

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 568**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2010** **E 10734537 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015** **EP 2446035**

54 Título: **Nuevos fármacos para inhibición de la expresión genética**

30 Prioridad:

22.06.2009 GB 0910723

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

09.06.2015

73 Titular/es:

**SYLENTIS S.A.U. (100.0%)
C/ José Abascal 2
28003 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**JIMÉNEZ, ANA ISABEL;
PANIZO, GEMA;
MARTÍNEZ, TAMARA;
AVINO, ANNA;
CAMINAL, CLARA;
ERITJA, RAMÓN y
GRIJALVO, SANTIAGO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 537 568 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

Nuevos fármacos para inhibición de la expresión genética

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a nuevos análogos oligoméricos y su uso en terapias basadas en oligonucleótidos. Más específicamente, la invención se refiere a oligonucleótidos que tienen moléculas lipídicas y su uso como inhibidores potenciales de la expresión genética.

10

Antecedentes de la invención

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo regulador de origen natural de la mayoría de células eucariotas que utiliza moléculas pequeñas de ARN de doble cadena (dsARN) para dirigir un silenciamiento genético dependiente de la homología. Su descubrimiento por Fire y Mello en el gusano *C. elegans* {Fire, 1998} fue premiado con el premio Nobel en 2006. Poco después de su primera descripción, se demostró que el ARNi también se encontraba en células de mamífero, no por medio de dsARN sino por medio de ARN de interferencia pequeño de doble cadena (ARNpi) de 21 nucleótidos de largo {Elbashir, 2001}.

15

20

Se cree que el proceso del ARN de interferencia es un mecanismo de defensa celular conservado a lo largo de la evolución que se utiliza para evitar la expresión de genes ajenos y se comparte comúnmente por una flora diversa, donde se llama silenciamiento genético post-transcripcional, y fila. Desde el descubrimiento del mecanismo ARNi ha habido una explosión de investigación para descubrir nuevos compuestos que puedan alterar selectivamente la expresión genética como una nueva forma para tratar la enfermedad humana dirigiéndose a dianas que por otra parte son "intratables" con las estrategias farmacéuticas tradicionales que implican moléculas o proteínas.

25

De acuerdo con los conocimientos actuales, el mecanismo del ARNi se inicia cuando los ARN de cadena doble larga se procesan por una proteína tipo RNasa III conocida como Dicer. La proteína Dicer contiene normalmente un dominio ARN helicasa en el extremo N, un dominio de unión al ARN denominado Piwi/Argonata/Zwille (PAZ), dos dominios RNasa III y un dominio de unión a ARN bicatenario (dsRBD) {Collins, 2005} y su actividad da lugar al procesamiento de los ARN de doble cadena largos en ARNpi de doble cadena de 21-24 nucleótidos con dos bases protuberantes 3' y un fosfato 5' y grupo hidroxilo 3'. Los dúplex ARNpi resultantes se incorporan entonces en un complejo efector conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), en donde la cadena antisentido o guía del ARNpi guía al RISC para que reconozca y escinda secuencias de ARNm diana {Elbashir, 2001} por desenrollamiento dependiente de (ATP) de la molécula de ARNpi de doble cadena por medio de una actividad ARN helicasa {Nykanen, 2001}. La actividad catalítica del RISC, que da lugar a la degradación del ARNm, está mediada por la endonucleasa Argonata 2 (AGO2) {Liu, 2004; Song, 2004}. La AGO2 pertenece a la familia de proteínas Argonautas altamente conservadas. Las proteínas Argonautas son proteínas altamente básicas de ~ 100 kDa que contienen dos dominios comunes, a saber PIWI y PAZ {Cerutti, 2000}. El dominio PIWI es crucial para la interacción con Dicer y contiene la actividad nucleasa responsable de la escisión de los ARNm {Song, 2004}. La AGO2 utiliza una cadena del dúplex ARNpi como guía para encontrar los ARN mensajeros que contienen secuencias complementarias y escinde la estructura fosfodiéster entre las bases 10 y 11 con respecto al extremo 5' de la cadena guía {Elbashir, 2001}. Una etapa importante durante la activación de RISC es la escisión de la cadena en sentido o pasajera por AGO2, eliminando esta cadena del complejo {Rand, 2005}. Estudios de cristalografía que analizaron la interacción entre la cadena guía de ARNpi y el dominio PIWI revelaron que solo los nucleótidos 2 a 8 que constituyen una "secuencia semilla" que dirige el reconocimiento del ARNm diana del RISC {Ma, 2005}. Una vez que se ha escindido el ARNm, y debido a la presencia de extremos de ARN sin protección en los fragmentos, el ARNm se escinde y degrada más por medio de las nucleasas intracelulares y no se volverá a traducir en proteínas {Orban, 2005} mientras que el RISC se reciclará para rondas posteriores {Hutvagner, 2002}. Esto constituye un proceso catalítico que da lugar a una reducción selectiva de moléculas ARNm específicas y las correspondientes proteínas. Es posible explotar este mecanismo nativo para el silenciamiento genético con el fin de regular cualquier gen(es) de elección suministrando directamente ARNpi efectores en las células o tejidos, donde activarán el RISC y producirá un silenciamiento potente y específico del ARNm al que se dirige.

30

35

40

45

50

55

Se han publicado muchos estudios que describen las características ideales que debería tener un ARNpi para conseguir la máxima eficacia, con respecto a su longitud, estructura, composición química, y secuencia. Los parámetros iniciales para el diseño de ARNpi se expusieron por Tuschl y sus colegas en el documento WO 02/44321, aunque muchos estudios y/o mejoras posteriores se han publicado desde entonces.

60

También se han hecho muchos esfuerzos en aumentar la estabilidad del ARNpi ya que esto se percibe como uno de los principales obstáculos para la terapia basada en ARNpi, dada la naturaleza ubicua de las RNAsas. Una de las estrategias principales que se han seguido para el aumento de estabilidad ha sido el uso de nucleótidos modificados tales como los nucleótidos 2'-O-metil, 2' amino nucleótidos, nucleótidos que contienen puentes metileno 2'-O o 4'-C. También se ha descrito la modificación de la estructura de ribonucleótidos que conecta nucleótidos adyacentes, principalmente por la introducción de nucleótidos modificados con fosforotioato. Parece ser que el aumento de estabilidad a menudo es inversamente proporcional a la eficacia (Parish, 2000), y solo un cierto número, posiciones

65

y/o combinaciones de nucleótidos modificados puede dar como resultado un compuesto de silenciamiento estable. Como sexto es un obstáculo importante en los tratamientos basados en ARNpi, se han publicado diferentes estudios que describen ciertos patrones de modificación que muestran buenos resultados, ejemplos de tales son por ejemplo, los documentos EP1527176, WO2008/050329, WO2008/104978 o WO2009/044392, aunque se encuentran muchos más en la bibliografía.

Otra estrategia para conseguir el suministro eficaz de ARNpi a las células diana es el uso de lípidos, que pueden envolver el compuesto de ARNpi, que lo hace inaccesible a las nucleasas. Como tales, se han descrito estrategias que se basan en el empaquetamiento de ARNpi en liposomas. Soluciones más sofisticadas en esta línea son las partículas pequeñas lipídicas de ácido nucleico o SNALP, que se describen por ejemplo en las solicitudes de patente US2006134189, US2006240093 o US2007135372. Los lípidos que se utilizan pueden ser lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos conjugados, incluso se han utilizado lípidos que contienen cadenas polialquilamina como agentes de captura de moléculas (documento WO 2004/110499). Otra alternativa son las formulaciones lipoplex descritas en el documento WO 2007/121947, que se basa en un liposoma que contiene un lípido auxiliar y un compuesto protector que se une al ácido nucleico, en el que dicho complejo ácido nucleico-compuesto protector se libera de la composición lipídica bajo condiciones in vivo. En una realización específica la formulación lipoplex comprende un ARNpi y un compuesto protector que es un conjugado de PEG y ceramida.

Se ha demostrado que la conjugación de moléculas lipídicas con oligonucleótidos tales como colesterol (Boutorine, 1993; Gryaznov, 1993; Zelphati, 1994) produce conjugados de oligonucleótidos que tienen propiedades inhibitoras mejoradas ((Godard, 1995; Le Doan, 1999; Soutscheck, 2004; Wolfrum, 2007). La captación eficaz y selectiva de estos conjugados de ARNpi depende de las interacciones con las partículas lipoproteicas, los receptores de lipoproteína y las proteínas transmembrana. La lipoproteína de alta densidad dirige el suministro de ARNpi al hígado. Como tales conjugados lipídicos diferentes probablemente aumentarán el suministro a diferentes órganos, permitirán de esta manera el tratamiento de diferentes enfermedades.

El documento WO 2009/009025 desvela micelas mezcladas de ARNpi unidas a un resto hidrófobo. Se han sugerido varias posibilidades como restos hidrófobos para la conjugación, incluyendo el colesterol.

El documento WO 2008/109105 desvela la encapsulación de ARNpi en liposomas catiónicos utilizando restos lipófilos tales como la fosocolina. Se describen conjugados de oligonucleótidos formados con restos de unión tal como PEG, pero esta publicación no desvela la conjugación con restos lipófilos.

El documento WO 2008/014979 desvela ácidos nucleicos modificados por un lípido, que se pretende que actúe como un agente inmunoestimulante para inducir una respuesta inmunitaria. Los lípidos ejemplares son esfingolípidos, cerebrósido cerebrosidasa, y gangliósidos, o colesterol.

De acuerdo con la presente invención, se ha proporcionado un proceso para la preparación de un conjugado que consiste en un oligonucleótido conjugado con una molécula de esfingosina. Un aspecto más de la invención proporciona un compuesto que consiste en un oligonucleótido conjugado con una molécula de esfingosina. Otras características de la invención se describen en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una representación esquemática de diferentes moléculas de esfingosina. (a) D-esfingosina, (b) D-ceramida, (c) D-esfingomielina.

La Figura 2 muestra un esquema de las reacciones que se utilizan para la preparación de oligonucleótidos que tienen esfingosina en el extremo 5'.

La Figura 3 muestra un esquema de las reacciones utilizadas para la preparación de oligonucleótidos que tienen esfingosina en el extremo 3'.

La Figura 4 muestra un esquema para la preparación de un derivado de esfingosina compatible con la síntesis de oligonucleótidos.

La Figura 5 contiene una tabla que muestra la estructura de los derivados octatimidil que tienen esfingosina preparada por conjugación post-sintética.

La Figura 6 muestra una representación de la síntesis de conjugados oligonucleótido 3'-esfingosina.

La Figura 7 muestra una representación esquemática de la síntesis de conjugados oligonucleótido 5'-esfingosina.

La Figura 8 y 9 muestran la expresión EGFP temporal en células MDCK-EGFP tras la transfección de diferentes moléculas ARNpi específicas de EGFP de la invención, medidas por RT-PCR, como se describe en los ejemplos experimentales. El eje Y indica el porcentaje de expresión de EGFP con respecto al control (que se considera

que es del 100 %), y el eje X representa el lapso de tiempo en horas desde el momento de la transfección (tiempo = 0) hasta un máximo de 96 horas.

La Figura 10, muestra una comparación de la estabilidad del compuesto en el suero de las moléculas ARNpi conjugadas con la esfingosina en su extremo 3' y 5'.

Descripción detallada de la invención

Los esfingolípidos son lípidos complejos derivados del amino alcohol orgánico alifático insaturado de 18 carbonos esfingosina; la esfingosina se une a un ácido graso de cadena larga por un enlace amida, formando una ceramida. Son una clase importante de lípidos en las membranas celulares animales y vegetales y son los lípidos más abundantes en los tejidos de más organismos complejos.

Todos los esfingolípidos tienen tres componentes básicos: el componente principal es un amino alcohol de cadena larga llamada esfingosina (1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno). Los carbonos 1, 2 y 3 de esta molécula son portadores del grupo funcional (-OH, NH₂, -OH) y cuando un ácido graso de cadena larga saturado o insaturado se une al carbono 2 por medio de un enlace amida, el resultado es una ceramida, que es la unidad fundamental de los esfingolípidos. Este tipo de lípido se puede encontrar especialmente en grandes cantidades en el tejido nervioso y el cerebro. La esfingosina, con su grupo amino libre, no se encuentra en la naturaleza.

Los esfingolípidos se dividen en 3 subclases, ceramidas, esfingomielinas, y glucoesfingolípidos.

Las ceramidas son los esfingolípidos más simples, y están ampliamente distribuidos en tejidos vegetales y animales. Los demás esfingolípidos son derivados de las ceramidas.

Las esfingomielinas contienen un grupo fosfato, unido al grupo hidroxilo 1 de la ceramida, que se esterifica con colina (fosfocolina) o etanolamina (fosfoetanolamina) para formar el grupo polar o "cabeza" de la molécula. Es el único fósforo que contiene el esfingolípido y puede, como tal, considerarse como un fosfolípido, pero se clasifica habitualmente como un esfingolípido debido a sus componentes estructurales. Las esfingomielinas están presentes en las membranas plasmáticas animales, en la vaina de mielina que cubre y aísla los axones de las neuronas mielínicas. La esfingomielina es uno de los principales lípidos estructurales en las membranas del tejido nervioso.

Los glucoesfingolípidos o simplemente glucolípidos están formados por el grupo hidroxilo 1 de la ceramida que se une por medio de un enlace glucosídico, a un monosacárido o un oligosacárido, que normalmente se proyecta hacia fuera hacia la cara externa de la membrana plasmática. Los monosacáridos más frecuentes son D-glucosa, D-galactosa y N-acetilgalactosamina. Se conocen varios tipos:

- Cerebrósidos. Los cerebrósidos tienen un azúcar simple unido por medio de un enlace β-glucosídico al grupo hidroxilo de la ceramida; los que contienen galactosa (galactocerebrósidos), se encuentran característicamente en las membranas plasmáticas de las células del tejido nervioso, mientras que los que contienen glucosa (glucocerebrósidos) se encuentran en las membranas plasmáticas de las células de tejidos no nerviosos. Los sulfátidos contienen una galactosa esterificada con sulfato en el carbono 3, y se encuentran en la sustancia blanca del cerebro.
- Globósidos. Los globósidos u oligosacáridos ceramida son glucoesfingolípidos con oligosacáridos neutros unidos a la ceramida.
- Gangliósidos. Son los esfingolípidos más complejos debido a sus grandes cabezas polares que se forman por unidades de oligosacáridos cargados negativamente, que tienen su origen en la existencia de una o más unidades de ácido N-acetilneuramínico o siálico, que tiene carga negativa a pH 7. Los gangliósidos se diferencian de los cerebrósidos en que contienen este grupo ácido. Están concentrados en altas cantidades en las células ganglionares del sistema nervioso central, especialmente en las terminaciones nerviosas. Los gangliósidos constituyen el 6 % de los lípidos de membrana de la sustancia gris del cerebro humano y se pueden encontrar en pequeñas cantidades en las membranas de la mayoría de los tejidos animales no nerviosos. Se pueden encontrar en la zona externa de la membrana y sirven para el reconocimiento celular, y por lo tanto se consideran receptores de membrana.

Las moléculas de esfingolípidos presentan propiedades anfipáticas, es decir, tanto hidrófobas como hidrófilas, lo que les permite jugar un importante papel en la formación de membranas biológicas. Algunos glucoesfingolípidos se encuentran en la superficie de eritrocitos y otras células, que se comportan como antígenos y definen los grupos sanguíneos.

Los esfingolípidos son importantes biológicamente debido a su papel en la señalización celular. Por ejemplo, la ceramida es ampliamente reconocida como un inductor de apoptosis celular. Si la ceramida es degradada por las ceraminasas, se libera esfingosina, que a su vez se fosforila, dando como resultado esfingosina 1-fosfato que tiene un efecto completamente antagónico a la ceramida induciendo la proliferación celular y mitosis. En consecuencia, el balance entre ceramida y esfingosina 1-fosfato es muy importante para el control de la muerte celular y la supervivencia.

Debido al hecho de que los esfingolípidos son componentes naturales de la membrana plasmática, los inventores han hecho la hipótesis de que conjugándolos con estructuras que interfieren con el ARN, se aumentaría la captación celular de los compuestos de silenciamiento genético y pueden servir como grupos de protección contra las ARNasas. Como tal, la presente divulgación engloba tanto estas nuevas estructuras como sus síntesis.

Los que se desvela en el presente documento son estructuras de interferencia de ARN conjugadas con diferentes tipos de esfingolípidos como se ha definido anteriormente, que incluyen pero no se limitan a esfingosina, ceramidas, derivados de la esfingomielina, cerebrósidos y gangliósidos. En consecuencia, en el contexto del presente documento se considera que los esfingolípidos engloban la esfingosina.

El término esfingosina también engloba las moléculas de esfingosina que contienen una o más de las siguientes modificaciones: derivados N-acil, N-sulfonamidas, doble enlace hidrogenado, cadenas alifáticas más cortas, heteroátomos que forman parte de la cadena alifática, derivados O-alquilados, adición de grupos hidroxilo en la cadena alifática, y/o la adición de grupos alquilo en la cadena alifática.

Es la primera vez que se han sintetizado oligonucleótidos que contienen esfingolípidos. En consecuencia, un aspecto más de la presente divulgación es el proceso de preparación de estos oligonucleótidos que se caracterizan en que comprenden la conjugación de un oligonucleótido con un esfingolípidos. Las realizaciones de la presente divulgación incluyen la conjugación del oligonucleótido con esfingosina, ceramidas, esfingomielinas o glucoesfingolípidos tales como cerebrósidos y gangliósidos. Una realización particularmente preferida es el proceso de conjugación del oligonucleótido con la D-esfingosina.

En el significado de la presente invención un oligonucleótido es un polímero de ácido nucleico, normalmente que contiene hasta 200 bases. Estas bases pueden ser o bien de ácidos desoxirribonucleicos o bien de ácidos ribonucleicos, o de ambos.

Como se conocen en la técnica, cada nucleótido contiene un azúcar (ribosa y desoxirribosa), con carbonos numerados desde 1' hasta 5', una base nitrogenada y un grupo fosfato. La base se une a la posición 1', generalmente una adenina (A), citosina (C), guanina (G), timidina (T) o uracilo (U). El grupo fosfato se une en la posición 3' de un azúcar y la posición 5' de la siguiente, actuando como un enlace entre nucleótidos. Por definición, una cadena de oligonucleótidos tiene dos extremos distintos, su extremo 5', que se refiere a la posición 5' libre del azúcar, y en el extremo opuesto del oligonucleótido, el último azúcar tendrá su posición 3' unida a un grupo fosfato libre (como su posición 5' se unirá al nucleótido anterior de la cadena).

Sin embargo, el término oligonucleótido con el significado de la presente invención se debería entender que incluye, en algunas realizaciones, bases alternativas que comprenden modificaciones estructurales como las que se describen en la sección titulada antecedentes de la invención, y también bases alternativas tales como inosina, 4-tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo o 3-(aminoalil) uracilo.

Con fines aclaratorios, el término "conjugación" en la presente invención se considera que es igual a unión química, unión covalente, acoplamiento químico u otros términos conocidos por un experto en el campo. Con el significado de la presente invención, una realización preferida del término conjugación se refiere a la formación de enlaces fosfato o amida.

Un aspecto más de la presente divulgación es un proceso para la preparación de un esfingolípidos que contiene oligonucleótidos que se caracterizan por que la conjugación de un oligonucleótido con un esfingolípidos comprende:

- Unir de un grupo amina o carboxilo a al menos un extremo de un oligonucleótidos, sea 5' o 3' o ambos; y
- Activar dicho grupo amino o carboxilo; y
- Permitir que un grupo amino de un esfingolípidos se una al grupo activado del oligonucleótido, tal que el grupo activado se desplaza y se forma un conjugado oligonucleótido-esfingolípidos.

Un aspecto más del proceso descrito anteriormente, se refiere a dicho proceso que tiene lugar cuando se proporciona el esfingolípidos en un soporte sólido, y la unión de la secuencia de oligonucleótido tiene lugar en dicho soporte sólido.

Otro aspecto más de este proceso ocurre cuando dicho esfingolípidos se proporciona en un soporte sólido, y la unión de las secuencias de oligonucleótido tiene lugar a partir de una función alcohol de la esfingosina por adiciones sucesivas de las fosforamiditas de nucleósido o cualquier otro reactivo de síntesis de ADN tales como nucleósido H-fosfonatos, o nucleósido O-fenil fosfodiésteres protegidos.

En otro aspecto alternativo, el proceso descrito anteriormente se puede llevar a cabo de tal manera que dicho esfingolípidos se hacer reaccionar con un oligonucleótido inactivado en solución.

Aunque se da una detallada descripción del método de conjugación en la sección de Ejemplo, los siguientes párrafos proporcionan una breve descripción de ciertas realizaciones preferidas del método de síntesis desvelado en

el presente documento.

Un método para la síntesis de los conjugados de oligonucleótidos que contienen esfingosina, comprende la introducción de un grupo de ácido carboxilo en el oligonucleótido (sea en el extremo 3' o 5') que permita la formación de un enlace amida con el grupo amino de la molécula de esfingosina. La formación de amida puede tener lugar en solución cuando el oligonucleótido-COOH reacciona con la molécula de esfingosina o preferentemente, en fase sólida.

Una realización particularmente preferida, con respecto a la conjugación de oligonucleótido a esfingosina (aplicable para diferentes tipos de esfingolípidos), es un proceso que comprende las siguientes etapas:

- Protección del grupo amino en la molécula de esfingosina;
- Protección del grupo hidroxilo primario en la molécula de esfingosina;
- Hacer reaccionar el grupo hidroxilo secundario de la esfingosina con un soporte funcional;
- Acoplar el oligonucleótido al soporte con esfingosina, teniendo dicho oligonucleótido un extremo activado que se obtiene como se ha descrito en los párrafos anteriores,
- Escindir el producto del soporte sólido;
- Aislamiento del producto, preferentemente por precipitación; y
- Purificación del producto terminal, preferentemente utilizando RP-HPLC (cromatografía líquida de alta prestaciones, de fase inversa).

Con respecto a la síntesis de conjugados de oligonucleótidos con ceramidas, en una realización preferida, el método comprende obtener las correspondientes fosforamiditas que se utilizan posteriormente para introducir las ceramidas en la posición 5' de los oligonucleótidos utilizando técnicas de síntesis de nucleótidos bien conocidas en la técnica. La primera fosforamidita produciría un grupo fosfato en la posición 1, que se la misma posición que la de la fosfatidil colina en la esfingomielina. Esta fosforamidita implica la introducción de un grupo DMT en el alcohol primario y la introducción de un grupo protector ortogonal en el 2'-OH (habitualmente un derivado siliil), y finalmente la introducción de la función fosforamidita en el 3'-OH.

Otra realización desvelada en el presente documento se refiere a la conjugación de oligonucleótidos con derivados de esfingomielina. Los derivados preferidos de esfingomielina son D-esfingosina 1-fosfato, D-ceramidafosforil etanol amina y D-esfingomielina, aunque se conocen diferentes derivados en la técnica. La síntesis de esos conjugados comprende preferentemente hacer reaccionar el grupo etanolamina presente en la esfingomielina con oligonucleótidos que contienen grupos de ácido carboxílico, de manera similar a los que se describen en los párrafos anteriores.

Más aspectos preferidos de la presente divulgación se refieren a los compuestos que resultan de los métodos descritos anteriormente. En consecuencia, una realización preferida de la presente divulgación es un compuesto que se caracteriza por que comprende un oligonucleótido conjugado con un esfingolípidos. Más esfingolípidos preferidos que forman parte de este nuevo compuesto se seleccionan de entre esfingosina, ceramidas, esfingomielinas y glucoesfingolípidos. Una realización especialmente preferida es un oligonucleótido conjugado con D-esfingosina.

El compuesto de la presente invención se proporciona preferentemente como un ARN desnudo, es decir sin ser parte de más vehículos de suministro de estructura más compleja, como por ejemplo micelas.

Como se describe en detalle en los Ejemplos de la presente especificación, es posible conjugar un esfingolípidos tanto con el extremo 3' del nucleótido como con su extremo 5'. En consecuencia, una realización preferida de la presente divulgación es un compuesto que comprende un oligonucleótido conjugado con un esfingolípidos en que dicho esfingolípidos se une a su extremo 3', a su extremo 5' o un esfingolípidos se conjuga con cada uno de los extremos 3' y 5' del oligonucleótido, en que ambas moléculas de esfingolípidos son la misma o diferentes.

El compuesto de la presente divulgación puede encontrarse hibridado con otro oligonucleótidos, formando una estructura de doble cadena. Como se sabe en la técnica, las cadenas de nucleótido se pueden hibridar entre ellas por emparejamiento de bases complementarias, es decir, por enlaces de hidrógeno establecidos entre adenosina y timidina/uracilo o entre citosina y guanina de cadenas opuestas. Estas estructuras de doble cadena se ensamblan de manera antiparalela, de forma que el extremo 5' de una cadena se hibrida con el extremo 3' de la otra cadena. Por lo tanto una realización más de esta divulgación comprende los conjugados desvelados en el presente documento que se hibridan con otro oligonucleótido, preferentemente este segundo oligonucleótido será homólogo en al menos un 90 % del oligonucleótido conjugado con el esfingolípidos, En una realización más preferida, ambos oligonucleótidos que forman dicha estructura de doble cadena se unen a un esfingolípidos en uno o ambos de sus extremos.

En una realización específica preferida de la presente divulgación la estructura de oligonucleótido de doble cadena que se une a un esfingolípidos es un oligonucleótido mediado por un ARN de interferencia, tal como por ejemplo, un ARN de interferencia corto (ARNpi).

Como se ha descrito en párrafos anteriores, los ARNpi con el significado de la presente divulgación son moléculas ARN de doble cadena, con una longitud típica de entre 15 y 25 nucleótidos.

Los ARNpi de origen natural habitualmente tienen entre 1 y 3 nucleótidos protuberantes en sus extremos 3', estas estructuras están consideradas en el ámbito de la presente divulgación. Además, la mayoría de los ARNpi desarrollados artificialmente tienen una estructura de doble cadena de 19 nucleótidos con 2 nucleótidos protuberantes en los extremos 3', estos últimos ARNpi se conjugan con esfingolípidos sea en el extremo 3' o 5' o en ambos, se considera una realización preferida de la presente divulgación. De manera similar, estas estructuras cuyos nucleótidos protuberantes consisten en bases de desoxirribosa también se consideran realizaciones preferidas en el significado de la presente divulgación.

Por otro lado, se han desarrollado ARNpi con extremos truncados que son muy eficaces en la mediación del silenciamiento genético, y estas estructuras se pueden conjugar también con esfingolípidos con el significado de la presente divulgación. En una realización preferida, estos ARNpi de extremos truncados tienen entre 15 y 25 nucleótidos de longitud, en una realización más preferida, entre 19 y 23 nucleótidos de longitud. En una realización particularmente preferida estos ARNpi de extremos truncados tienen 19 nucleótidos de longitud y están conjugados con esfingolípidos sea en el extremo 3' o 5' o en ambos.

Independientemente de la estructura del ARNpi, dado que estas moléculas son de cadena doble, en una realización específica de la presente divulgación el esfingolípido se conjuga con la cadena en sentido, o la cadena antisentido, o simultáneamente con ambas cadenas de la molécula de ARNpi determinada.

En una realización particularmente preferida de la presente divulgación, el esfingolípido conjugado a cualquiera de las estructuras de ARNpi definidas anteriormente es la esfingosina, más preferentemente la D-esfingosina.

Los oligonucleótidos que regulan la expresión genética han llegado a tener un gran interés en la industria en los últimos años. Se utilizan tanto como herramientas de investigación, y por lo tanto las suministran varias compañías, y como fármacos potenciales. El primer fármaco basado en oligonucleótidos antisentido en alcanzar el mercado se conoce como Vitravene™, y se administra por inyección intravítrea para tratar la retinitis CMV en pacientes con SIDA. De manera similar, el primer aptámero (oligonucleótido que se une a una proteína diana inhibiendo su función) que se aprobó es el Macugen™, también suministrado por inyección intravítrea para tratar la degeneración húmeda relacionada con la edad. También, los fármacos ARNpi más avanzados en ensayos clínicos son para su administración por inyección intravítrea para tratar la degeneración macular húmeda relacionada con la edad.

Aunque hay muchos otros compuestos en desarrollo para diferentes enfermedades, están en estadios tempranos de desarrollo debido principalmente a la dificultad de suministrar los oligonucleótidos de elección a los tejidos diana. Esto es especialmente complicado en el caso de los ARNpi dada su inestabilidad y la naturaleza ubicua de las ARNasas.

Debido a estas dificultades, los compuestos de la presente divulgación que tienen una estabilidad mejorada contra ARNasas se pueden formular de distintas maneras, de acuerdo con los métodos que se conocen en la técnica, para conseguir un suministro eficaz en el tejido diana deseado.

Por lo tanto, una realización preferida de la presente divulgación comprende el uso de un compuesto de acuerdo con la divulgación como un medicamento. A modo de ejemplo, un ARNpi se puede diseñar contra el ARNm diana de elección por métodos que se conocen en la técnica. Luego, esta molécula de ARNpi se conjuga con el esfingolípido deseado, y el compuesto resultante se administra a un individuo, cuya expresión celular del gen diana determinado se va a silenciar.

También, una realización preferida de la presente divulgación comprende una formulación o composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto como se describe en los párrafos anteriores.

Los aspectos de la divulgación se refieren también a un método para suprimir la expresión de un gen diana en una células, comprendiendo el método poner en contacto una células con un compuesto que comprende un oligonucleótido conjugado con un esfingolípido, como se ha descrito. El oligonucleótido comprende preferentemente una secuencia de ácido nucleico que se corresponde con una secuencia de ácido nucleico del gen diana. La divulgación también proporciona un método para suprimir la expresión de un gen diana en un organismo, comprendiendo el método la administración de tal compuesto a un organismo. También se proporciona un método para tratar una enfermedad en un mamífero producida por la expresión aberrante de un gen diana, comprendiendo el método la administración de un compuesto como se ha descrito a un mamífero.

En otra realización alternativa de la presente divulgación, un compuesto de la divulgación puede formar un complejo con agentes que alteran la membrana y/o lípidos catiónicos o una molécula lipídica auxiliar, y/o incluirse en un liposoma.

Una formulación farmacéutica de la divulgación tiene una forma adecuada para la administración, en una célula o un sujeto, incluyendo por ejemplo un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la vía de entrada, por ejemplo oral, transdérmica, o por inyección. Otros factores se conocen en la técnica, e incluye consideraciones tales como la toxicidad y formas que eviten que la composición o formulación ejerzan su efecto.

La presente divulgación incluye también composiciones preparadas para el almacenamiento o la administración, que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para su uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, se pueden proporcionar agentes conservantes, estabilizantes, colorantes y saborizantes. Estos incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden utilizar agentes antioxidantes y suspensores.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es la dosis necesaria para evitar, inhibir la presentación, o tratar (aliviar un síntoma en cierta medida, preferentemente todos los síntomas) de un estado de enfermedad. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición utilizada, la vía de administración, el tipo de mamífero que se va a tratar, las características físicas del mamífero específico que se considera, la medicación concurrente, y otros factores que reconocerán los expertos en las técnicas médicas.

Generalmente, se administra una cantidad entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal/día de los principios activos.

Las formulaciones de la divulgación se administran en formulaciones de dosificación unitaria que contienen excipientes, adyuvantes y/o vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones pueden estar en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos dispersables o gránulos, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones que se pretenden para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más de tales agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes o agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y palatables.

Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes; tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico, o fosfato sódico; agentes granulantes o desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglomerantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato magnésico, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden ser sin revestimiento o se pueden revestir por técnicas conocidas. En algunos casos tales revestimientos se pueden preparar por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de esta manera una acción sostenida sobre un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso en el tiempo tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formulaciones para su uso oral también puede presentarse como cápsulas de gelatina dura en que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en una mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes suspensores, por ejemplo, carboximetil celulosa sódica, metilcelulosa, hidropropil-metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán polietileno. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo, etil o n-propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo los principios activos en aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco, o en un aceite mineral tal como la parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes y agentes saborizantes para proporcionar preparaciones orales palatables. Estas composiciones se pueden conservar por adición de un antioxidante tal como el ácido ascórbico.

Los polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por adición de agua proporciona el principio activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, agentes suspensor y uno o

más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados o los agentes suspensores se ejemplifican por los que se han mencionado anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

5 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de estos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma arábica o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo, soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de los dichos ésteres parciales con
10 óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxi-etileno. Las emulsiones pueden contener también agentes edulcorantes y saborizantes.

Se pueden formular jarabes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol, glucosa o sacarosa. Tales formulaciones pueden contener también un demulcente, un conservante y agentes saborizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión estéril inyectable acuosa u oleaginosa.

Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes suspensores que se han mencionado anteriormente.

20 Una preparación estéril inyectable también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles como medio disolvente o suspensor.
25 Para este fin, se puede emplear cualquier aceite blando no volátil incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico son útiles para la preparación de inyectables.

Los compuestos de la divulgación pueden también administrarse en forma de supositorios, por ejemplo, para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente adecuado no irritante que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y por lo tanto se funde en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen la manteca de coco y polietilenglicoles.

Los compuestos de la divulgación pueden administrarse parenteralmente en un medio estéril. El fármaco, dependiendo del vehículo y la concentración a que se utilice, se puede o suspenderse o disolverse en el vehículo.
35 Ventajosamente, se pueden disolver en el vehículo adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponantes.

Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto en particular depende de varios factores que incluyen la actividad del compuesto específico que se emplee, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, tiempo de administración ruta de administración, y tasa de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular sometida a terapia.

Para la administración a animales no humanos, la composición se pueden añadir también al alimento del animal o el agua de bebida. Puede ser conveniente formular las composiciones de alimento animal y agua de bebida de forma que el animal tome una cantidad terapéuticamente apropiada de la composición junto con su dieta. Puede ser también conveniente presentar la composición como una premezcla para la adición al alimento o el agua de bebida.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación pueden administrarse también a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para aumentar el efecto terapéutico total. El uso de múltiples compuestos para tratar una indicación puede aumentar los efectos beneficiosos a la vez que se reduce la presencia de efectos secundarios.

Ejemplos

55 Dadas las características comunes de los esfingolípidos, como se puede ver en la figura 1, los siguientes ejemplos prácticos describen la conjugación de un oligonucleótido con la esfingosina. Sin embargo, se considera que proporcionan una descripción suficiente para llevarse a cabo reacciones similares con diferentes moléculas de esfingolípidos.

60 Debido a la presencia del grupo amino en la esfingosina es posible utilizar la reactividad especial de este grupo amino para formar enlaces covalentes con oligonucleótidos que tienen grupos electrofílicos. Esta ruta sintética es simple debido a que no es necesario preparar un derivado protegido de la esfingosina sino que necesita la introducción de grupos reactivos en los oligonucleótidos. Los siguientes ejemplos detallan el uso de los grupos amino y carboxílico de los extremos 5' y 3' de los oligonucleótidos. La secuencia de octatimidina (T8: 5'-TTTTTTTT-3') se utilizó como una secuencia modelo con fines de comparación.

Síntesis de conjugados de oligonucleótido 5'-esfingosina

Se ensayaron las siguientes reacciones (Figura 2):

- 5 1) Reacción de esfingosina con 5'-amino-T₈ por activación con carbonildiimidazol. El grupo amino el extremo 5' del oligonucleótido se introdujo utilizando 6-N-monometoxitritil-aminohexanol N, N-di-isopropil-O-cianoetilfosforamidita. El soporte sólido que tenía el 5'-amino-T₈ se hizo reaccionar con un gran exceso de carbonildiimidazol para generar una función reactiva carbonilimidazol que se hizo reaccionar con esfingosina. La HPLC muestra la formación de un 22 % del conjugado deseado oligonucleótido-5'-esfingosina (entrada 1, Tabla en la Figura 5) que se aisló con un rendimiento del 10 % (síntesis y purificación)
- 10
- 15 2) Reacción de esfingosina al oligonucleótido 5'-carboxi-T₈ utilizando el modificador 5'-carboxi C10. Se sintetizó el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido carboxílico del extremo 5' de la cadena T₈ activado con C10 utilizando N-hidroxisuccinimidil ácido 10-oxadecanoico 10-(N, N-diisopropil-O-2'-cianoetilfosforamidita). El soporte CPG resultante se hizo reaccionar con una solución de esfingosina en CH₂Cl₂ (10 % de trietilamina). El análisis de la HPLC revelaba la formación del producto deseado con una conversión alta. Tras la purificación, el producto deseado (entrada 2, Tabla en la Figura 5) se obtuvo un rendimiento del 20 %. El producto final se caracterizó por UV y espectrometría de masas.
- 20 3) La introducción de esfingosina en el extremo 5' del ARN_{pi}, comprende varias etapas como se describe en los párrafos siguientes. Las referencias numéricas indican las estructuras químicas correspondientes en la figura 7.

Síntesis de N²-tert-butoxicarbonil (Boc)-esfingosina (2)

- 25 Se disolvió esfingosina 1 (25 mg, 0,083 mmol) en 1,5 ml de diclorometano. Se añadió gota a gota trietilamina (9,1 µl, 0,125 mmol). Luego se añadió Boc₂O (20 mg, 0,092 mmol) disuelto en 1 ml de diclorometano. La reacción se agitó durante cuatro horas a temperatura ambiente. Luego se extrajo la capa orgánica con diclorometano y se lavó con agua (3 x 5 ml) y con salmuera (3 x 5 ml). Finalmente se secó la capa orgánica en MgSO₄ anhidro. El disolvente se retiró por desecación y el crudo resultante se utilizó en la próxima etapa sin mayor purificación.
- 30

Síntesis de O-1,3-diacetil-N²-tert-butoxicarbonil (Boc)-esfingosina (3) y O-1,3-diacetil-esfingosina (4)

- 35 SE disolvió la N-Boc esfingosina 2 (35 mg, 0,083 mmol) en 3 ml de piridina y luego se añadió cuidadosamente Ac₂O (330 µl, 3,52 mmol). La reacción se agitó una noche a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó y el crudo resultante se purificó por cromatografía de flash (CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂/MeOH 3 %). La esfingosina 3 totalmente protegida (36 mg, 0,074 mmol) en una mezcla de CH₂Cl₂/TFA 20 %. La reacción se agitó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se evaporó el disolvente y el crudo se volvió a disolver en 3 ml de AcOEt y 0,5 ml de MeOH. El carbonato en el soporte sólido (10,0 eq) se añadió y se agitó la mezcla durante una hora a temperatura ambiente. El soporte sólido se filtró y se evaporó el disolvente hasta la desecación produciendo la esfingosina 4 resultante protegida (27 mg, 0,070 mmol), que se utilizó sin mayor purificación en la próxima etapa.
- 40

Conjugación con ARN_{pi}

- 45 La secuencia de ARN (X-GGCUACGUCCAGGAGCGCAdTdT donde X = un éster activo y dT es un nucleótido desoxitimidina) (SEC ID N^o 15) se preparó en un sintetizador de ADN en una escala de 200 nmol. Ras el ensamblaje de la secuencia de ARN se introdujo en el extremo 5' un grupo carboxilo que tenía un éster N-hidroxisuccinimida utilizando la correspondiente fosforamidita. En este punto se trató el soporte sólido con el derivado 4 de esfingosina protegida de la siguiente manera: el soporte de ARN (200 nmol), mg del compuesto 4 en 1 ml de un 10 % de trietilamina en diclorometano, 5 horas a temperatura ambiente. Tras el tratamiento, se lavó el soporte sólido con acetonitrilo y se trató con amoniaco concentrado/etanol (3/1, v/v). La solución de amoniaco se concentró hasta desecación y se trató con una solución de N-trietilamina tris (hidrofluoruro) a 65 °C durante 2,5 h. Se aislaron los ARN por precipitación con éter y el ARN resultante se purificó por HPLC de fase inversa según los protocolos basados en DMT.
- 50

Síntesis de conjugados oligonucleótido 3'-esfingosina

Se ensayaron las siguientes reacciones (Figura 3):

- 60 1) Reacción de esfingosina a T₈-3'-amino por activación con carbonildiimidazol. La secuencia de octatimidina (5'-TTTTTTTT-3'-amino) se ensambló en soportes controlados de cristal poroso funcionalizado con lisina protegida con el grupo fluorenilcarbonilo lábil a bases (Fmoc) descrito por de la Torre et al, 2002. Tras el ensamblaje de la secuencia, el soporte sólido se trató con 0,1 M de 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undeceno (DBU) para generar un grupo amino libre. El soporte sólido que tenía T₈-3'-amino se hizo reaccionar con carbonildiimidazol para generar una función reactiva carbonilimidazol. El soporte se trató entonces con D-esfingosina (8,6 mg, 28 µmoles) y el soporte resultante se trató con amoniaco concentrado. El análisis HPLC reveló la formación del producto deseado (entrada 3, tabla de la Figura 5) que se obtuvo con un rendimiento del 10 %. El producto final se caracterizó UV y
- 65

espectrometría de masas.

2) Síntesis de 3'-esfingosina-octatimidina por introducción de un éster de carboxi N-hidroxisuccinimida en el extremo 3' utilizando una molécula ramificada asimétrica seguida por reacción con esfingosina. La secuencia de octatimidina (5'-TTTTTTTT-3') se ensambló en soportes controlados de cristal poroso funcionalizado con una molécula ramificada asimétrica que consistía en un diol que tiene un grupo hidroxilo protegido con el grupo lábil a ácidos fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) descrito por Aviñó et al 2004. Tras el ensamblaje de la secuencia el soporte sólido se acetiló con anhídrido acético y el soporte resultante se trató con 0,1 M 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undeceno (DBU). Luego, el grupo N-hidroxisuccinimida carboxi del extremo 3' del oligonucleótido se introdujo utilizando éster N-hidroxisuccinimida del ácido 10-oxadecanoico 10-(N, N-diisopropil-O-cianoetilfosoramidita). El soporte sólido que tenía el 3'-éster carboxi -T8 se hizo reaccionar con D-esfingosina. El soporte resultante se trató con amoníaco concentrado y los combinados filtrados se analizaron por HPLC en fase inversa. El análisis HPLC revelaba la formación del producto deseado (entrada 4, tabla de la Figura 5) que se obtuvo con un rendimiento del 4 %. El producto final se caracterizó por UV y espectrometría de masas.

3) Reacción de esfingosina con 3'-carboxi-T8 por activación con dicitohexilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida. La secuencia de octatimidina (5'-TTTTTTTT-3') se ensambló en un soporte de cristal poroso funcionalizado con ácido glutámico protegido con el grupo lábil a bases fluorenilmetilo (Fm) descrito por de la Torre et al 2002. Tras el ensamblaje de la secuencia, el soporte sólido se trató con 0,1 M DBU en acetonitrilo. El soporte sólido que tiene el 3'-carboxi-T8 se activó con dicitohexilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida para generar una función carboxilo activada. El soporte se trató con D-esfingosina y el soporte resultante se trató con amoníaco concentrado. Los combinados filtrados se analizaron por HPLC en fase inversa. El compuesto deseado (entrada 5, Tabla de la Figura 5) se eluyó a los 17 min.

4) Reacción de esfingosina con una secuencia 3'-amino-2'-O-metil-ARN por activación con carbonildiimidazol.

La secuencia de oligonucleótidos (5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCACCCdTdT-3'-lisina) (SEC ID N° 14) se ensambló utilizando el 2'-O-metil-ARN y fosoramiditas timidina apropiadas. El soporte sólido resultante se trató con DBU para generar un grupo amino libre que reaccionaba con la esfingosina como se ha descrito anteriormente. El soporte resultante se trató con amoníaco concentrado durante 1 h a 55 °C y los filtrados se analizaron por HPLC de fase inversa. El análisis HPLC reveló la formación del producto deseado con se obtuvo con un rendimiento del 10 %. El producto final se caracterizó por UV y espectrometría de masas.

Preparación de un soporte sólido funcionalizado con esfingosina para la preparación de conjugados oligonucleótidos 3'-esfingosina (Figura 4, método A)

Se preparó un derivado protegido de esfingosina adecuado para la incorporación de oligonucleótidos utilizando el método de fosoramidita. Primero se protegió el grupo amino de la esfingosina utilizando el grupo trifluoroacetilo y el grupo fluoronilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Estos dos grupos son lábiles al amoníaco. La reacción de la D-esfingosina con etil trifluoroacetato en diclorometano producía el derivado trifluoroacetilo deseado de la esfingosina con rendimientos excelentes (rendimiento del 95 %). El tratamiento de la esfingosina con 9-fluorenilmetil cloroformato y N, N-diisopropiletilamina en diclorometano daba el derivado protegido por Fmoc deseado con un rendimiento del 68 %.

La segunda etapa era la protección del hidroxilo primario de la esfingosina con el grupo dimetoxitritilo (DMT) lábil a ácidos. La reacción de los derivados protegidos por Fmoc y trifluoroacetilo de esfingosina con cloruro de dimetoxitritilo en piridina producían los productos esperados como se determina por TLC pero los productos no eran estables en columnas de gel de sílice y por esta razón estos productos se aislaron con bajos rendimientos. Entonces, se seleccionó el grupo monometoxitritilo (MMT) menos lábil. La reacción del derivado de esfingosina protegido con trifluoroacetilo con cloruro de monometoxitritilo en piridina producía el producto esperado que se podía aislar en gel de sílice con un rendimiento del 63 %.

Finalmente, los derivados O-DMT y el O-MMT, N-trifluoroacetilo de la esfingosina se hicieron reaccionar con anhídrido succínico y dimetilaminopiridina para producir los hemisuccinatos correspondientes que se utilizaron para la funcionalización del soporte de cristal poroso controlado por amino (CPG). Los soportes resultantes se utilizaron para la síntesis de oligonucleótidos que llevan esfingosina en el extremo 3'. Véase la Figura 4 para un diagrama explicativo.

Síntesis de conjugados oligonucleótido 3'-esfingosina

Las secuencias de oligonucleótido (a: 5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCACCCdTdT-esfingosina y b: 5'-GGCUACGUC CAGGAGCGCACCCdT_{PS}dT_{PS}- esfingosina, _{PS}: indica la presencia de un enlace fosforotioato) se ensamblaron en un soporte funcionalizado con esfingosina protegida con el grupo trifluoroacetilo lábil a bases. Los soportes resultantes se trataron con una mezcla de solución concentrada de amoníaco y etanol (3/1, v/v). Los productos filtrados y desecados se trataron con una solución de N-trietilamina tris (hidrofluoruro) a 65 °C durante 2,5 h. Los ARN se aislaron por precipitación con éter y los aglomerados resultantes se purificaron por HPLC de fase inversa. El pico

principal se aisló con un rendimiento del 10 % y tenía la masa esperada. Secuencia a: M encontrados 7733, esperados 7726; Secuencia b: M encontrados 7700, esperados 7694, Secuencia I: M encontrados 7101, esperados 7115; Secuencia II: M encontrados 7091, esperados 7121; Secuencia III: M encontrados 7127, esperados 7143; Secuencia IV: M encontrados 7092, esperados 7111; Secuencia V: M encontrados 6630, esperados 6626; Secuencia VI: encontrados 6457, esperados 6457; Secuencia VII: M + 2Na⁺ encontrados 6146, esperados 6102; Secuencia A: M encontrados 7033, esperados 7029; Secuencia B: M encontrados 7036, esperados 7035; Secuencia C: M encontrados 6542, esperados 6540; Secuencia D: M + 2Na⁺ encontrados 6423, esperados 6371; Secuencia E: M + 2Na⁺ encontrados 6060, esperados 6016

10 *Preparación de un soporte sólido funcionalizado con esfingosina para la preparación de conjugados oligonucleótido 3'-esfingosina (método B).*

De manera alternativa se preparó un soporte sólido que tenía esfingosina adecuada para la preparación de conjugados de 3'-esfingosina oligonucleótido de la siguiente manera. Primero, se preparó un derivado de esfingosina protegido con diacetilo a partir de esfingosina disponible comercialmente. En este extremo, el grupo amino de la esfingosina se protegió con el grupo Boc (tert-Butiloxicarbonilo) utilizando una mezcla de Boc20 y trietilamina en diclorometano a temperatura ambiente. Entonces, el producto resultante se trató con anhídrido acético en piridina para obtener el derivado N-Boc-O, O-diacetil-esfingosina. El tratamiento de este compuesto con ácido trifluoroacético al 20 % en diclorometano producía el derivado de esfingosina protegido con O, O-diacetil. Este compuesto se hizo reaccionar con un soporte sólido funcionalizado con Boc-Lys como se ha descrito anteriormente pero utilizando p-nitrofenil clorofornato en vez de carbonil diimidazol (Figura 6).

Con el fin de evaluar el uso de este soporte para la síntesis de conjugados 3'-esfingosina oligonucleótido, se transfirió una alícuota de este soporte a un sintetizador ADN y se ensambló la siguiente secuencia de ADN 5'-CGCGAATTCGCG-esfingosina-3' (SEC ID N° 13). Los rendimientos de acoplamiento alcanzaban alrededor del 95 %. El soporte sólido resultante se trató con una solución de amoníaco (32 %), y se desaló (Sephadex G-25). El conjugado esperado 3'-esfingosina oligonucleótido se aisló, analizó utilizando HPLC analítico y se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF (esperado 4365, encontrado 4352). Véase la Figura 6 para un diagrama explicativo.

30 *Estudio de las propiedades biológicas de los dúplex ARN que tienen 3'-esfingosina.*

Siguiendo el método de síntesis descrito en la sección previa, se sintetizaron 12 oligorribonucleótidos, nueve de los cuales contenían esfingosina en su extremo 3' y tres de los cuales carecían de modificaciones. De estos oligonucleótidos 7 corresponden a una cadena en sentido de ARNpi de silenciamiento de EGFP y 5 correspondían a la cadena antisentido. Las secuencias y modificaciones se detallan a continuación:

Cadena sentido:

40 SEC ID N° 1) 5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCAdT*dT*-3'-esfingosina
Los asteriscos indican enlaces fosforotioato, y 3' esfingosina.

SEC ID N° 2) 5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCAdTdT-3'-esfingosina
45 Contiene esfingosina en 3'.

SEC ID N° 3) 5'-ggCUACGUCCAGGAGCGCAdT*dT*-3'-esfingosina
Los asteriscos indican enlaces fosforotioato, y ambas g en el 5' extremo son 2'-O-methyl RNA, y esfingosina en 3'

50 SEC ID N° 4) 5'-ggCUACGUCCAGGAGCGCAdTdT-3'-esfingosina
Ambas g en el 5' extremo son 2'-O-methyl RNA, y esfingosina en 3'.

SEC ID N° 5) 5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCAdTdT-3'
Sin modificaciones

55 SEC ID N° 6) 5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCA-3'-esfingosina
Contiene esfingosina en 3' pero no dT

60 SEC ID N° 7) 5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCA-3'
Sin modificaciones, sin dT en el extremo 3'

Cadena antisentido:

65 SEC ID N° 8) 5'-UGCGCUCCUGGACGUAGCCdT*dT*-3'-esfingosina
Los asteriscos indican enlaces fosforotioato, y 3' esfingosina.

SEC ID Nº 9) 5'-UGCGCUCCUGGACGUAGCCdT-3'-esfingosina
 Contiene esfingosina en el extremo 3'.

5 SEC ID Nº 10) 5'-UGCGCUCCUGGACGUAGCCdT-3'
 Sin modificaciones

SEC ID Nº 11) 5'-UGCGCUCCUGGACGUAGCC-3'-esfingosina
 Contiene esfingosina en 3' pero no dT

10 SEC ID Nº 12) 5'-UGCGCUCCUGGACGUAGCC
 Sin modificaciones, sin dT en el extremo 3'

15 Todos estos oligonucleótidos se purificaron por HPLC y se caracterizaron por medio de espectrometría de masas y HPLC analítica.

Con los oligonucleótidos descritos anteriormente se prepararon 14 dúplex de acuerdo con las siguientes combinaciones:

- 20 Compuesto 1: 1-8, esfingosina y fosforotioato en ambas cadenas
- Compuesto 2: 1-10, esfingosina y fosforotioato en la cadena en sentido
- Compuesto 3: 2-9, esfingosina en ambas cadenas
- Compuesto 4: 2-10, esfingosina en la cadena en sentido
- Compuesto 5: 3-10, esfingosina, fosforotioato y 2'-O-methylRNA en la cadena en sentido
- 25 Compuesto 6: 4-8, esfingosina y 2'-O-methyl RNA en la cadena en sentido, y esfingosina y fosforotioato en la cadena antisentido
- Compuesto 7: 4-10, esfingosina y 2'-O-methyl RNA en la cadena en sentido, y sin modificaciones en la cadena antisentido
- Compuesto 8: 5-8, sin modificaciones en la cadena sentido, y esfingosina y fosforotioato en la cadena antisentido
- 30 Compuesto 9: 5-9, sin modificaciones en la cadena sentido y esfingosina en la cadena antisentido.
- Compuesto 10: 5-10, sin modificaciones en cualquier cadena.
- Compuesto 11: 6-11, sin extremos protuberantes y esfingosina en 3' en ambas cadenas sentido y antisentido
- Compuesto 12: 6-12, sin extremos protuberantes, esfingosina en 3' en la cadena en sentido.
- Compuesto 13: 7-11, sin extremos protuberantes, esfingosina en 3' en la cadena antisentido
- 35 Compuesto 14: 7-12, sin extremos protuberantes, sin modificaciones

Todos estos compuestos se forman por hibridación de las cadenas en sentido y antisentido indicadas de tal manera que el ARNpi resultante tiene una región de cadena doble de 19 nucleótidos, y, para los Compuestos 1 a 10 protruye un dinucleótido en 3', de forma que estos nucleótidos protuberantes son desoxi-timidina.

40 Los 14 compuestos se analizaron entonces en cuanto a su capacidad de silenciamiento genético en cultivos celulares in vitro, y también en cuanto a su estabilidad en el suero.

Estabilidad en fluidos biológicos: suero de ratón

45 Las soluciones de reserva de los compuestos anteriores se prepararon en PBS (solución salina fosfato tamponada) a una concentración de 200 µM. Luego, se añadieron 5 µl de cada una de estas soluciones de reserva a 45 µl de una solución que contenía un 10 % de suero de ratón diluido en PBS.

50 La solución resultante se incubó a 37 °C durante 30 minutos o durante 24 horas, tras lo cual se analizaron las soluciones para detectar el compuesto remanente intacto utilizando HPLC-UV.

La tabla siguiente muestra la cantidad de compuesto intacto recuperado tras el tiempo de incubación indicado para cada uno de los compuestos analizados.

COMPUESTO	30 minutos	24 horas
1	74	0
2	66	68
3	100	48
4	84	11
5	74	78
6	71	0

7	81	10
8	69	68
9	48	21
10	0	0

Como se puede apreciar, el ARNpi control sin modificar (compuesto 10) estaba completamente degradado tras solo 30 minutos en contacto con el suero de ratón, mientras que las diferentes moléculas conjugadas con esfingosina mostraban claramente un aumento de estabilidad contra ARNasas.

5

Silenciamiento génico In vitro: células MDCK-EGFP

Como modelo de eficacia de ensayo de los ARNpi conjugados anteriores con esfingosina que se dirigen a *EGFP*, se empleó una línea celular MDCK-EGFP, una modificación de la línea celular MDCK transfectada establemente con el vector de expresión GFP. Las células MDCK-EGFP se transfectaron con 100 nM de diferentes compuestos y lipofectamina 2000 como agentes de transfección. Todas las transfecciones se hicieron siguiendo las condiciones de referencia del fabricante. Se ensayaron diez ARNpi diferentes modificados, que se describen como Compuestos 10 a 10, en los párrafos anteriores. En la misma transfección se utilizaron dos ARNpi diferentes como controles, un ARNpi desnudo con la misma secuencia EGFP y un ARNpi codificado. Para cada condición se tomaron imágenes de fluorescencia a las 24, 48, 72 y 96 horas para evaluar las posibles variaciones en los niveles de proteína fluorescente. Los aglomerados celulares se recolectaron y procesaron por PCR-RT en tiempo real, los inventores utilizaron el Método Comparativo de Umbrales.

10

15

20

Como muestran los resultados (figura 8), no solo el mecanismo de acción del ARNpi no está afectado cuando se añaden las modificaciones de esfingosina a la estructura del ARNpi sino que se consigue un aumento de su eficacia de interferencia en los puntos de tiempo más largos con respecto a la secuencia desnuda EGFP. A las 96 horas no se observa una recuperación total de los niveles de ARNm EGFP cuando se utilizan los compuestos de la invención, mientras que se produce una recuperación completa de los niveles de expresión de EGFP en este punto de tiempo cuando se transfectaron ARNpi desnudos.

25

Además, también se analizaron los compuestos de ARNpi con una estructura de extremo truncado del nucleótido 19 modificada con esfingosina en cuanto a la eficacia en el silenciamiento genético. Como se puede apreciar por la figura 9, los compuestos 11 a 13 (descritos en los párrafos precedentes) que contienen esfingosina en diferentes posiciones tienen una eficacia de interferencia de ARN similar al compuesto 14 (que no tiene unida esfingosina).

30

A partir de estos resultados, se puede deducir que la conjugación de esfingosina en la estructura básica de ARNpi mejora la estabilidad de dicha molécula de ARNpi sin afectar su eficacia, e incluso mejorándola.

35

Además, los ARNpi también se conjugaron con esfingosina en su extremo 5'. La figura 10 muestra una comparación entre los compuestos que tienen 21 nt estructuras con protrusiones, 19 nucleótidos con estructuras de extremos truncados, con esfingosina en los extremos 3' o 5' en sus cadenas en sentido. Como se puede deducir, todas estas estructuras daban como resultado el aumento de la resistencia a la degradación en el suero en comparación con los ARNpi sin conjugar.

40

Como se deduce claramente a partir de los ejemplos prácticos anteriores, la conjugación de estructuras que interfieren el ARN con esfingosina, es una contribución altamente relevante al campo, ya que aumenta la estabilidad de los compuestos en el suero, un obstáculo principal para el suministro de estos compuestos a los tejidos diana deseados, mientras que se mantiene una buena capacidad de silenciamiento genético.

45 **Referencias**

Aviñó, A., Grimau, M.G., et al. (2004) "Synthesis and triple-helix stabilization properties of branched oligonucleotides carrying 8-aminoadenine." *Helv. Chim. Acta*, 87:303-316.

50

Boutorine, A.S. Kostina, E.V. (1993). "Reversible covalent attachment of cholesterol to oligodeoxyribonucleotides for studies of the mechanisms of their penetration into eukaryotic cells". *Biochemie*, 75:35-41.

Cerutti, L., N. Mian, et al. (2000). "Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain." *Trends Biochem Sci* 25(10): 481-2.

55

- Collins, R. E. and X. Cheng (2005). "Structural domains in RNAi." FEBS Lett 579(26): 5841-9.
- De la Torre, B.G., Morales, J.C., et al. (2002) "Synthesis of oligonucleotides carrying anchoring groups and their use in the preparation of oligonucleotide-gold conjugates." *Helv. Chim. Acta*, 85:2594-2607.
- 5 Elbashir, S. M., W. Lendeckel, et al. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* 15(2): 188-200.
- 10 Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-11.
- Godard, G., Bourtoune, A.S., et al. (1995). "Antisense effects of cholesterol-oligodeoxynucleotide conjugates associated with poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Eur. J. Biochem.*, 232:404-410.
- 15 Gryaznov, S.M., Lloyd, D.H. (1993). "Modulation of oligonucleotide duplex and triplex stability via hydrophobic interactions" *Nucleic Acids Res.*, 21:5909-5915.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A micro-RNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." *Science* 297(5589): 2056-60.
- 20 LeDoan, T., Eto, F., et al. (1999). "Cell binding, uptake and cytosolic partition of HIV anti-gag phosphodiester oligonucleotides 3'-linked to cholesterol derivatives in macrophages" *Bioorg. Med. Chem.*, 7:2263-2269.
- 25 Liu, J., M. A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* 305(5689): 1437-41.
- Ma, J. B., Y. R. Yuan, et al. (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein." *Nature* 434(7033): 666-70.
- 30 Nykanen, A., B. Haley, et al. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* 107(3): 309-21.
- Orban, T. I. and E. Izaurralde (2005). "Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome." *Rna* 11 (4): 459-69.
- 35 Parrish, S., J. Fleenor, et al. (2000). "Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference." *Mol Cell* 6(5): 1077-87.
- Rand, T. A., S. Petersen, et al. (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." *Cell* 123(4): 621-9.
- 40 Song, J. J., S. K. Smith, et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science* 305(5689): 1434-7.
- 45 Soutschek, J., A. Akinc, et al. (2004). "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs." *Nature* 432(7014): 173-8.
- 50 Wolfrum C., Shi, S., Jayaprakash, et al. (2007). "Mechanism and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs" *Nature Biotech.* 25: 1149-1157.
- Zelphati, O., Wagner, E., et al. (1994). "Synthesis and anti-HIV activity of thiocholesteryl-coupled phosphodiester antisense oligonucleotides incorporated into immunoliposomes" *Antiviral Res.*, 25:13-25.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> Sylentis S.A.
- <120> Nuevos fármacos para inhibición de la expresión genética
- 60 <130> PC925015WO
- <150> GB0910723.6
- <151> 22-06-2009
- 65 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> contiene enlaces fosforotioato

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> unido a esfingosina en el extremo 3'

<400> 1
 ggcuacgucc aggagcgcan n 21

30 <210> 2
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20) .. (21)
 <223> n = desoxitimidina

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> contiene esfingosina en el extremo 3'

<400> 2
 ggcuacgucc aggagcgcan n 21

50 <210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> g = gm (2'-o-metilguanosina)

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

<223> n = desoxitimidina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (20)..(21)
 <223> contiene enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (21)..(21)
 <223> contiene esfingosina en el extremo 3'
 <400> 3
 15 ggcuacgucc aggagcgcan n 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> g = gm (2'-0-metilguanosina)
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> contiene esfingosina en el extremo 3'
 <400> 4
 40 ggcuacgucc aggagcgcan n 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido no modificado
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina
 <400> 5
 55 ggcuacgucc aggagcgcan n 21
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> contiene esfingosina en el extremo 3'
 5
 <400> 6
 ggcuacgucc aggagcgca 19

 <210> 7
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10

 <220>
 <223> oligonucleótido no modificado
 15
 <400> 7
 ggcuacgucc aggagcgca 19

 <210> 8
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20

 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina
 25

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina
 30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> contiene enlaces fosforotioato
 35

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> contiene esfingosina en el extremo 3'
 40
 <400> 8
 ugcgcuccug gacguagccn n 21
 45
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina
 55

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> contiene esfingosina en el extremo 3'
 60
 <400> 9

ugcguccug gacguagccn n 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido no modificado
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina
 15
 <400> 10
 ugcguccug gacguagccn n 21
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> contiene esfingosina en el extremo 3'
 30
 <400> 11
 ugcguccug gacguagcc 19
 35
 <210> 12
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido no modificado
 <400> 12
 ugcguccug gacguagcc 19
 45
 <210> 13
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> conjugado de 3'-esfingosina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> contiene esfingosina en el extremo 3'
 55
 <400> 13
 cgcgattcg cg 12
 60
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65

ES 2 537 568 T3

<220>
<223> oligonucleótido no modificado

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> n = desoxitimidina

10 <400> 14
ggcuacgucc aggagcgcac cnn 23

15 <210> 15
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> contiene un éster activo en la posición 5'

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = desoxitimidina

30 <400> 15
ggcuacgucc aggagcgcan n 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la preparación de un conjugado que consiste en un oligonucleótido conjugado con una molécula de esfingosina, comprendiendo el proceso la conjugación de un oligonucleótido con una esfingosina.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la esfingosina se conjuga con un oligonucleótido por enlaces fosfato o amida.
- 10 3. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende las etapas de:
 unir un grupo amino o carboxilo en al menos un extremo de un oligonucleótido;
 activar dicho grupo amino o carboxilo; y permitir que un grupo amino en una esfingosina se una al grupo activado del oligonucleótido, tal que el grupo activado se desplace y se forme un conjugado oligonucleótido-esfingosina.
- 15 4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha esfingosina se proporciona en un soporte sólido, y la conjugación con el oligonucleótido tiene lugar en dicho soporte sólido; y opcionalmente a) en donde el ensamblaje de la secuencia de oligonucleótido tiene lugar en dicho soporte sólido; o b) en donde el ensamblaje de las secuencias de oligonucleótido tiene lugar a partir de la función alcohol de la esfingosina por sucesivas adiciones de las nucleósido fosforamidas.
- 20 5. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha esfingosina se hace reaccionar con un oligonucleótido activado en solución.
- 25 6. Un compuesto que consiste en un oligonucleótido conjugado con una molécula de esfingosina.
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 en que dicho compuesto se proporciona como un ARN desnudo.
8. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 en el que dicha esfingosina es D-esfingosina.
- 30 9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicha esfingosina se conjuga en el extremo 3' del nucleótido, el extremo 5', o una esfingosina se conjuga a cada uno de los extremos 3' y 5' del nucleótido.
- 35 10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que dicho oligonucleótido comprende desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o ambos.
- 40 11. Un compuesto que comprende un oligonucleótido conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que se hibrida por complementariedad de bases con un oligonucleótido homólogo, opcionalmente en donde dicho oligonucleótido homólogo también es un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10; opcionalmente también en donde dicho oligonucleótido hibridado es un ARNpi.
- 45 12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 11, en el que una esfingosina se conjuga en cualquiera de los siguientes:
 - la cadena sentido, o
 - la cadena antisentido, o
 - tanto las cadenas sentido y antisentido del oligonucleótido hibridado, en donde una esfingosina se conjuga en el extremo 3', el extremo 5' o una esfingosina se conjuga en cada uno de los extremos 3' y 5' del oligonucleótido.
- 50 13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 en el que dicho oligonucleótido tiene entre 15 y 25 nucleótidos de longitud; o en el que dicho oligonucleótido hibridado comprende una región de cadena doble de 19 nucleótidos con dinucleótidos protuberantes en 3'; o en el que dicho oligonucleótido hibridado tiene una estructura de doble cadena de 19 nucleótidos con los extremos truncados.
- 55 14. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 para su uso como un medicamento.
15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13.
- 60 16. Un método para suprimir la expresión de un gen diana en una célula in vitro, comprendiendo el método poner en contacto una célula con un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en donde el oligonucleótido del compuesto comprende una secuencia de ácido nucleico que se corresponde con una secuencia de ácido nucleico del gen diana.

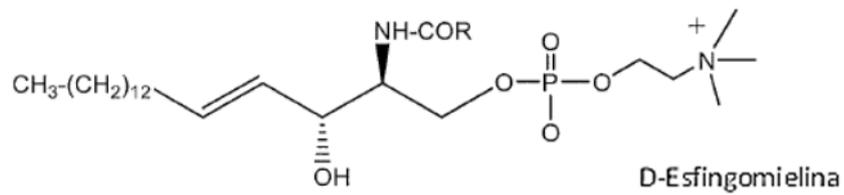
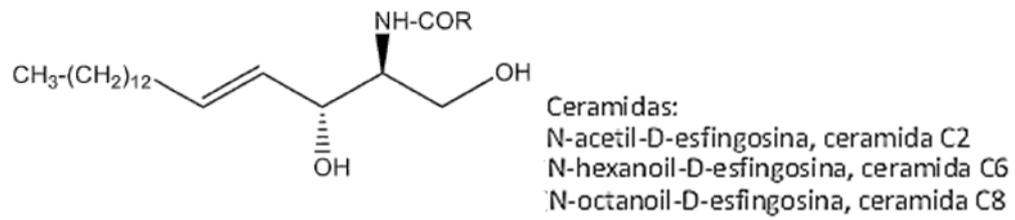
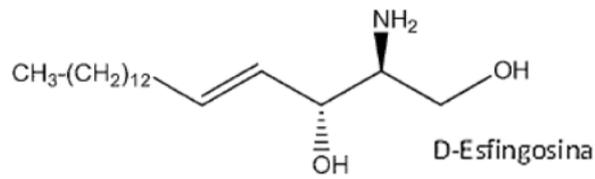


Figura 1

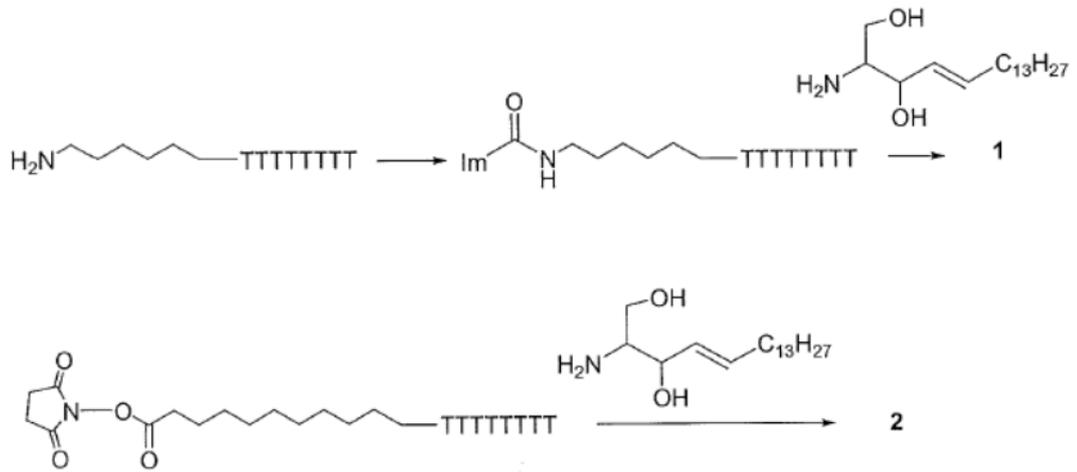


Figura 2

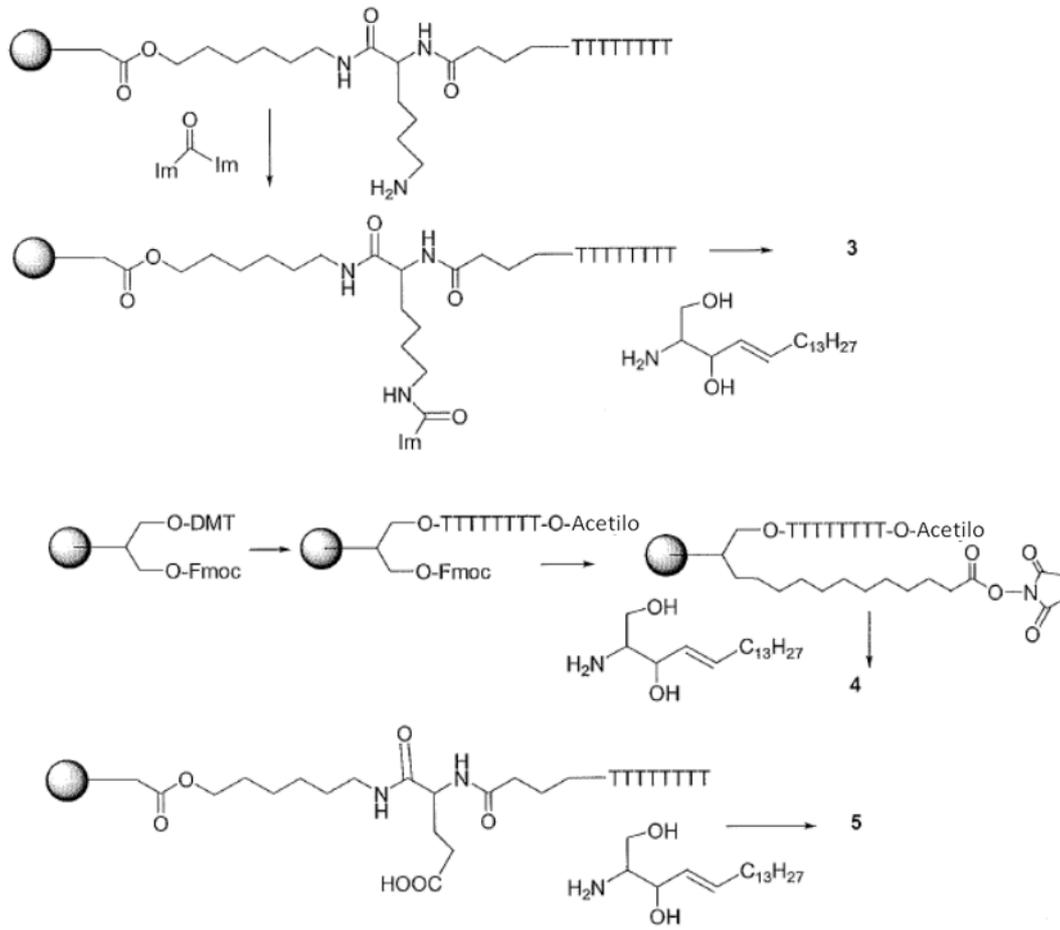


Figura 3

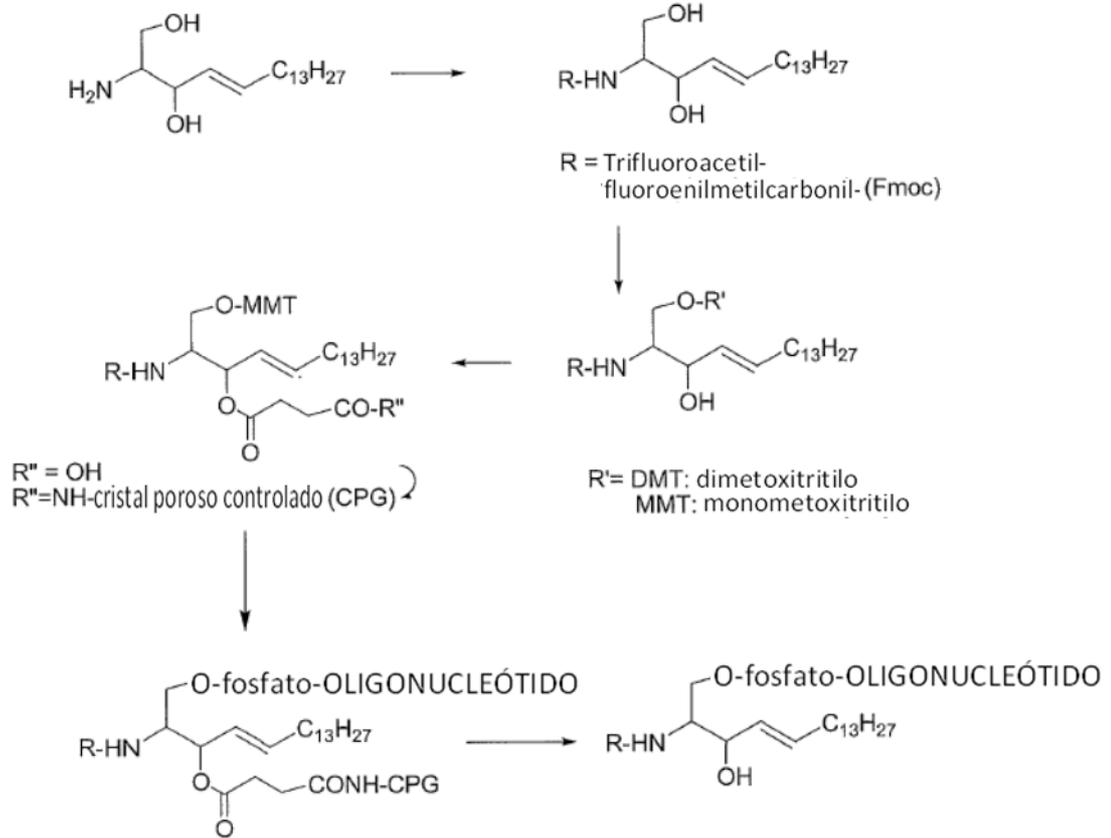


Figura 4

Entrada	Estructura
1	$T_8 - O^5PO_3 - (CH_2)_6 - NH - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ C - H \\ \\ H \end{array} - \begin{array}{c} H \\ \\ C - H \\ \\ OH \end{array} - C = C - C_{13}H_{27}$
2	$T_8 - O^5PO_3 - (CH_2)_9 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ C - H \\ \\ H \end{array} - \begin{array}{c} H \\ \\ C - H \\ \\ OH \end{array} - C = C - C_{13}H_{27}$
3	$T_8 - O^3PO_3 - (CH_2)_3 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - \begin{array}{c} HO(H_2C)_6HNOC \\ \end{array} - (CH_2)_4 - NH - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ C - H \\ \\ OH \end{array} - C = C - C_{13}H_{27}$
4	$HO - \begin{cases} NHCO - (CH_2)_6 - O^3 - OPO_3 - T_8 \\ NHCO - (CH_2)_6 - OPO_3 - (CH_2)_9 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ C - H \\ \\ OH \end{array} - C = C - C_{13}H_{27} \end{cases}$
5	$T_8 - O^3PO_3 - (CH_2)_3 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - \begin{array}{c} HO(H_2C)_6HNOC \\ \end{array} - (CH_2)_2 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ C - H \\ \\ OH \end{array} - C = C - C_{13}H_{27}$

Figura 5

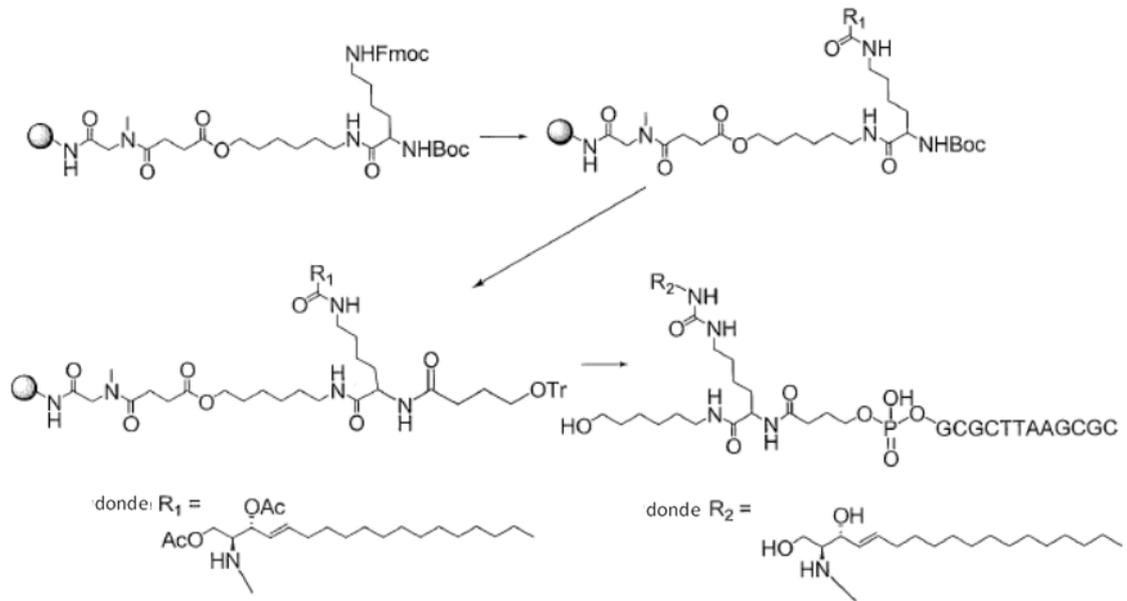


Figura 6

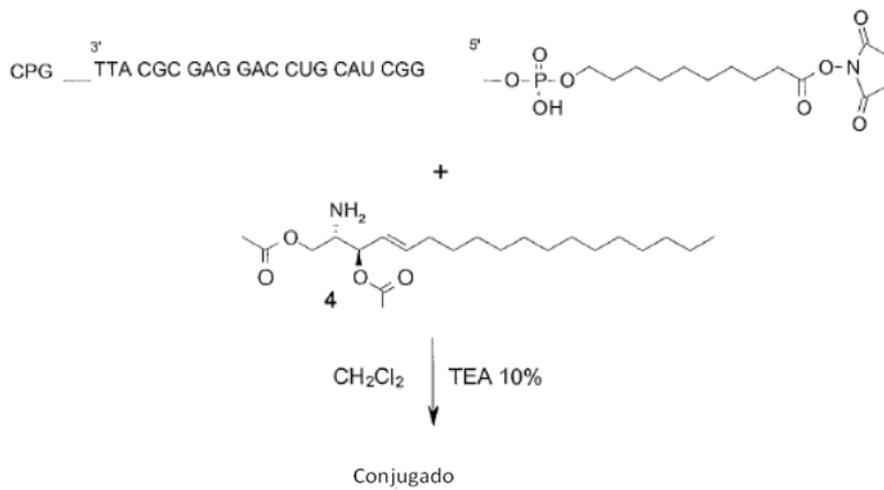
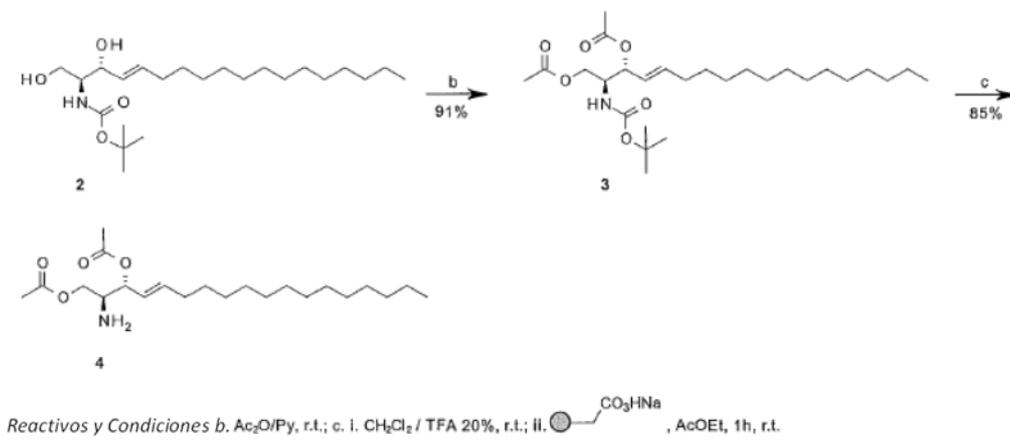
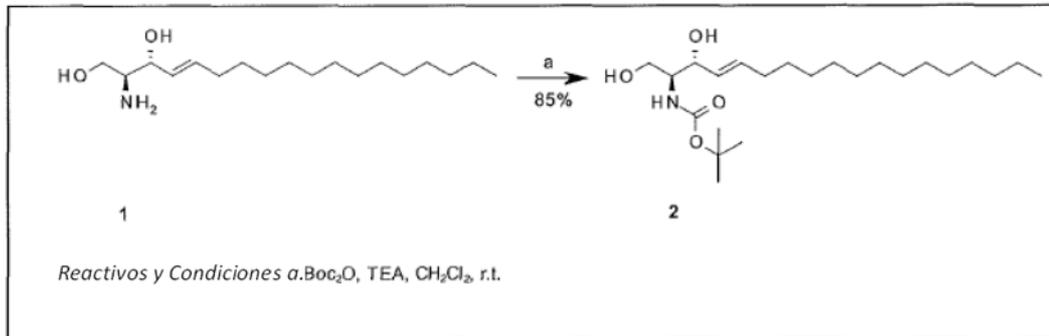


Figura 7

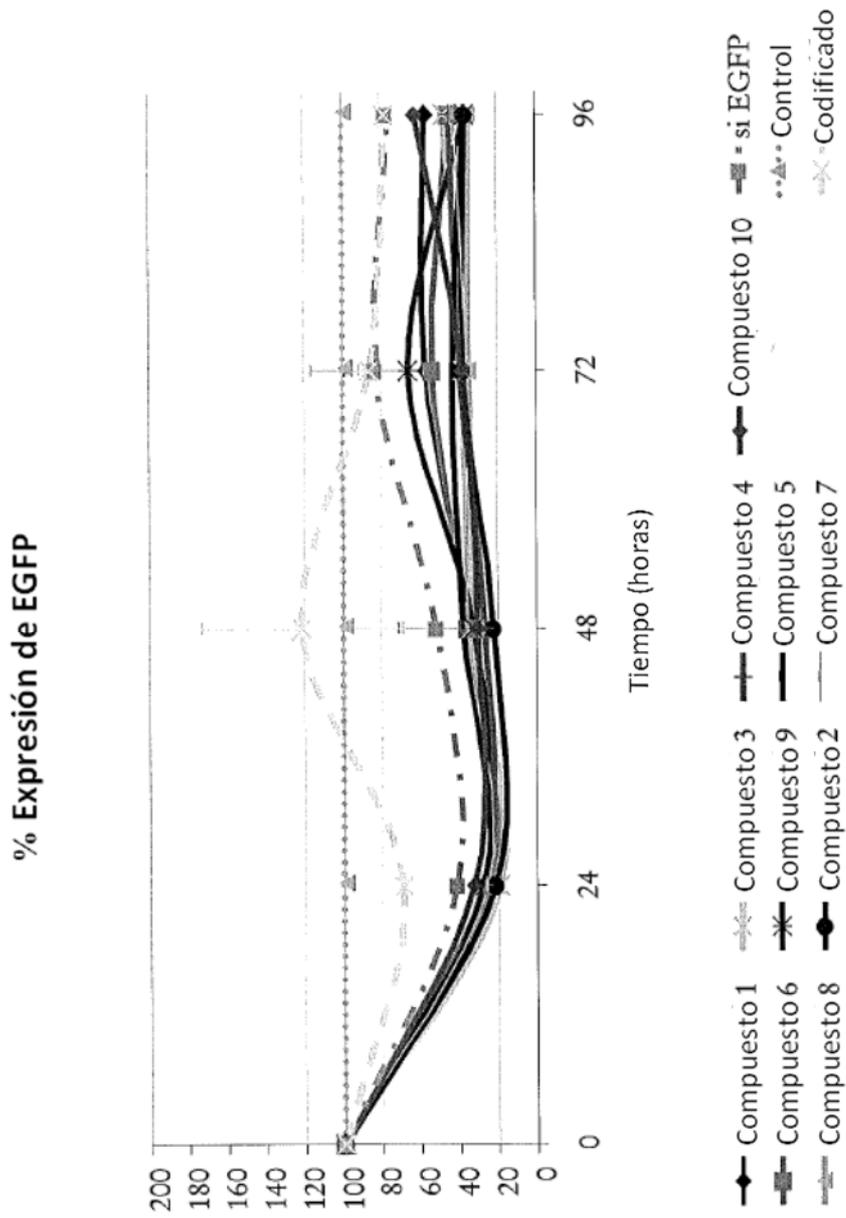
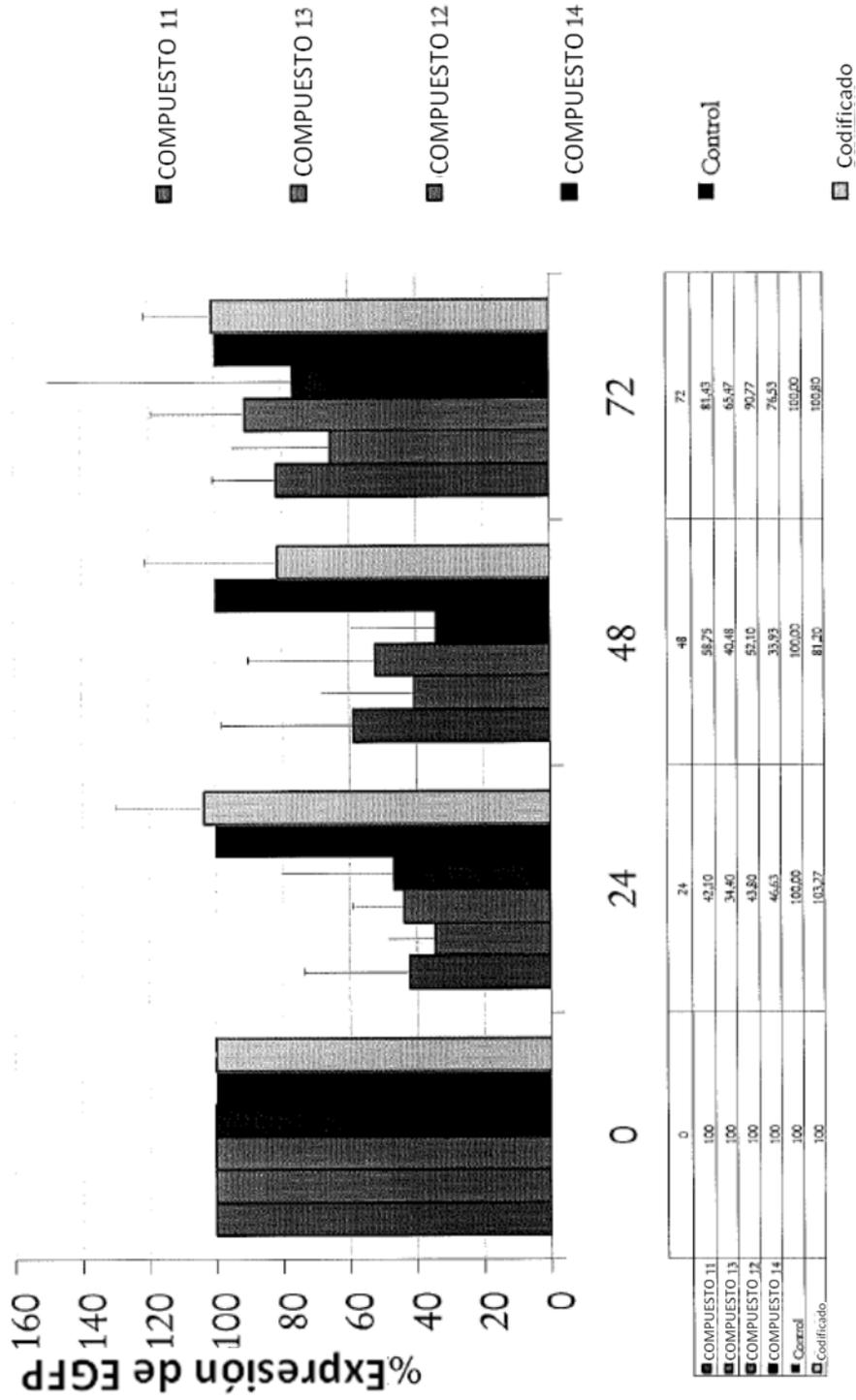


Figura 8



Tiempo (horas)

Figura 9

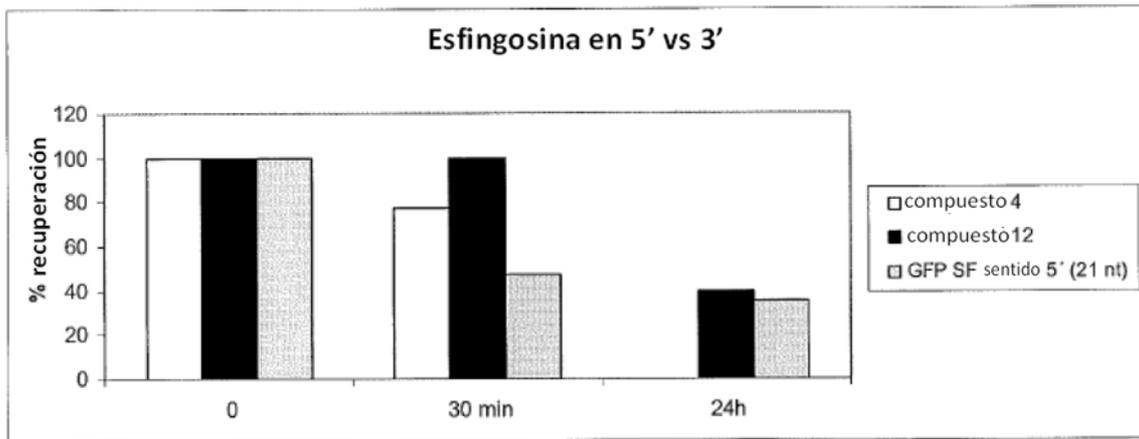


Figura 10