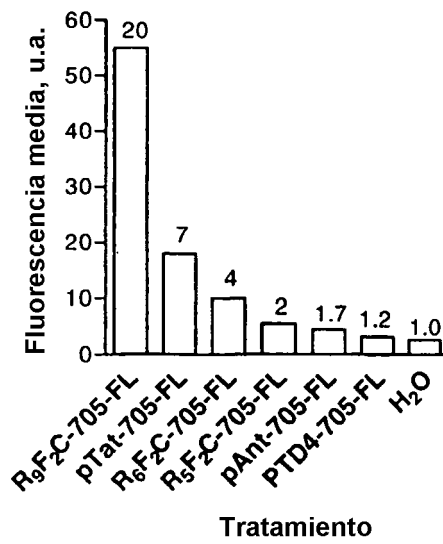


Fig. 11B

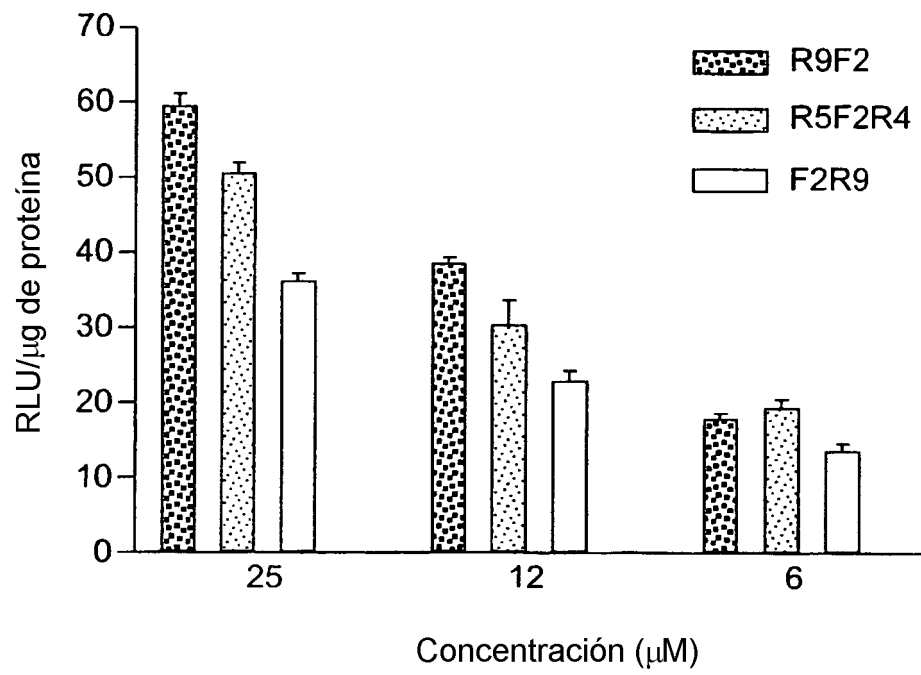


Fig. 12

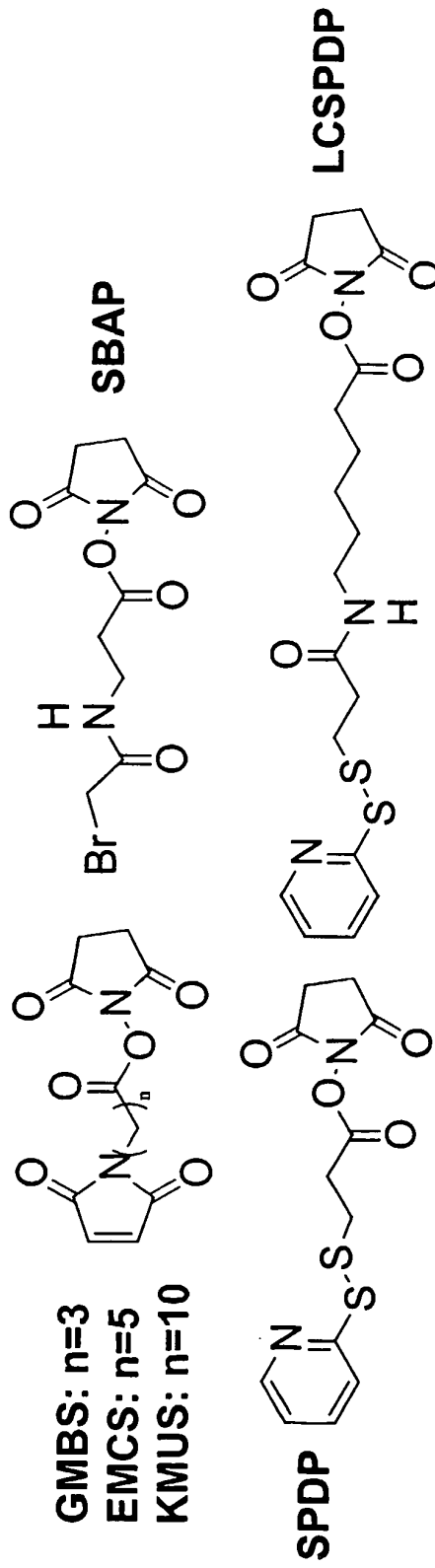


Fig. 13

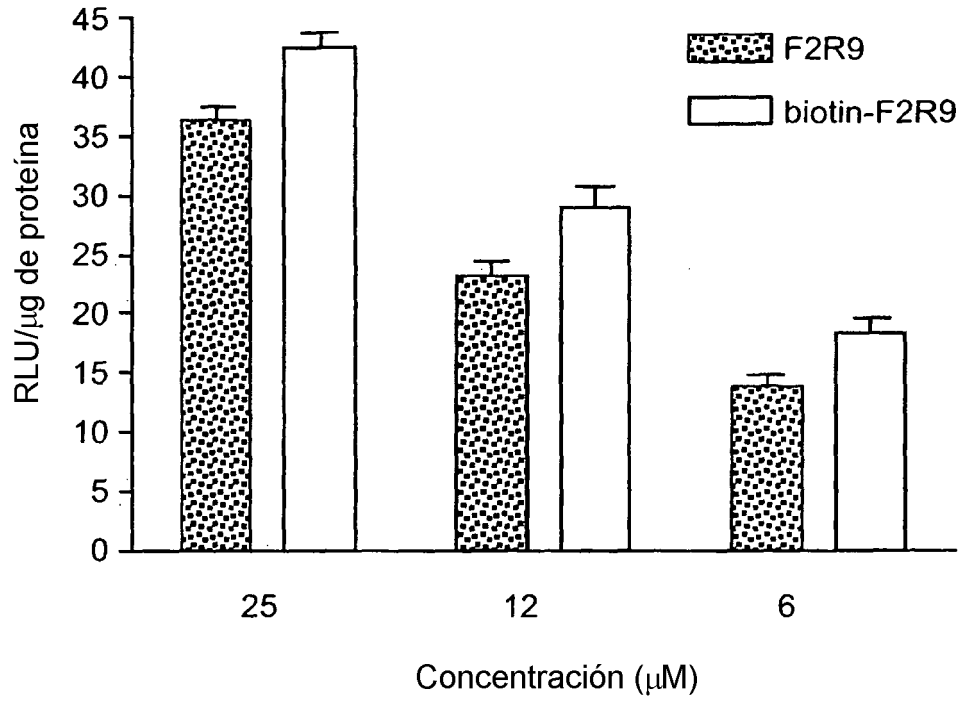


Fig. 14

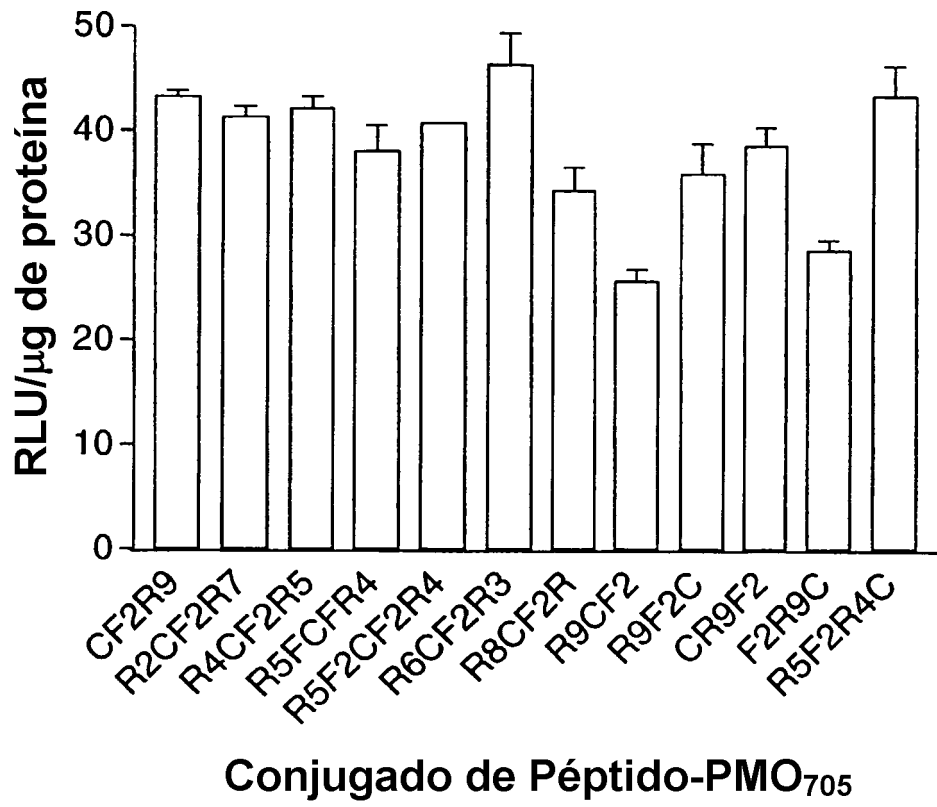


Fig. 15

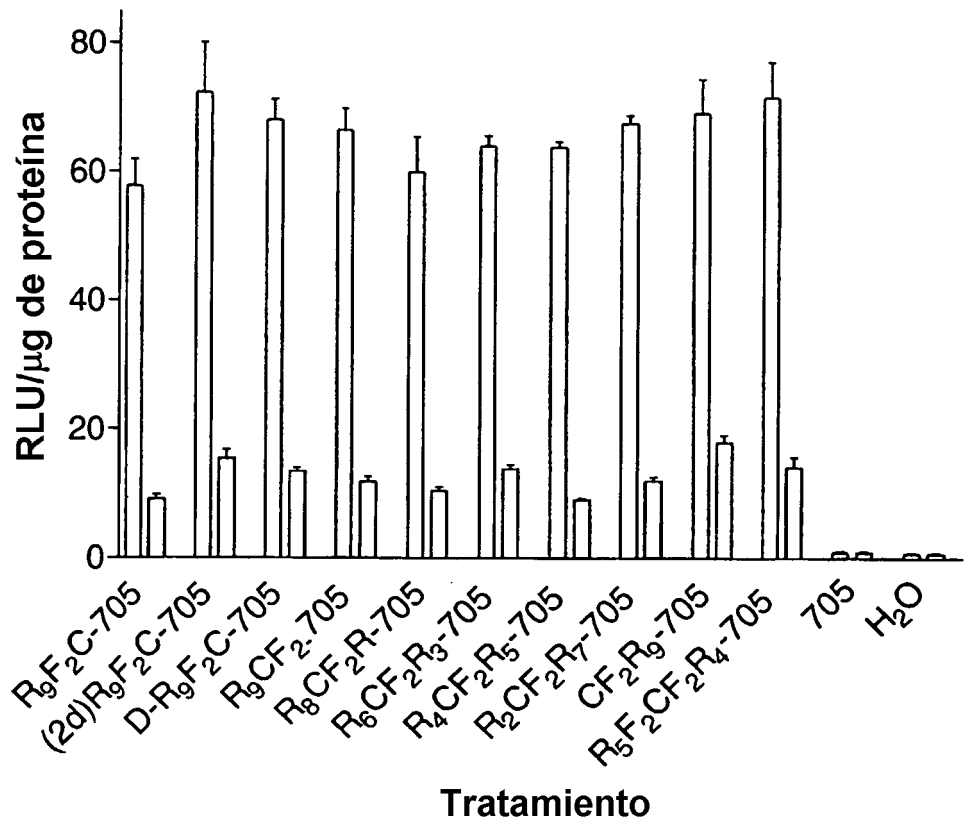


Fig. 16

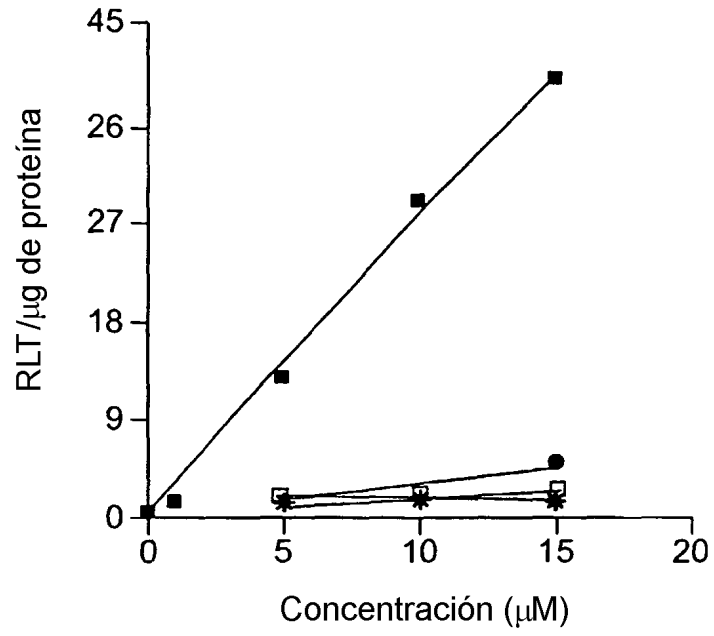


Fig. 17

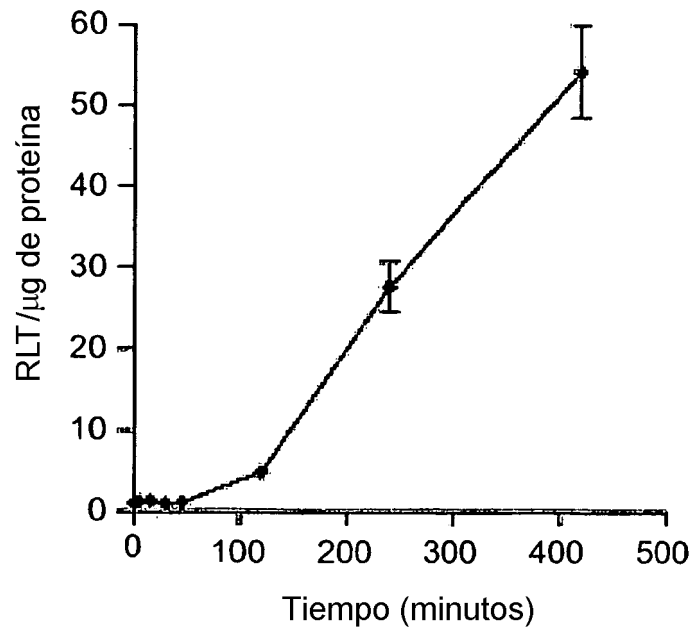


Fig. 18

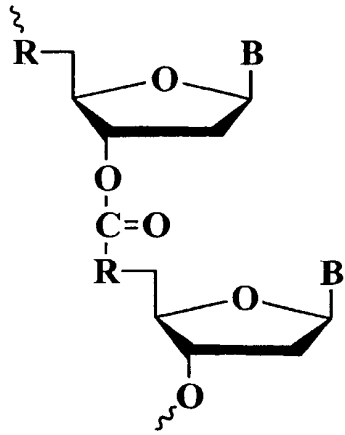


Fig. 19A

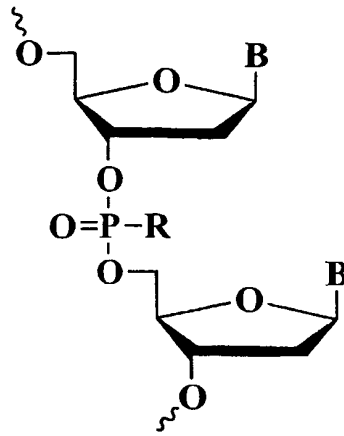


Fig. 19B

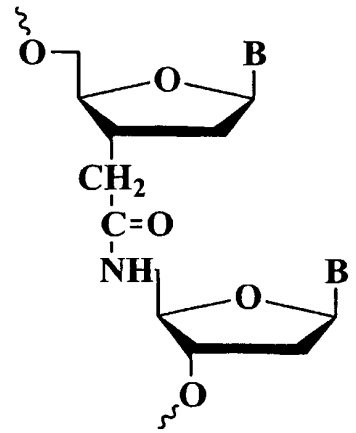


Fig. 19C

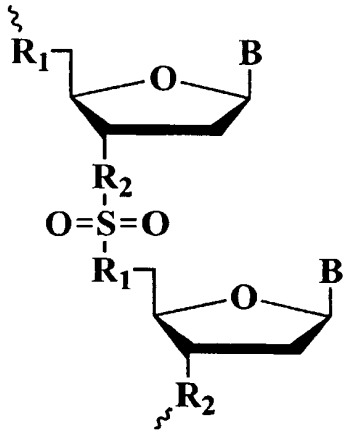


Fig. 19D

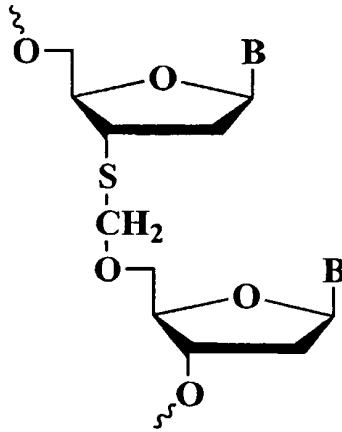


Fig. 19E

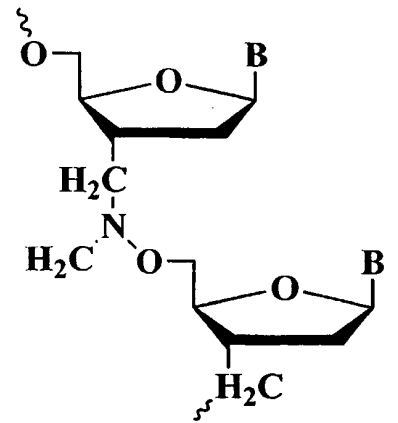


Fig. 19F

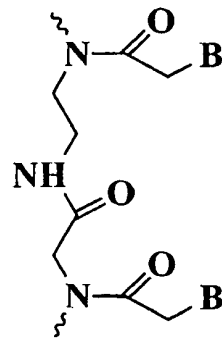


Fig. 19G

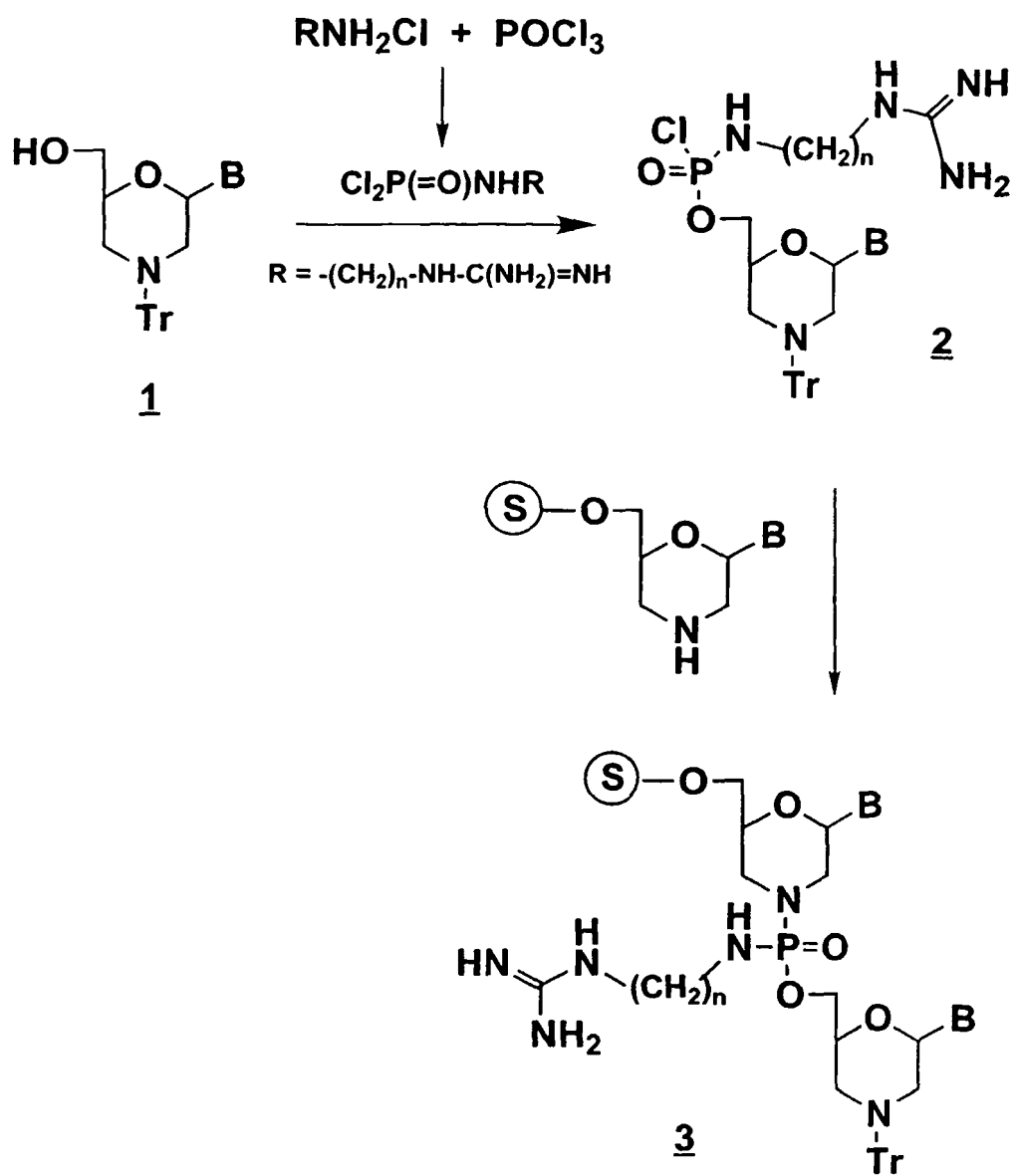


Fig. 20

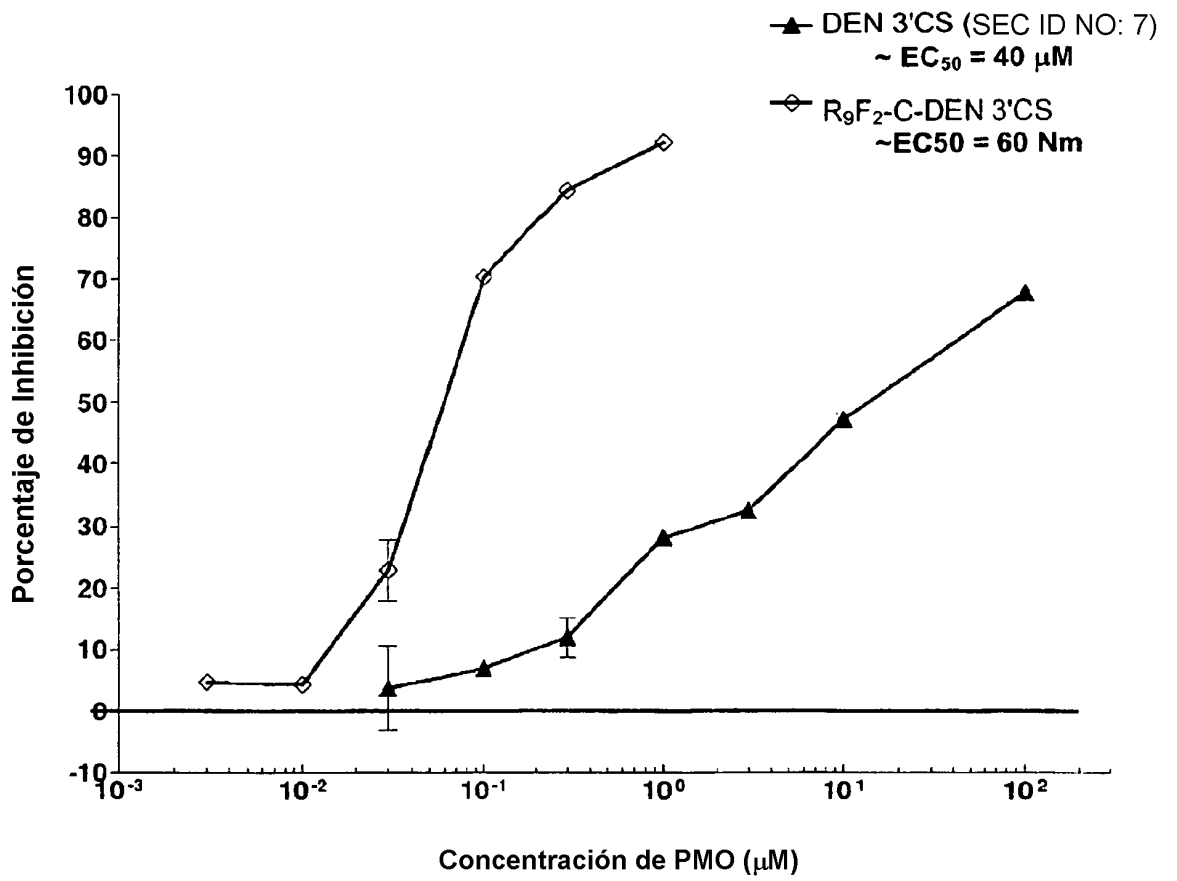


Fig. 21

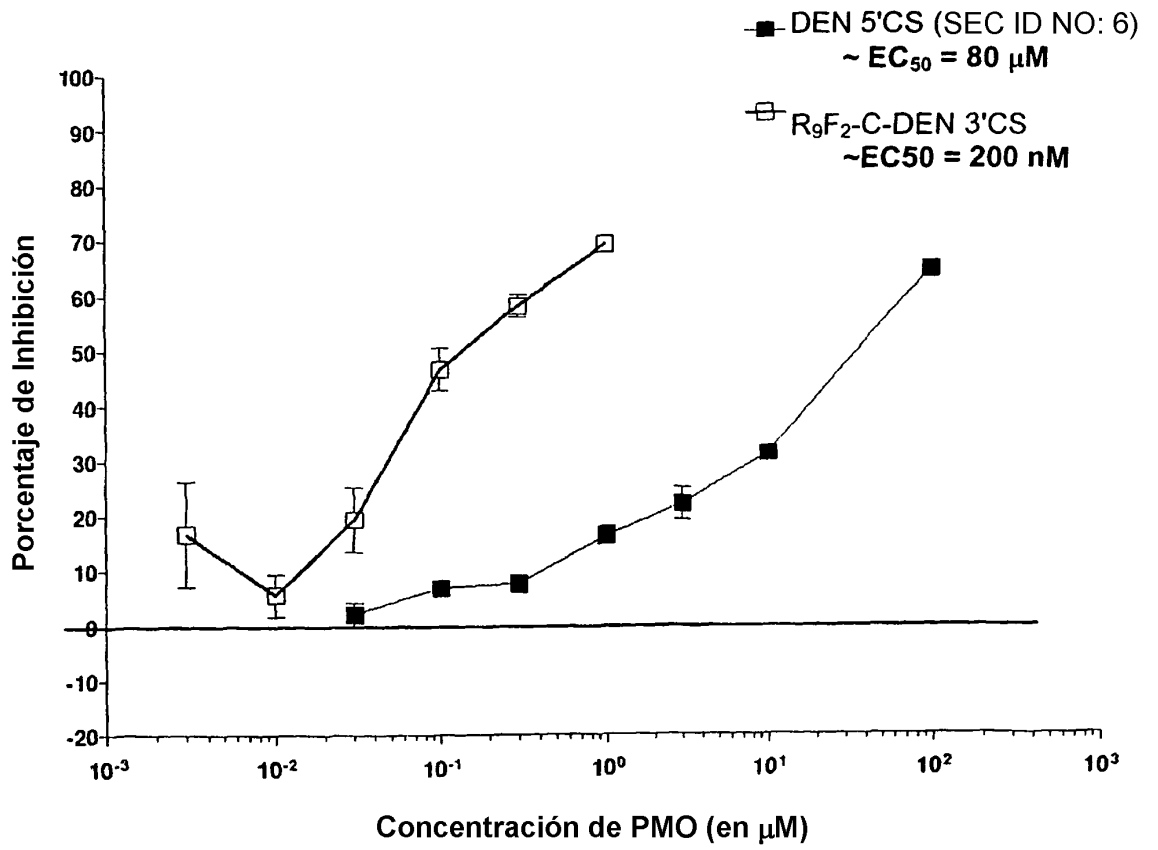


Fig. 22

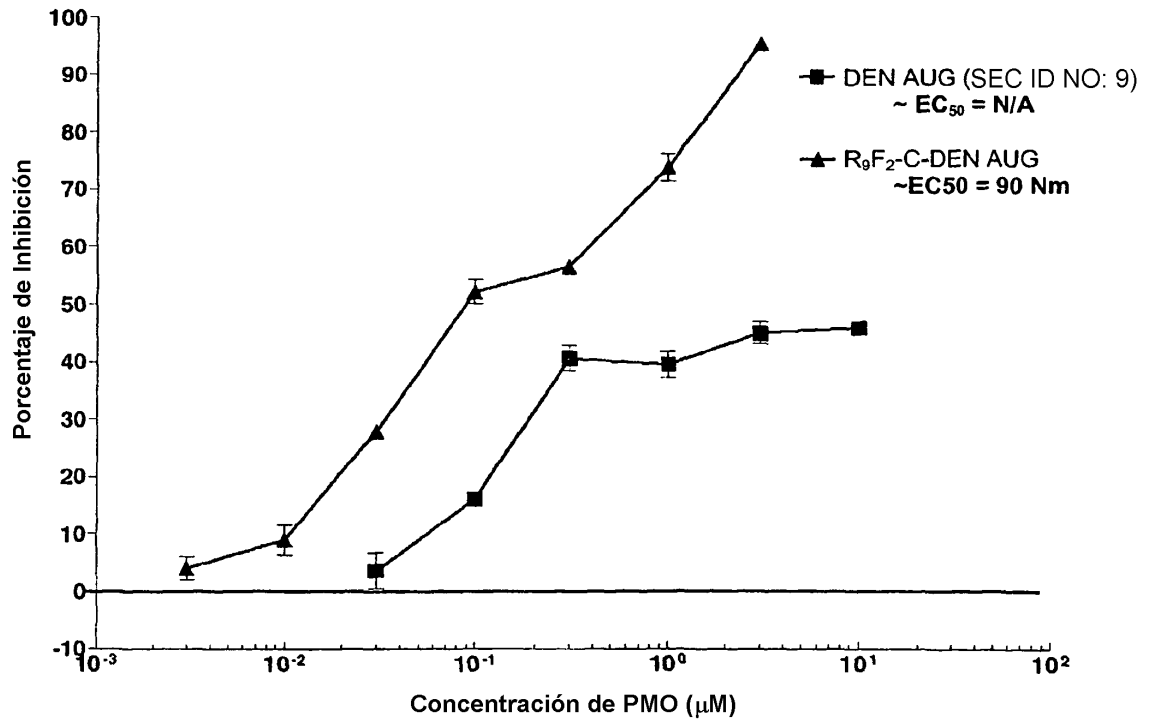


Fig. 23

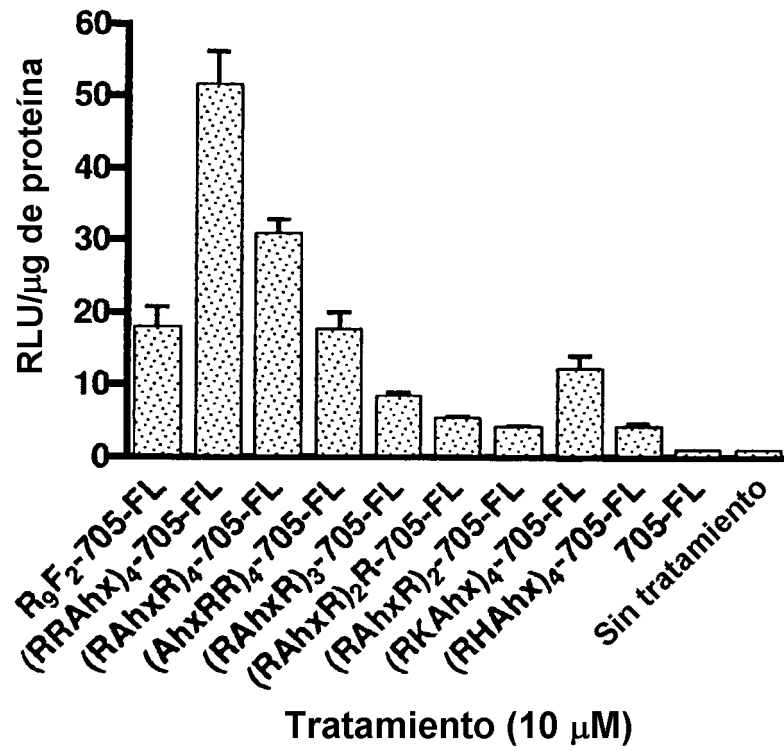


Fig. 24

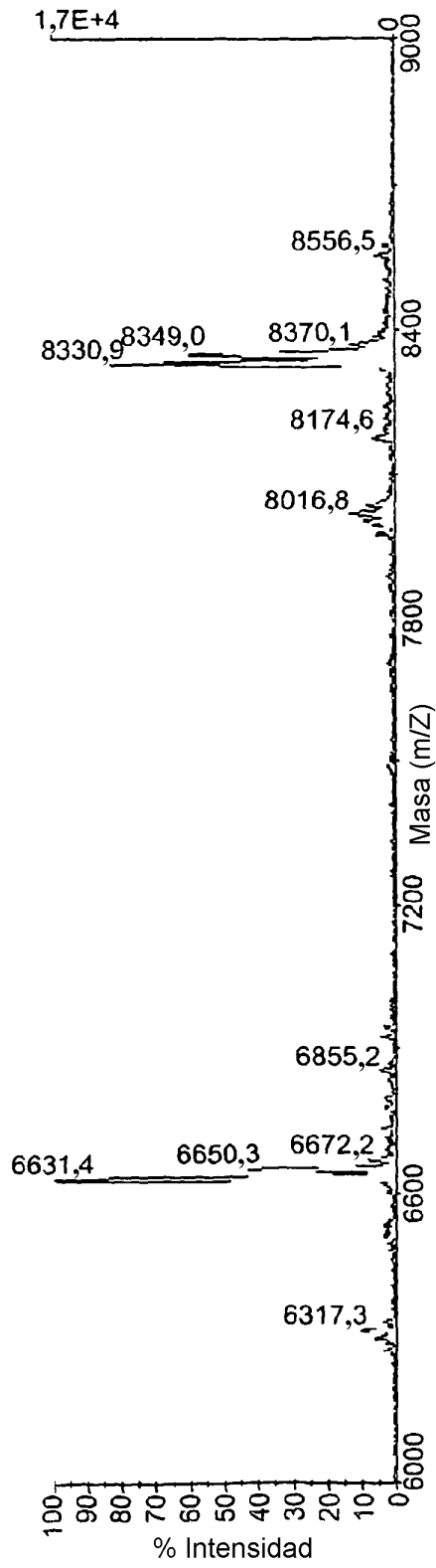


Fig. 25A

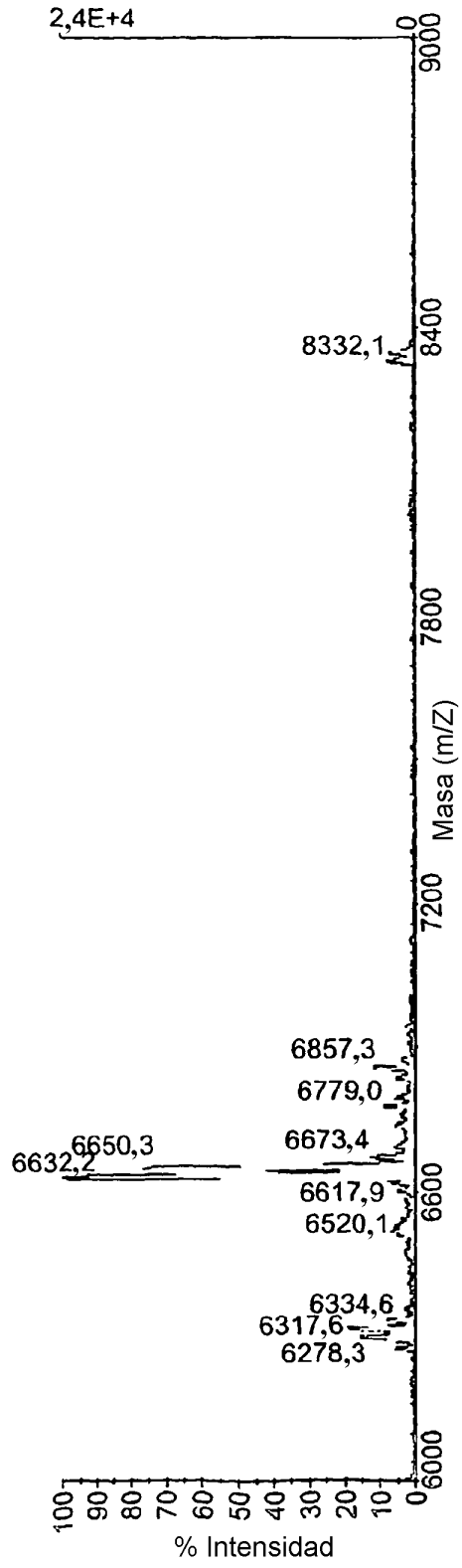


Fig. 25B

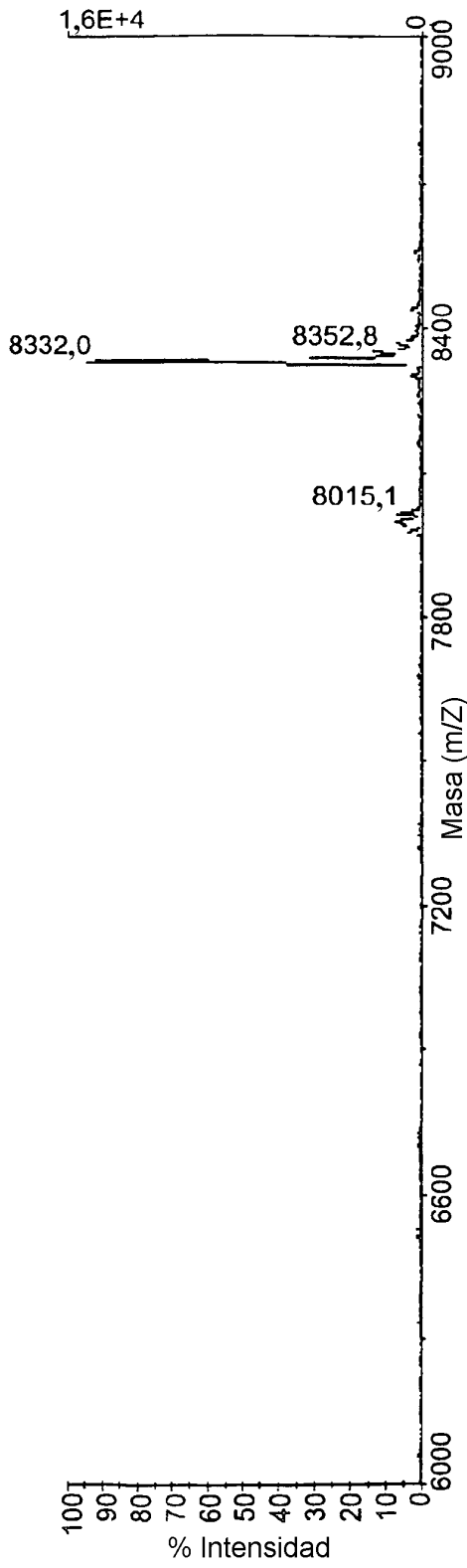


Fig. 26A

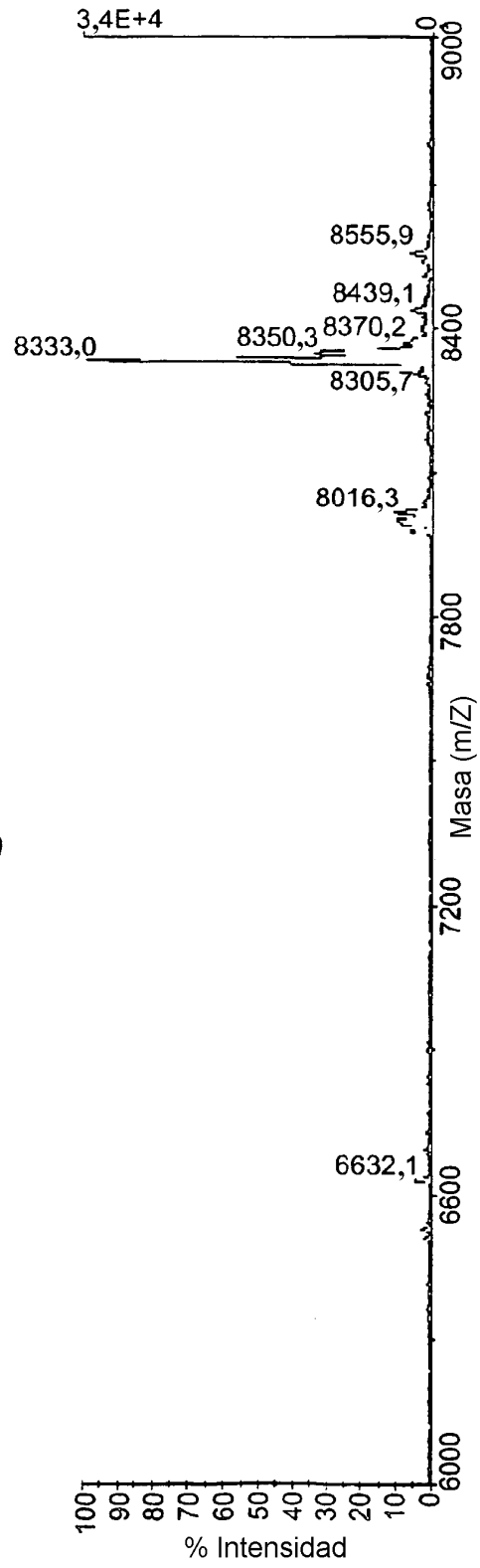


Fig. 26B

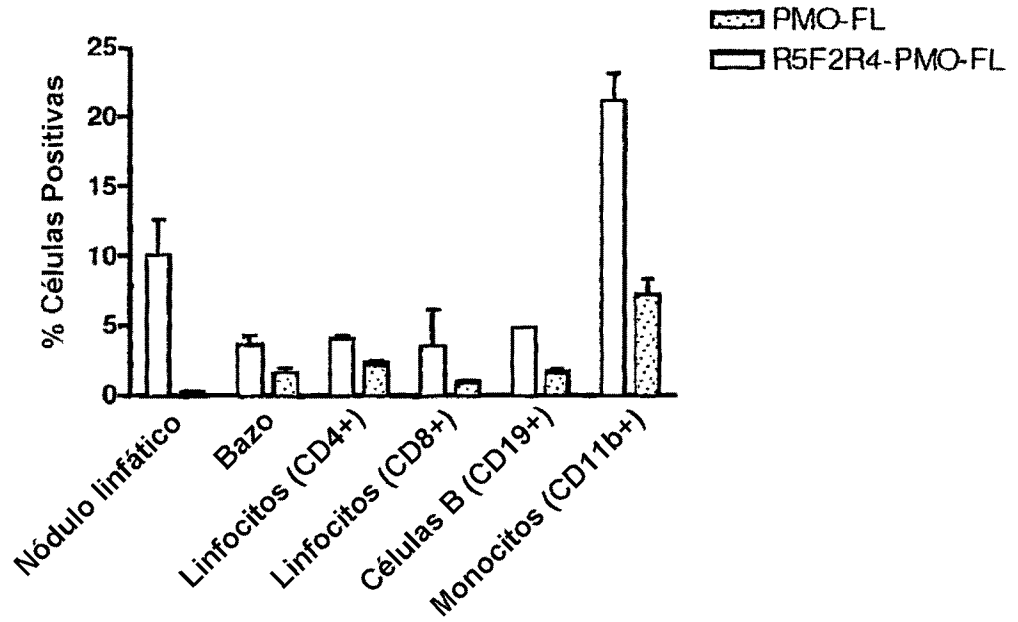


Fig. 27

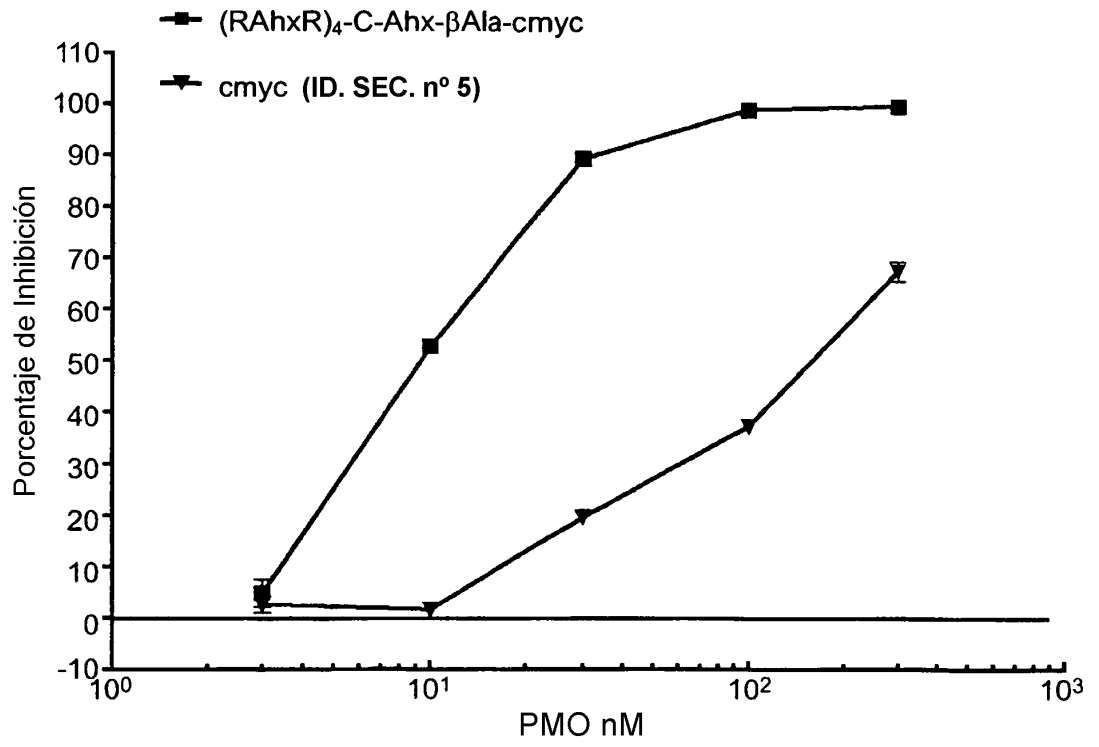


Fig. 28

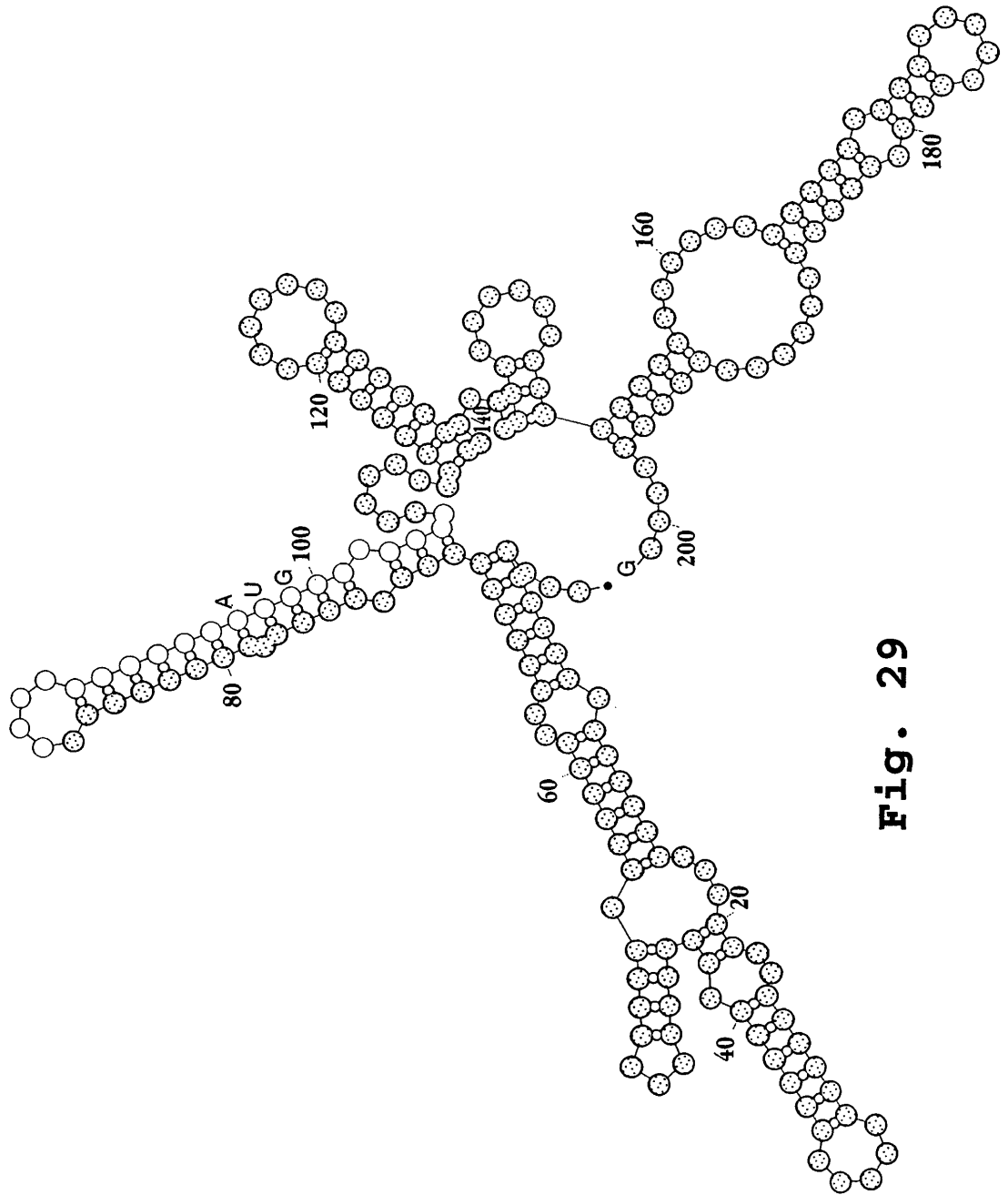


Fig. 29