

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 057**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/712** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2010 E 10724511 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2440215**

54 Título: **Nuevos potentes compuestos antisentido anti-ApoB**

30 Prioridad:

**12.06.2009 US 186388 P**

**20.10.2009 US 253090 P**

**18.12.2009 WO PCT/EP2009/067561**

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

**28.12.2015**

73 Titular/es:

**ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN  
A/S (100.0%)  
Fremtidsvej 3  
2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**NIELSEN, NIELS FISKER;  
STRAARUP, ELLEN MARIE y  
LINDHOLM, MARIE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 555 057 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 potentes compuestos antisentido anti-ApoB

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos oligoméricos (oligómeros) con diana en el ARNm de APO-B100 en una célula, que conducen a la expresión reducida de APO-B100. La reducción de la expresión de APO-B100 resulta beneficiosa para un abanico de trastornos médicos, tales como enfermedades asociadas a la actividad de la apolipoproteína B, tal como, en un ejemplo no limitativo, diferentes tipos de desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipemias, por ejemplo la hiperlipemia combinada familiar (HLCF), la hiperlipemia adquirida, la hipercolesterolemia, la hipercolesterolemia resistente a estatinas, la enfermedad arterial coronaria (EAC), la enfermedad cardiaca coronaria (ECC) y la aterosclerosis.

## 15 CASOS RELACIONADOS

Las solicitudes nº WO2007/031081 y nº WO2008/113830 siguientes están relacionadas.

## 20 ANTECEDENTES

Ver la sección de antecedentes de los documentos nº WO2007/031081 y nº WO2008/113830.

El documento nº US 2008/242629 y Crooke Rosanne et al., Journal of Lipid Research, Bethesda, MO, US, vol. 46, nº 5, páginas 872 a 884, dan a conocer gámpmeros con diana en apoB-100.

Además, los documentos nº WO 2004/091515 y nº WO 2006/053430 dan a conocer agentes ARNip con diana en apoB-100. Sigue existiendo una necesidad de agentes adicionales que sean seguros y no tóxicos y que sean capaces de antagonizar eficazmente la función de la apolipoproteína B y en consecuencia de reducir los niveles plasmáticos de Lp(a).

La presente invención proporciona compuestos oligoméricos eficaces y seguros de ácido nucleico bloqueado (ANB) y la utilización de los mismos en métodos para modular la expresión de la apolipoproteína B, ApoB-100, incluyendo la inhibición de la isoforma alternativa de la apolipoproteína B, ApoB-48.

## 35 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La invención proporciona un oligómero de entre 12 y 16 nucleótidos de longitud que comprende SEC ID nº 4 capaz de modular la expresión de la apolipoproteína B. SEC ID nº 4 es homóloga respecto a una región correspondiente al complemento inverso de un gen o ARNm de APO-B100 de mamífero, tal como la variante humana (nº de acceso de GenBank: NM\_000384 o nº de acceso de GenBank: NG\_011793) o variante natural de la misma. De esta manera, por ejemplo el oligómero se hibrida con una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que presenta la secuencia de una parte de las secuencias de ARNm de APOB-100 o del gen APOB-100.

La invención proporciona un conjugado que comprende el oligómero según la invención y por lo menos una fracción no nucleótida o no polinucleótida unida covalentemente a dicho oligómero.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligómero o el conjugado según la invención y un diluyente, portador, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona el oligómero o conjugado según la invención, para la utilización como medicamento, tal como para el tratamiento de enfermedades asociadas a la actividad de la apolipoproteína B, tal como, en un ejemplo no limitativo, diferentes tipos de desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipemias, por ejemplo la hiperlipemia combinada familiar (HLCF), la hipercolesterolemia, la hipercolesterolemia resistente a estatinas, la enfermedad arterial coronaria (EAC), la enfermedad cardiaca coronaria (ECC) y la aterosclerosis.

La invención proporciona la utilización de un oligómero o conjugado según la invención, para la utilización en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades asociadas a la actividad de la apolipoproteína B, tal como, en un ejemplo no limitativo, diferentes tipos de desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipemias, por ejemplo la hiperlipemia combinada familiar (HLCF), la hipercolesterolemia, la hipercolesterolemia resistente a estatinas, la enfermedad arterial coronaria (EAC), la enfermedad cardiaca coronaria (ECC) y la aterosclerosis.

Se da a conocer además un método de tratamiento de enfermedades asociadas a la actividad de la apolipoproteína

B, tal como, en un ejemplo no limitativo, diferentes tipos de desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipemias, por ejemplo la hiperlipemia combinada familiar (HLCF), la hiperlipemia adquirida, la hipercolesterolemia, la hipercolesterolemia resistente a estatinas, la enfermedad arterial coronaria (EAC), la enfermedad cardiaca coronaria (ECC), la aterosclerosis, comprendiendo dicho método la administración de, por ejemplo, una dosis eficaz de un oligómero, un conjugado o una composición farmacéutica según la invención, en un paciente que sufre de, o es probable que sufra de enfermedades asociadas a la actividad de la apolipoproteína B, tal como, en un ejemplo no limitativo, diferentes tipos de desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipemias, por ejemplo la hiperlipemia combinada familiar (HLCF), la hiperlipemia adquirida, la hipercolesterolemia, la hipercolesterolemia resistente a estatinas, la enfermedad arterial coronaria (EAC), la enfermedad cardiaca coronaria (ECC) y la aterosclerosis.

La invención proporciona un método in vitro para la inhibición de APO-B100 en una célula que expresa APO-B100, comprendiendo dicho método la administración de un oligómero, o un conjugado según la invención, en dicha célula, de manera que se produce la inhibición de APO-B100 en dicha célula.

#### 15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: expresión del ARNm de apoB en células HuH-7 tras el tratamiento con oligonucleótidos ANB, SEC ID nº 26 a nº 50. Los datos están normalizados respecto a GAPDH y se presentan respecto a un control "simulado" como media + STD, n=2. A muestra la SEC ID nº 26 a 38 y B muestra SEC ID nº 39-50.

Figura 2: Colesterol sérico total medido una vez a la semana en ratones C57BL/6J en los que se han administrado 10 mg/kg de SEC ID nº 28, 29, 44 o 45 durante 4 semanas y en el momento del sacrificio, 48 horas después de la última administración de oligonucleótido ANB. Los datos se presentan respecto al control (solución salina administrada) como media ± std, n=5. CT=colesterol total.

Figura 3: administración repetida de 3 oligonucleótidos diferentes con diana en apoB, SEC ID nº 45 a niveles de dosis diferentes. La figura muestra A) el efecto sobre el colesterol total medido en el suero una semana después de la administración, y B) los niveles de ALT al final del estudio.

Figura 4: niveles de colesterol sérico total (A) y efecto sobre la proporción HDL/LDL (B) en diferentes puntos temporales después de una única administración de SEC ID nº 29 a niveles de dosis diferentes.

Figura 5: colesterol sérico total medido semanalmente una semana después de la administración (las flechas indican la administración A) una vez a la semana, B) una vez cada dos semanas). Los ratones recibieron administraciones durante 70 días y se recuperaron 1 a 3 semanas después de la última dosis antes de ser sacrificados.

Figura 6: expresión de ARNm de ApoB en el hígado el día 77 (final del tratamiento, 7 días después de la última dosis) y el día 91 (final del periodo de recuperación).

Figura 7: niveles de ALT en el suero el día de sacrificio 77, una semana después de la última administración y el día 91, 3 semanas después de la última administración.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### 45 El oligómero

La presente invención utiliza compuestos oligoméricos (denominados en la presente memoria oligómeros) para la utilización en la modulación de la función de moléculas de ácidos nucleicos codificantes de APO-B100 de mamífero, tal como el ácido nucleico de APO-B100 o el ARNm o gen de APO-B100 humano, y variantes naturales de dichas moléculas de ácidos nucleicos codificantes de APO-B100 de mamífero. El término "oligómero" en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula formada mediante enlace covalente de dos o más nucleótidos (es decir, un oligonucleótido). En la presente memoria un único nucleótido (unidad) también puede denominarse monómero o unidad. El oligómero consiste o comprende una secuencia contigua de nucleótidos de entre 10 y 50, por ejemplo entre 10 y 30 nucleótidos de longitud, que comprende SEC ID nº 4, capaz de modular la expresión de la apolipoproteína B.

En diversas realizaciones, el compuesto de la invención no comprende (unidades de) ARN. Resulta preferente que el compuesto según la invención sea una molécula lineal o sea sintetizada en forma de molécula lineal. El oligómero es una molécula de cadena sencilla y preferentemente no comprende regiones cortas de, por ejemplo, por lo menos 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos, los cuales son complementarios a regiones equivalentes dentro del mismo oligómero (es decir, dúplex). A este respecto el oligómero no es (esencialmente) de doble cadena. En algunas realizaciones el oligómero esencialmente no es de doble cadena, por ejemplo es un ARNip. En diversas realizaciones, el oligómero de la invención puede consistir enteramente de la región de nucleótidos contigua. De esta manera, el oligómero no

es sustancialmente autocomplementario.

La diana

5 Convenientemente, el oligómero de la invención es capaz de regular negativamente la expresión del gen APO-B100. En este aspecto, el oligómero de la invención puede afectar a la inhibición de APO-B100, típicamente en un mamífero, tal como una célula humana, tal como hepatocitos. En algunas realizaciones, los oligómeros de la invención se unen al ácido nucleico diana y producen la inhibición de la expresión de por lo menos 10% o 20% del nivel de expresión normal, más preferentemente una inhibición de por lo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 10 90% o 95% del nivel de expresión normal. En algunas realizaciones, dicha modulación se observa al utilizar una concentración de entre 0,04 y 25 nM, tal como de entre 0,8 y 20 nM, de compuesto de la invención. En la misma realización o en una diferente, la inhibición de la expresión es inferior a 100%, tal como una inhibición inferior a 98%, una inhibición inferior a 95%, una inhibición inferior a 90%, una inhibición inferior a 80%, tal como una inhibición inferior a 70%. Puede determinarse la modulación del nivel de expresión mediante la medición de los niveles de proteína, por ejemplo mediante métodos tales como SDS-PAGE, seguido de transferencia western, utilizando anticuerpos adecuados producidos contra la proteína diana. Alternativamente, la modulación de los niveles de expresión puede determinarse mediante la medición de los niveles de ARNm, por ejemplo mediante transferencia northern o RT-PCR cuantitativa. Al medir mediante niveles de ARNm, el nivel de regulación negativa al utilizar una dosis apropiada, tal como una concentración de entre 0,04 y 25 nM, tal como de entre 0,8 y 20 nM, es, en algunas realizaciones, típicamente a un nivel de entre 10% y 20% los niveles normales en ausencia del compuesto de la invención.

25 Por lo tanto, la invención proporciona un método para regular negativamente o inhibir la expresión de proteína APO-B100 y/o ARNm en una célula que expresa proteína APO-B100 y/o ARNm, comprendiendo dicho método la administración del oligómero o conjugado según la invención en dicha célula para regular negativamente o inhibir la expresión de la proteína y/o ARNm de APO-B100 en dicha célula. Convenientemente, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula humana. La administración puede realizarse, en algunas realizaciones, in vitro. La administración puede realizarse, en algunas realizaciones, in vivo.

30 La expresión "ácido nucleico diana", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al ADN o ARN codificante del polipéptido APO-B100 de mamífero, tal como APO-B100 humano, tal como el ARNm de la APO-B100 humana. Los ácidos nucleicos codificantes de APO-B100 o variantes naturales de los mismos y los ácidos nucleicos de ARN derivados de los mismos, preferentemente ARNm, tal como pre-ARNm, aunque preferentemente ARNm maduro. En algunas realizaciones, por ejemplo en el uso en investigación o diagnóstico, el "ácido nucleico diana" puede ser un ADNc o un oligonucleótido sintético derivado de los ácidos nucleicos de ADN o ARN diana anteriormente indicados. 35 El oligómero según la invención preferentemente es capaz de hibridarse con el ácido nucleico diana. Se reconocerá que el ARNm de APO-B100 humano es una secuencia de ADNc, y como tal, corresponde a la secuencia del ARNm maduro diana, aunque en lugar de uracilo las secuencias de ADNc presentan timidina.

40 La expresión "variante natural de los mismos" se refiere a variantes del polipéptido APO-B100 de la secuencia de ácidos nucleicos que existe naturalmente dentro del grupo taxonómico definido, tal como un mamífero, tal como un ratón o mono, y preferentemente el ser humano. Típicamente, al hacer referencia a "variantes naturales" de un polinucleótido, la expresión puede comprender además cualquier variante alélica del ADN genómico codificante de APO-B100 mediante traslocación o duplicación cromosómica, y el ARN, tal como el ARNm, derivado del mismo. 45 La expresión "variantes naturales" puede incluir además variantes derivadas del procesamiento alternativo del ARNm de APO-B100. En referencia a una secuencia polipeptídica específica, por ejemplo el término incluye además formas naturales de la proteína que pueden después procesarse, por ejemplo mediante modificaciones cotraduccionales o post-traduccionales, tales como el corte de péptidos de señal, el corte proteolítico, la glucosilación, etc.

50 Secuencias

La solicitud da a conocer oligómeros que comprenden o consisten de una secuencia contigua de nucleótidos que corresponde al complemento inverso de una secuencia de nucleótidos presente en el ARNm de APO-B100 humano. De esta manera, el oligómero puede comprender o consistir de una secuencia seleccionada de entre el grupo que 55 consiste de las SEC ID nº 1 a 25 (Tabla 1), en la que dicho oligómero (o parte nucleótida contigua del mismo) puede presentar opcionalmente una, dos o tres no correspondencias con dicha secuencia seleccionada.

Tabla 1

Sustancia de ensayo	Longitud	Sec. diana
SEC ID nº 1	14	5'-TCTGAAGTCCATGA-3'
SEC ID nº 2	14	5'-GGATCAAATATAAG-3'
SEC ID nº 3	14	5'-GTTGACACTGTCTG-3'

SEC ID nº 4	12	5'-GTTGACACTGTC-3'
SEC ID nº 5	14	5'-GACTGCCTGTTCTC-3'
SEC ID nº 6	13	5'-CGTTGGAGTAAGC-3'
SEC ID nº 7	14	5'-GCGTTGGAGTAAGC-3'
SEC ID nº 8	14	5'-CTCTGTGATCCAGG-3'
SEC ID nº 9	14	5'-GGACTCTGTGATCC-3'
SEC ID nº 10	14	5'-CTGTTTGAGGGACT-3'
SEC ID nº 11	14	5'-GAGATGGCAGATGG-3'
SEC ID nº 12	14	5'-GCTGGTGTGGCCAC-3'
SEC ID nº 13	13	5'-CAGATCCTTGAC-3'
SEC ID nº 14	14	5'-CCAGATCCTTGAC-3'
SEC ID nº 15	12	5'-ACCTTTTGAGAC-3'
SEC ID nº 16	14	5'-CAATGTTTCAGACTG-3'
SEC ID nº 17	14	5'-CCTGCAATGTTTCAG-3'
SEC ID nº 18	14	5'-TAGGGCTGTAGCTG-3'
SEC ID nº 19	14	5'-GTTGGTCTACTTCA-3'
SEC ID nº 20	14	5'-CCAACCAATTTCTC-3'
SEC ID nº 21	14	5'-GTCAATTGTAAAGG-3'
SEC ID nº 22	14	5'-GTTTAAGAAATCCA-3'
SEC ID nº 23	12	5'-CTTAGTGTTAGC-3'
SEC ID nº 24	12	5'-GGTTCTTAGTGT-3'
SEC ID nº 25	14	5'-CTGGTTCTTAGTGT-3'

5 El oligómero puede comprender o consistir de una secuencia contigua de nucleótidos que es totalmente complementaria (perfectamente complementaria) respecto a la región equivalente de un ácido nucleico que codifica un APO-B100 de mamífero (por ejemplo ARNm de APO-B100 humano). De esta manera, el oligómero puede comprender o consistir de una secuencia antisentido de nucleótidos.

10 Sin embargo, en algunas realizaciones, el oligómero puede tolerar 1, 2, 3 o 4 (o más) no correspondencias, al hibridarse con la secuencia diana y todavía unirse suficientemente a la diana para mostrar el efecto deseado, es decir la regulación negativa de la diana. Las no correspondencias pueden compensarse, por ejemplo, por una longitud incrementada de la secuencia de nucleótidos del oligómero y/o por la presencia de un número incrementado de análogos de nucleótido, tales como ANB, en la secuencia de nucleótidos.

15 En algunas realizaciones, la secuencia contigua de nucleótidos comprende no más de 3, por ejemplo no más de 2 no correspondencias al hibridarse con la secuencia diana, tal como con la región correspondiente de un ácido nucleico que codifica una APO-B100 de mamífero.

20 En algunas realizaciones, la secuencia contigua de nucleótidos comprende no más de una única no correspondencia al hibridarse con la secuencia diana, tal como con la región correspondiente de un ácido nucleico que codifica una APO-B100 de mamífero.

25 La secuencia de nucleótidos de los oligómeros dados a conocer en la solicitud o la secuencia contigua de nucleótidos preferentemente es por lo menos 80% homóloga respecto a una secuencia correspondiente seleccionada de entre el grupo que consiste de las SEC ID nº 1 a 25, tal como por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96% homóloga, tal como 100% homóloga (idéntica).

30 La secuencia de nucleótidos de los oligómeros dados a conocer en la solicitud o la secuencia contigua de nucleótidos es preferentemente por lo menos 80% homóloga respecto al complemento inverso de una secuencia correspondiente presente en el ARNm de la APOB100 humana, tal como por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96% homóloga, tal como 100% homóloga (idéntica).

35 La secuencia de nucleótidos de los oligómeros dados a conocer en la solicitud o la secuencia contigua de nucleótidos es preferentemente por lo menos 80% complementaria respecto a una subsecuencia presente en el ARNm de la APO-B100 humana, tal como por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96% complementaria, tal como 100% complementaria (perfectamente complementaria).

En la invención, el oligómero (o parte nucleotídica contigua del mismo) comprende la SEC ID nº 4.

Sin embargo, se reconoce que, en algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del oligómero puede comprender nucleótidos 5' o 3' adicionales, tales como, independientemente, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos 5' y/o 3' adicionales, los cuales son no complementarios respecto a la secuencia diana. En este aspecto, el oligómero puede comprender, en algunas realizaciones, una secuencia contigua de nucleótidos que se encuentra flanqueada en dirección 5' y/o 3' por nucleótidos adicionales. En algunas realizaciones, los nucleótidos 5' o 3' adicionales son nucleótidos naturales, tales como de ADN o ARN. En algunas realizaciones, los nucleótidos 5' o 3' adicionales pueden representar la región D tal como se hace referencia a la misma en el contexto de los oligómeros gámperos en la presente memoria.

El oligómero según la invención consiste o comprende una secuencia de nucleótidos según la SEC ID nº 4.

Al determinar la "homología" entre los oligómeros de la invención (o secuencia contigua de nucleótidos) y el ácido nucleico que codifica la APO-B100 de mamífero o el complemento inverso de la misma, tal como los dados a conocer en la presente memoria, puede llevarse a cabo la determinación de la homología mediante una simple alineación con la secuencia de nucleótidos correspondiente del compuesto de la invención y la región correspondiente del ácido nucleico que codifica la APO-B100 (o ácido nucleico diana) de mamífero, o el complemento inverso del mismo, y la homología se determina mediante el recuento del número de bases que se alinean y dividiendo el número total de nucleótidos contiguos en el compuesto de la invención, y multiplicando por 100. En dicha comparación, en caso de existir huecos, resulta preferible que dichos huecos sean meramente no correspondientes y no áreas en las que el número de nucleótidos en el hueco difiere entre la secuencia de nucleótidos de la invención y el ácido nucleico diana.

Las expresiones "correspondiente a" y "corresponde a" se refieren a la comparación entre la secuencia de nucleótidos del oligómero o secuencia contigua de nucleótidos (una primera secuencia) y la secuencia contigua de nucleótidos equivalente de una secuencia adicional seleccionada de entre i) una subsecuencia del complemento inverso del ácido nucleico diana, tal como el ARNm que codifica la proteína APO-B100, tal como el ARNm de APO-B100 humano, y/o ii) la secuencia de nucleótidos proporcionada en la presente memoria, tal como el grupo que consiste de la SEC ID nº 4 o subsecuencia de la misma. Los análogos de nucleótido se comparan directamente con sus nucleótidos equivalentes o correspondientes. Una primera secuencia que corresponde a una secuencia adicional bajo i) o ii) típicamente es idéntica a dicha secuencia a lo largo de la primera secuencia (tal como la secuencia contigua de nucleótidos) o, tal como se indica en la presente memoria, puede, en algunas realizaciones, ser por lo menos 80% homóloga respecto a una secuencia correspondiente, tal como por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96% homóloga, tal como 100% homóloga (idéntica).

Las expresiones "análogo de nucleótido correspondiente" y "nucleótido correspondiente" pretenden indicar que el nucleótido en el análogo de nucleótido y el nucleótido natural son idénticos. Por ejemplo, al unir la unidad 2-desoxirribosa del nucleótido a una adenina, el "análogo de nucleótido correspondiente" contiene una unidad de pentosa (diferente de la 2-desoxirribosa) unida a una adenina.

#### Longitud

La solicitud describe oligómeros que pueden comprender o consistir de una secuencia contigua de nucleótidos de un total de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos contiguos de longitud.

En la invención, los oligómeros comprenden o consisten de una secuencia contigua de nucleótidos de una longitud total de entre 12 y 16, tal como de 13, 14, 15 o 16 nucleótidos contiguos.

En algunas realizaciones, los oligómeros comprenden o consisten de una secuencia contigua de nucleótidos de una longitud total de 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos contiguos.

En algunas realizaciones, el oligómero según la invención consiste de no más de 15 o 16 nucleótidos.

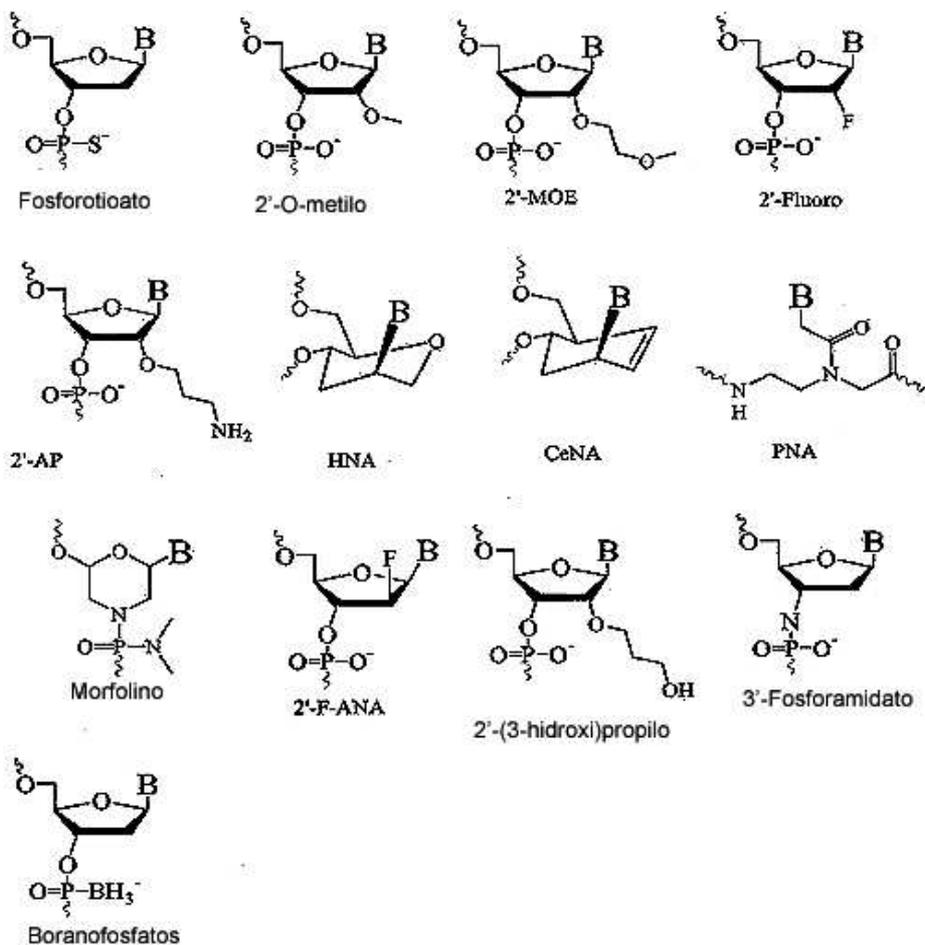
#### Análogos de nucleótido

El término "nucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un glucósido que comprende una fracción sacárida, una fracción base y un grupo fosfato unido covalentemente y cubre tanto nucleótidos naturales, tales como ADN o ARN, preferentemente ADN, como nucleótidos no naturales que comprenden fracciones sacárida y/o base, los cuales también se denominan "análogos de nucleótido" en la presente memoria.

Entre los nucleótidos no naturales se incluyen nucleótidos que presentan fracciones sacáridas modificadas, tales

como nucleótidos bicíclicos o nucleótidos modificados en 2', tales como nucleótidos con sustitución en 2'.

Los "análogos de nucleótido" son variantes de los nucleótidos naturales, tales como los nucleótidos de ADN o ARN, en virtud de modificaciones en las fracciones sacárida y/o base. Los análogos podrían ser en principio meramente "silenciosos" o "equivalentes" a los nucleótidos naturales en el contexto del oligonucleótido, es decir, no presentar ningún efecto funcional sobre la manera en que funciona el oligonucleótido en la inhibición de la expresión del gen diana. Este tipo de análogos "equivalentes" podría sin embargo resultar útil en el caso de que, por ejemplo, resultasen más fáciles o más económicos de producir, o en el caso de que fuesen más estables durante el almacenamiento o bajo las condiciones de fabricación, o representasen una etiqueta o marcaje. Sin embargo, preferentemente los análogos presentarán un efecto funcional sobre la manera en que funciona el oligómero en la inhibición de la expresión; por ejemplo, mediante la producción de una afinidad de unión incrementada a la diana y/o una resistencia incrementada a nucleasas intracelulares y/o una facilidad incrementada de transporte al interior de la célula. Se describen ejemplos específicos de análogos de nucleósido en, por ejemplo, Freier y Altmann, Nucl. Acid Res. 25:4429-4443, 1997, y en Uhlmann, Curr. Opinion in Drug Development 3(2):293-213, 2000, y en el Esquema 1:



Esquema 1

De esta manera, el oligómero puede comprender o consistir de una simple secuencia de nucleótidos naturales, preferentemente desoxinucleótidos 2' (denominados de manera general en la presente memoria "ADN"), sino también posiblemente ribonucleótidos (denominados de manera general en la presente memoria "ARN"), o una combinación de dichos nucleótidos naturales y uno o más nucleótidos no naturales, es decir análogos de nucleótidos. Dichos análogos de nucleótidos pueden incrementar convenientemente la afinidad del oligómero para la secuencia diana.

En el documento nº WO 2007/031091 se proporcionan ejemplos de análogos de nucleótido adecuados y preferentes o se hace referencia a ellos.

La incorporación de análogos de nucleótido potenciadores de la afinidad en el oligómero, tal como ANB o sacáridos 2'-sustituídos, puede permitir la reducción del tamaño del oligómero de unión específica, y también puede reducir el límite superior del tamaño del oligómero antes de que tenga lugar la unión no específica o aberrante.

5 En algunas realizaciones, el oligómero comprende por lo menos 2 análogos de nucleótido. En algunas realizaciones, el oligómero comprende entre 3 y 8 análogos de nucleótido, por ejemplo 6 o 7 análogos de nucleótido. En las realizaciones claramente más preferentes, por lo menos uno de dichos análogos de nucleótido es un ácido nucleico bloqueado (ANB), por ejemplo por lo menos 3 o por lo menos 4, o por lo menos 5, o por lo menos 6, o por lo menos 7, u 8, análogos de nucleótido pueden ser ANB. En algunas realizaciones, todos los análogos de nucleótido pueden ser de ANB.

15 Se reconocerá que, al hacer referencia a un motivo de secuencia de nucleótidos o a una secuencia de nucleótidos preferente, que consiste de únicamente nucleótidos, los oligómeros de la invención que están definidos por dicha secuencia pueden comprender un análogo de nucleótido correspondiente en lugar de uno o más de los nucleótidos presentes en dicha secuencia, tal como unidades de ANB u otros análogos de nucleótido, que elevan la  $IT_m$  de estabilidad del dúplex oligómero/diana (es decir, los análogos de nucleótido potenciadores de la afinidad).

20 En algunas realizaciones, cualesquiera no correspondencias entre la secuencia de nucleótidos del oligómero y la secuencia diana preferentemente se encuentran en regiones fuera de los análogos de nucleótido potenciadores de afinidad, tal como en la región B tal como se denomina en la presente memoria, y/o en la región D tal como se denomina en la presente memoria, y/o en el sitio de nucleótidos no modificados, tales como de ADN, en el oligonucleótido, y/o en regiones situadas en 5' o 3' respecto a la secuencia contigua de nucleótidos.

25 Entre los ejemplos de dicha modificación del nucleótido se incluyen la modificación de la fracción sacárida para proporcionar un grupo sustituyente 2' o para producir una estructura puenteada (ácido nucleico bloqueado) que potencia la afinidad de unión y puede proporcionar además una resistencia incrementada a las nucleasas.

30 Un análogo de nucleótido preferente es el ANB, tal como oxi-ANB (tal como beta-D-oxi-ANB y alfa-L-oxi-ANB), y/o amino-ANB (tal como beta-D-amino-ANB y alfa-L-amino-ANB) y/o tio-ANB (tal como beta-D-tio-ANB y alfa-L-tio-ANB) y/o ENA (tal como beta-D-ENA y alfa-L-ENA). Resulta más preferente beta-D-oxi-ANB.

35 En algunas realizaciones, los análogos de nucleótido presentes en el oligómero de la invención (tal como en las regiones A y C mencionadas en la presente memoria) se seleccionan independientemente de entre, por ejemplo: unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de ANB, unidades de ácido arabino-nucleico (AAN), unidades de 2'-fluoro-AAN, unidades de ANH, unidades de ANI (ácido nucleico intercalante; Christensen, Nucl. Acids Res. 30:4918-4925, 2002). y unidades de 2'MOE. En algunas realizaciones se observa únicamente uno de los tipos anteriormente indicados de análogos de nucleótido presentes en el oligómero de la invención o una secuencia contigua de nucleótidos del mismo.

40 En algunas realizaciones, los análogos de nucleótido son monómeros de 2'-O-metoxietil-ARN (2'-MOE), 2'-fluoro-ADN o análogos de nucleótidos de ANB, y de esta manera el oligonucleótido de la invención puede comprender análogos de nucleótido que se seleccionan independientemente de entre dichos tres tipos de análogo, o pueden comprender únicamente un tipo de análogo seleccionado de entre los tres tipos. En algunas realizaciones, por lo menos uno de dichos análogos de nucleótido es 2'-MOE-ARN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades nucleótidas de 2'-MOE-ARN. En algunas realizaciones, por lo menos uno de dichos análogos de nucleótido es 2'-fluoro-ADN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades nucleótidas de 2'-fluoro-ADN.

50 En algunas realizaciones, el oligómero según la invención comprende por lo menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (ANB), tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 unidades de ANB, tal como entre 3 y 7 o 4 a 8 unidades de ANB, o 3, 4, 5, 6 o 7 unidades de ANB. En algunas realizaciones, todos los análogos de nucleótido pueden ser de ANB. En algunas realizaciones, el oligómero puede comprender tanto beta-D-oxi-ANB, y uno o más de las unidades de ANB siguientes: tio-ANB, amino-ANB, oxi-ANB y/o ENA en configuración beta-D o alfa-L, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, todas las unidades de citosina del ANB son de 5'-metil-citosina. En algunas realizaciones de la invención, el oligómero puede comprender unidades de tanto ANB como ADN. Preferentemente el total combinado de unidades de ANB y ADN es de entre 10 y 25, preferentemente de entre 10 y 20, todavía más preferentemente de entre 12 y 16. En algunas realizaciones de la invención, la secuencia de nucleótidos del oligómero, tal como la secuencia contigua de nucleótidos, consiste de por lo menos un ANB y las unidades nucleótidas restantes son unidades de ADN. En algunas realizaciones, el oligómero comprende únicamente análogos de nucleótido ANB y nucleótidos naturales (tales como ARN o ADN, más preferentemente nucleótidos de ADN), opcionalmente con enlaces internucleotídicos modificados, tales como fosforotioato.

60 El término "nucleobase" se refiere a la fracción base de un nucleótido y cubre tanto las variantes naturales como las

no naturales. De esta manera, el término "nucleobase" cubre no sólo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos.

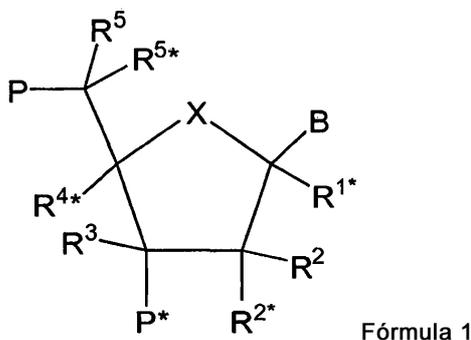
5 Entre los ejemplos de nucleobases se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina, hipoxantina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

10 En algunas realizaciones, por lo menos una de las nucleobases presentes en el oligómero es una nucleobase modificada seleccionada de entre el grupo que consiste de 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

ANB

15 El término "ANB" se refiere a un análogo de nucleótido bicíclico, conocido como "ácido nucleico bloqueado". Puede referirse a un monómero de ANB o, utilizado en el contexto de un "oligonucleótido de ANB", ANB se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más de dichos análogos de nucleótido bicíclicos. Los nucleótidos de ANB se caracterizan por la presencia de un 'puente' birradical entre C2' y C4' del anillo sacárido de ribosa, por ejemplo tal como se muestra como birradical  $R^{4*}-R^{2*}$ , tal como se indica posteriormente.

20 El ANB utilizado en los compuestos oligonucleótidos de la invención preferentemente presenta la estructura de fórmula general I:



25 en la que para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S, en la que X se selecciona de entre -O-, -S-,  $-N(R^N)-$ ,  $-C(R^O R^O)-$ , tal como, en algunas realizaciones, -O-, B se selecciona de entre hidrógeno, alcoxi  $C_{1-4}$  sustituido opcionalmente, alquilo  $C_{1-4}$  sustituido opcionalmente, aciloxi  $C_{1-4}$  sustituido opcionalmente, nucleobases, incluyendo nucleobases naturales y análogos de nucleobase, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores y ligandos,

30 P se refiere a un enlace internucleotídico con un monómero contiguo, o un grupo 5-terminal, tal como un enlace internucleotídico o grupo 5'-terminal, incluyendo opcionalmente el sustituyente  $R^5$  o de manera igualmente aplicable, el sustituyente  $R^{5*}$ ,

P\* se refiere a un enlace internucleotídico con un monómero contiguo, o un grupo 3'-terminal,

35  $R^{4*}$  y  $R^{2*}$  conjuntamente se refieren a un birradical que consiste de 1 a 4 grupos/átomos seleccionados de entre - $C(R^a R^b)-$ ,  $-C(R^a)=C(R^b)-$ ,  $-C(R^a)=N-$ , -O-,  $-Si(R^a)_2-$ , -S-,  $-SO_2-$ ,  $-N(R^a)-$  y  $>C=Z$ , en el que Z se selecciona de entre -O-, -S- y  $-N(R^a)-$ , y  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan independientemente, cada uno de entre hidrógeno, alquilo  $C_{1-12}$  sustituido opcionalmente, alquenilo  $C_{2-12}$  sustituido opcionalmente, alquinilo  $C_{2-12}$  sustituido opcionalmente, hidroxilo, alcoxi  $C_{1-12}$  sustituido opcionalmente, alcoxialquilo  $C_{2-2}$ , alqueniloxi  $C_{2-12}$ , carboxilo, alcoxi  $C_{1-12}$ -carbonil-alquilcarbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonil, heteroaril, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino,

40 mono- y di-alquilo  $C_{1-6}$ -amino, carbamoilo, mono- y di-alquilo  $C_{1-6}$ -amino-carbonilo, amino-alquilo  $C_{1-6}$ -aminocarbonilo, mono- y di-alquilo  $C_{1-6}$ -amino-alquil  $C_{1-6}$ -aminocarbonilo, alquil  $C_{1-6}$ -carbonilamino, carbamido, alcanoiloxi  $C_{1-6}$ , sulfono, alquil  $C_{1-6}$ -sulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio  $C_{1-6}$ , halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores y ligandos, en los que arilo y heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente y en los que los dos sustituyentes geminales  $R^a$  y  $R^b$  conjuntamente pueden designar metileno ( $=CH_2$ ) sustituido opcionalmente, en el que para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S, y,

45 cada uno de los sustituyentes  $R^{1*}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^{5*}$ ,  $R^6$  y  $R^6$ , que se encuentran presentes se selecciona independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $C_{1-12}$ , alquenilo  $C_{2-12}$  sustituido opcionalmente, alquinilo  $C_{2-12}$  sustituido opcionalmente, hidroxilo, alcoxi  $C_{1-12}$ , alcoxialquilalquilo  $C_{2-2}$ , alqueniloxi  $C_{2-12}$ , carboxilo, alcoxi  $C_{1-12}$ -carbonilo, alquil  $C_{1-12}$ -carbonilo, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di-alquilo  $C_{1-6}$ -amino, carbamoilo, mono- y di-alquilo  $C_{1-6}$ -amino-

carbonilo, amino-alquilo C<sub>1-6</sub>-aminocarbonilo, mono- y di-alquilo C<sub>1-6</sub>-amino-alquil C<sub>1-6</sub>-aminocarbonilo, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilamino, carbamido, alcanoiloxi C<sub>1-6</sub>, sulfono, alquil C<sub>1-6</sub>-sulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C<sub>1-6</sub>, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores y ligados, en los que arilo y heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente y en los que los dos sustituyentes germinales conjuntamente pueden designar oxo, tioxo, imino o metileno sustituido opcionalmente, en el que RN se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>, y en el que dos sustituyentes (no germinales) contiguos pueden referirse a un enlace adicional que resulta en un doble enlace, y RN\*, en caso de hallarse presente y no participar en un birradical, se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>, y sales básicas y sales de adición de ácido de los mismos. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S.

En algunas realizaciones, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren a un birradical que consiste de un grupo seleccionado de entre el grupo que consiste de C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-, C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-NR<sup>a</sup>-, C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-S- y C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-, en el que cada uno de R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> puede opcionalmente seleccionarse de manera independiente. En algunas realizaciones, R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> pueden opcionalmente seleccionarse de manera independiente de entre el grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>, tal como metilo, tal como hidrógeno.

En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5\*</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en orientación R o S.

En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5\*</sup> son hidrógeno.

En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido. Para todos los centros quirales pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son hidrógeno.

En algunas realizaciones, R<sup>5</sup> y R<sup>5\*</sup> se seleccionan, cada uno independientemente, de entre el grupo que consiste de H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> y -CH=CH<sub>2</sub>. Convenientemente en algunas realizaciones, R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup> son hidrógeno, mientras que el otro grupo (R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup>, respectivamente) se selecciona de entre el grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> sustituido o acilo (-C(=O)-) sustituido, en el que cada grupo sustituido está mono- o poli-sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, OJ<sub>1</sub>, SJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, COOJ<sub>1</sub>, CN, O-C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N(H)C(=NH)NR, R<sup>2</sup> o N(H)C(=X)N(H)J<sub>2</sub>, en el que X es O o S, y cada J<sub>1</sub> y J<sub>2</sub> es, independientemente, H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub>, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido o un grupo protector. En algunas realizaciones, R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup> es metileno sustituido, en el que entre los grupos sustituyentes preferentes se incluyen uno o más grupos seleccionados independientemente de entre F, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, OJ<sub>1</sub>, SJ<sub>1</sub>, O-C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N(H)C(=NH)NJ, J<sub>2</sub> o N(H)C(O)N(H)J<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, cada J<sub>1</sub> y J<sub>2</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1-6</sub>. En algunas realizaciones, R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup> es metilo, etilo o metoximetilo. En algunas realizaciones, R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup> es metilo. En una realización adicional, R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup> es etileno. En algunas realizaciones, R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup> es acilo sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>5</sup> o R<sup>5\*</sup> es C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos modificados en 5' se dan a conocer en el documento n° WO 2007/134181.

En algunas realizaciones, B es una nucleobase, incluyendo análogos de nucleobase y nucleobases naturales, tal como una purina o pirimidina, o una purina sustituida o pirimidina sustituida, tal como una nucleobase a la que se hace referencia en la presente memoria, tal como una nucleobase seleccionada de entre el grupo que consiste de adenina, citosina, timina, adenina, uracilo y/o nucleobase modificada o sustituida, tal como 5-tiazolo-uracilo, 2-tiouracilo, 5-propinil-uracilo, 2'-tio-timina, 5'-metilcitosina, 5-tiozolo-citosina, 5-propinil-citosina y 2,6-diaminopurina.

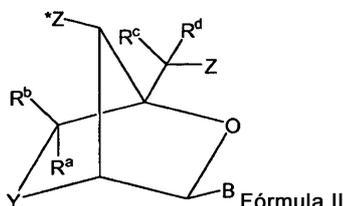
En algunas realizaciones, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren a un birradical seleccionado de entre -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-O-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-C(R<sup>e</sup>R<sup>f</sup>)-O-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-O-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-C(R<sup>e</sup>R<sup>f</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-N(R<sup>c</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-N(R<sup>e</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-N(R<sup>c</sup>)=O-, y -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-S-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-S-, en los que R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> y R<sup>f</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-12</sub> sustituido opcionalmente, alqueno C<sub>2-12</sub> sustituido opcionalmente, alquino C<sub>2-12</sub> sustituido opcionalmente, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-12</sub>, alcoxi alquilo C<sub>2-12</sub>, alquenoiloxi C<sub>2-12</sub>, carboxilo, alcoxicarbonilo C<sub>1-12</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-12</sub>, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di-alquil C<sub>1-6</sub>-amino, carbamilo, mono- y di-alquil C<sub>1-6</sub>-amino-carbonilo, mono- y

- di-alquilo C<sub>1-6</sub>-amino-alquil C<sub>1-6</sub>-aminocarbonilo, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilamino, carbamido, alcanoiloxi C<sub>1-6</sub>, sulfono, alquil C<sub>1-6</sub>-sulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C<sub>1-6</sub>, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores y ligandos, en los que arilo y heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente y en los que los dos sustituyentes germinales R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> conjuntamente pueden designar metileno (=CH<sub>2</sub>) sustituido opcionalmente. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en orientación R o S.
- En una realización adicional, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren a un birradical (grupo bivalente) seleccionado de entre -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-NH-O-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)-O-, and -CH(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>)-O- y/o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- y -CH=CH-. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S.
- En algunas realizaciones preferentes, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren al birradical -O-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)- (ácido nucleico bicíclico 2'-O-metoxietilo; Seth et al., J. Org. Chem., 2010), en configuración R o S.
- En algunas realizaciones preferentes, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren al ácido nucleico bicíclico birradical -O-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-(2'-O-etilo); Seth et al., J. Org. Chem., 2010), en configuración R o S.
- En algunas realizaciones preferentes, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren al birradical -O-CH(CH<sub>3</sub>)-, en configuración R o S. En algunas realizaciones, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren al birradical C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-N(R<sup>c</sup>)-O-, en el que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, alcoxilo C<sub>1-6</sub>, alcoxilo C<sub>1-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, tal como hidrógeno y en el que R<sup>c</sup> se selecciona de entre el grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, alcoxilo C<sub>1-6</sub>, alcoxilo C<sub>1-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, tal como hidrógeno.
- En algunas realizaciones, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren al birradical C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-C(R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>)-O-, en el que R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, alcoxilo C<sub>1-6</sub>, alcoxilo C<sub>1-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, tal como hidrógeno.
- En algunas realizaciones, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> forman el birradical -CH(Z)-O-, en el que Z se selecciona de entre el grupo que consiste de alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tio sustituido, y en el cada uno de los grupos sustituidos se mono- o poli-sustituye independientemente con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos, seleccionados independientemente de entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sup>3</sup>G(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> y CN, en el que cada J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1-6</sub>, y X es O, S o NJ<sub>1</sub>. En algunas realizaciones, Z es alquilo C<sub>1-6</sub> o alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido. En algunas realizaciones, Z es metilo. En algunas realizaciones, Z es alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido. En algunas realizaciones, dicho grupo sustituyente es alcoxi C<sub>1-6</sub>. En algunas realizaciones, Z es CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos se dan a conocer en la patente US n° 7.399.845. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5\*</sup> son hidrógeno. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3\*</sup> son hidrógeno y uno de entre R<sup>5</sup> y R<sup>5\*</sup> o ambos pueden ser diferentes de hidrógeno, tal como se ha indicado anteriormente y en el documento n° WO 2007/134181.
- En algunas realizaciones, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren a un birradical que comprende un grupo amino sustituido en el puente, tal como que consiste o comprende el birradical -CH<sub>2</sub>-N(R<sup>c</sup>)-, en el que R<sup>c</sup> es alquilo C<sub>1-12</sub>. En algunas realizaciones R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> conjuntamente se refieren a un birradical -Cq<sub>3</sub>q<sub>4</sub>-NOR-, en el que q<sub>3</sub> y q<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, alcoxilo C<sub>1-6</sub>, alcoxilo C<sub>1-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, en el que cada grupo sustituido se mono- o poli-sustituye independientemente con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre halógeno, OJ<sub>1</sub>, SJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, COOJ<sub>1</sub>, CN, O-C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N(H)C(=NH)N J<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o N(H)C(=X=N(H)J<sub>2</sub>), en el que X es O o S, y cada uno de J<sub>1</sub> y J<sub>2</sub> es, independientemente, H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, inoalquilo o un grupo protector. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos se dan a conocer en el documento n° WO 2008/150729. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5\*</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, alcoxilo C<sub>1-6</sub>, alcoxilo C<sub>1-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5\*</sup> son hidrógeno. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son hidrógeno y uno de R<sup>5</sup> y

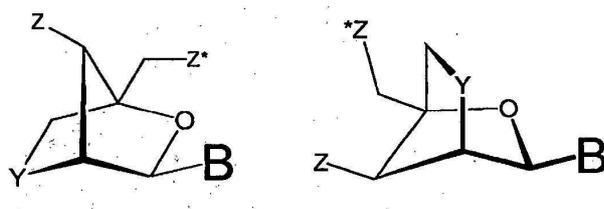
R<sup>5\*</sup> o ambos pueden ser diferentes de hidrógeno, tal como se ha indicado anteriormente y en el documento n° WO 2007/134181. En algunas realizaciones, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> se refieren conjuntamente a un birradical (grupo bivalente) C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-, en el que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son, cada uno independientemente, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, OJ<sub>1</sub> SJ<sub>1</sub>, SOJ<sub>1</sub>, SO<sub>2</sub>J<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ<sub>1</sub>, C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, C(=O)J<sub>1</sub>, O-C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N(H)C(=NH)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o N(H)C(=S)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, o R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> conjuntamente son =C(q<sub>3</sub>)(q<sub>4</sub>), q<sub>3</sub> y q<sub>4</sub> son, cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, cada grupo sustituido se mono- o poli-sustituye independientemente con grupo sustituyentes seleccionados independientemente de entre halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, OJ<sub>1</sub>, SJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN y C(=O)OJ<sub>1</sub>, C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, C(=O)J<sub>1</sub>, O-C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o N(H)C(=S)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> y cada uno de J<sub>1</sub> y J<sub>2</sub> es, independientemente, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, aminoalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, aminoalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o un grupo protector. Dichos compuestos se dan a conocer en el documento n° WO 2009/006478A.

En algunas realizaciones, R<sup>4\*</sup> y R<sup>2\*</sup> forman el birradical -Q-, en el que Q es C(q<sub>1</sub>)(q<sub>2</sub>)C(q<sub>3</sub>)(q<sub>4</sub>), C(q<sub>1</sub>)=C(q<sub>3</sub>), C=C(q<sub>1</sub>)(q<sub>2</sub>)-C(q<sub>3</sub>)(q<sub>4</sub>) o C(q<sub>1</sub>)(q<sub>2</sub>)-C=C(q<sub>3</sub>)(q<sub>4</sub>); q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub> son, cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-12, alquilo C<sub>1</sub>-12 sustituido, alqueno, alcoxi C<sub>1</sub>-12 sustituido, OJ<sub>1</sub>, SJ<sub>1</sub>, SOJ<sub>1</sub>, SO<sub>2</sub>J<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ<sub>1</sub>, C(=O)-NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, C(=O)J<sub>1</sub>, -C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N(H)C(=NH)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> o N(H)C(=S)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>; cada J<sub>1</sub> y J<sub>2</sub> es, independientemente, H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o un grupo protector, y opcionalmente en el que, en el caso de que Q sea C(q<sub>1</sub>)(q<sub>2</sub>)(q<sub>3</sub>)(q<sub>4</sub>) y uno de q<sub>3</sub> o q<sub>4</sub> sea CH<sub>3</sub>, por lo menos uno del otro de q<sub>3</sub> o q<sub>4</sub> o uno de q<sub>1</sub> y q<sub>2</sub> es diferente de H. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2\*</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5\*</sup> y R<sup>5\*</sup> son hidrógeno. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos se dan a conocer en el documento n° WO 2008/154401. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2\*</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5\*</sup> y R<sup>5\*</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C<sub>1-6</sub> o aminoalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2\*</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5\*</sup> y R<sup>5\*</sup> son hidrógeno. En algunas realizaciones, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2\*</sup> y R<sup>3\*</sup> son hidrógeno y uno de R<sup>5\*</sup> y R<sup>5\*</sup> o ambos puede ser diferente de hidrógeno, tal como se ha indicado anteriormente, y en el documentos n° WO 2007/134181 o n° WO 2009/067647 (análogos de ácidos nucleicos alfa-L-bicíclicos).

En algunas realizaciones, el ANB utilizado en los compuestos oligonucleótidos de la invención preferentemente presenta la estructura de fórmula general II:



en la que Y se selecciona de entre el grupo que consiste de -O-, -CH<sub>2</sub>O-, -S-, -NH-, N(R<sup>e</sup>) y/o -CH<sub>2</sub>-; Z y Z\* se seleccionan independientemente de entre un enlace internucleotídico, R<sup>H</sup>, un grupo terminal o un grupo protector, B constituye una fracción base nucleotídica natural o no natural (nucleobase) y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>; R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> y R<sup>e</sup> se seleccionan, de manera opcionalmente independiente, de entre el grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-12 sustituido opcionalmente, alqueno C<sub>2</sub>-12 sustituido opcionalmente, alquino C<sub>2</sub>-12 sustituido opcionalmente, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-12, alcoxi alquilo C<sub>2</sub>-12, alqueno alquilo C<sub>2</sub>-12, carboxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-12-carbonil-alquilcarbonilo, formilo, arilo, arilo alquilo-carbonilo, arilo alquilo, arilo carbonilo, heteroarilo, heteroarilo alquilo-carbonilo, heteroarilo alquilo, heteroarilo carbonilo, amino, mono- y di(alquilo C<sub>1-6</sub>) amino, carbamoilo, mono- y di(alquilo C<sub>1-6</sub>) amino-carbonilo, amino-alquilo C<sub>1-6</sub>-aminocarbonilo, mono- y di(alquilo C<sub>1-6</sub>) amino-alquilo C<sub>1-6</sub>-aminocarbonilo, alquilo C<sub>1-6</sub>-carbonilamino, carbamido, alcanoilo alquilo C<sub>1-6</sub>, sulfono, alquilo C<sub>1-6</sub>-sulfonilo, nitro, azido, sulfanilo, alquilo, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores y ligandos, en los que arilo y heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente y en el que dos sustituyentes germinales R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> conjuntamente pueden referirse a metileno (=CH<sub>2</sub>) sustituido opcionalmente y R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>. En algunas realizaciones, R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> y R<sup>e</sup> se seleccionan opcionalmente de manera independiente de entre el grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>, tal como metilo. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S, por ejemplos dos isómeros estereoquímicos ejemplares incluyen las isoformas beta-D y alfa-L, que pueden ilustrarse de la manera siguiente:



A continuación se muestran unidades de ANB ejemplares específicas:



$\beta$ -D-oxi-ANB

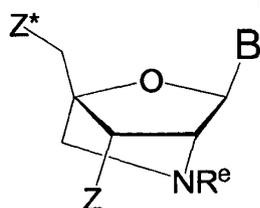
$\alpha$ -L-oxi-ANB

5



$\beta$ -D-tio-ANB

$\beta$ -D-ENA



$\beta$ -D-amino-ANB

10 El término "tio-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general indicada anteriormente se selecciona de entre S o  $-\text{CH}_2\text{-S}$ . El tio-ANB puede encontrarse en configuración tanto beta-D como alfa-L.

15 El término "amino-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anteriormente indicada se selecciona de entre  $-\text{N}(\text{H})-$ ,  $\text{N}(\text{R})-$ ,  $\text{CH}_2\text{-N}(\text{H})-$  y  $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{R})-$ , en el que R se selecciona de entre hidrógeno y alquilo  $\text{C}_{1-4}$ . El amino-ANB puede encontrarse en configuración tanto beta-D como alfa-L.

20 El término "oxi-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general indicada anteriormente representa  $-\text{O}$ . El oxi-ANB puede encontrarse en configuración tanto beta-D como alfa-L.

25 El término "ENA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anteriormente indicada es  $-\text{CH}_2\text{-O}$  (en el que el átomo de oxígeno de  $-\text{CH}_2\text{-O}$  se encuentra unido a la posición 2' respecto a la base B).  $\text{R}^e$  es hidrógeno o metilo.

En algunas realizaciones ejemplares, ANB se selecciona de entre beta-D-oxi-ANB, alfa-L-oxi-ANB, beta-D-amino-ANB y beta-D-tio-ANB, en particular beta-D-oxi-ANB.

Reclutamiento de ARNasa

30 Se reconoce que un compuesto oligomérico puede funcionar mediante la degradación no mediada por ARNasa del ARNm diana, tal como mediante impedimento estérico de la traducción u otros métodos; sin embargo, los oligómeros preferentes de la invención son capaces de reclutar una endorribonucleasa (ARNasa), tal como la ARNasa H.

5 Resulta preferible que el oligómero, o secuencia contigua de nucleótidos, comprenda una región de por lo menos 6, tal como por lo menos 7, unidades nucleótidas consecutivas, tal como por lo menos 8 o por lo menos 9 unidades (residuos) nucleótidas consecutivas, incluyendo 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos consecutivos, que, al formar un dúplex con el ARN diana complementario, es capaz de reclutar ARNasa. La secuencia contigua que es capaz de reclutar ARNasa puede ser la región B tal como se denomina en el contexto de un gápmero tal como se indica en la presente memoria. En algunas realizaciones, el tamaño de la secuencia contigua que es capaz de reclutar ARNasa, tal como región B, puede ser más elevado, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 unidades nucleótidas.

10 La patente EP nº 1 222 309 proporciona métodos in vitro para determinar la actividad de ARNasa H, que puede utilizarse para determinar la capacidad de reclutar ARNasa H. Se considera que un oligómero es capaz de reclutar ARNasa H en el caso de que, al proporcionarle el ARN diana complementario, presente una tasa inicial, medida en pmoles/l/min, de por lo menos 1%, tal como de por lo menos 5%, tal como de por lo menos 10% o inferior a 20% del oligonucleótido equivalente de sólo ADN, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, utilizando la metodología proporcionada en los Ejemplos 91 a 95 de la patente EP nº 1 222 309.

15 En algunas realizaciones, se considera que un oligómero es esencialmente incapaz de reclutar ARNasa H en el caso de que, al proporcionarle el ARN diana complementario y ARNasa H, la tasa inicial de la ARNasa H, medida en pmoles/l/min, es inferior a 1%, tal como inferior a 5%, tal como inferior a 10% o inferior a 20% de la tasa inicial determinada utilizando el oligonucleótido equivalente de sólo ADN, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, utilizando la metodología proporcionada en los Ejemplos 91 a 95 de la patente EP nº 1 222 309.

20 En otras realizaciones, se considera que un oligómero es capaz de reclutar ARNasa H en el caso de que, al proporcionarle el ARN diana complementario y ARNasa H, la tasa inicial de la ARNasa H, medida en pmoles/l/min, sea de por lo menos 20%, tal como de por lo menos 40 %, tal como de por lo menos 60%, tal como de por lo menos 80% de la tasa inicial determinada utilizando el oligonucleótido equivalente de sólo ADN, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, utilizando la metodología proporcionada en los Ejemplos 91 a 95 de la patente EP nº 1 222 309.

25 Típicamente la región del oligómero que forma las unidades de nucleótidos consecutivos que, al encontrarse formando un dúplex con el ARN diana complementario es capaz de reclutar ARNasa, consiste de unidades nucleótidas que forman un dúplex de tipo ADN/ARN con el ARN diana, e incluye tanto unidades de ADN como unidades de ANB que se encuentran en la configuración alfa-L, siendo particularmente preferente alfa-L-oxi-ANB.

30 El oligómero de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que comprende tanto nucleótidos como análogos de nucleótido, y puede encontrarse en forma de un gápmero, un oligómero de cabeza ("headmer") o un oligómero mixto ("mixmer").

35 Un oligómero de cabeza se define por un tramo contiguo de análogos de nucleótido no reclutadores de ARNasa en el extremo 5' seguido de un tramo contiguo de ADN o unidades nucleótidas modificadas reconocibles y cortables por la ARNasa hacia el extremo 3' (tal como por lo menos 7 de dichos nucleótidos) y un oligómero de cola definido por un tramo contiguo de ADN o nucleótidos modificados reconocibles y cortables por la ARNasa en el extremo 5' (tal como por lo menos 7 de dichos nucleótidos), seguido de un tramo contiguo de análogos de nucleótido no reclutadores de ARNasa hacia el extremo 3'. Otras quimeras según la invención denominadas oligómeros mixtos que consisten de una composición alternada de ADN o nucleótidos modificados reconocibles y cortables por la ARNasa y análogos de nucleótido no reclutadores de ARNasa. Algunos análogos de nucleótido también puede ser capaces de mediar en la unión y corte de la ARNasa H. Debido a que la  $\alpha$ -L-ANB recluta actividad de ARNasa H en cierta medida, podrían resultar necesarios huecos más pequeños de ADN o nucleótidos modificados reconocibles y cortables por la ARNasa para el constructo de gápmero, y puede introducirse más flexibilidad en la construcción del oligómero mixto.

40 55 Diseño de gápmero

Preferentemente el oligómero de la invención es un gápmero. Un oligómero de gápmero es un oligómero que comprende un tramo contiguo de nucleótidos que es capaz de reclutar una ARNasa, tal como ARNasa H, tal como una región de por lo menos 6 o 7 nucleótidos de ADN, denominada en la presente memoria región B, en la que la región B se encuentra flanqueada tanto en 5' como en 3' por regiones de análogos de nucleótido potenciadores de la afinidad, tal como entre 1 y 6 análogos de nucleótido en posición 5' y 3' respecto al tramo contiguo de nucleótidos que es capaz de reclutar ARNasa. Estas regiones se denominan regiones A y C, respectivamente.

- 5 En algunas realizaciones, los nucleótidos que son capaces de reclutar ARNasa se seleccionan de entre el grupo que consiste de nucleótidos de ADN, nucleótidos de alfa-L-ANB y ADN alquilado en C4' (ver el documento nº WO 2009/090182) y los nucleótidos de los ácidos nucleicos desbloqueados (AND) (ver Fluiter et al., Mol. Biosyst. 10:1039, 2009). En algunas realizaciones, la región B consiste de una longitud contigua de por lo menos 6 o 7 nucleótidos de ADN, o nucleótidos seleccionados de entre el grupo que consiste de ADN y alfa-L-ANB.
- 10 Preferentemente el gápmo comprende una secuencia (poli)nucleótida de fórmula (5' a 3'), A-B-C, u opcionalmente A-B-C-D o D-A-B-C, en la que: la región A (región 5') consiste o comprende por lo menos un análogo de nucleótido, tal como por lo menos una unidad de ANB, tal como entre 1 y 6 análogos de nucleótido, tal como unidades de ANB, y la región B consiste o comprende por lo menos cinco nucleótidos consecutivos que son capaces de reclutar ARNasa (formada en un dúplex con una molécula de ARN complementaria, tal como el ARNm diana), tal como nucleótidos de ADN, y la región C (región 3') consiste o comprende por lo menos un análogo de nucleótido, tal como por lo menos una unidad de ANB, tal como entre 1 y 6 análogos de nucleótido, tal como unidades de ANB, y la región D, en caso de encontrarse presente, consiste o comprende 1, 2 o 3 unidades nucleótidas, tal como nucleótidos de ADN.
- 15 En algunas realizaciones, la región A consiste 1, 2, 3, 4, 5 o 6 análogos de nucleótido, tal como unidades de ANB, tal como entre 2 y 5 análogos de nucleótido, tal como 2 a 5 unidades de ANB, tal como 3 o 4 análogos de nucleótido, tal como 3 o 4 unidades de ANB, y/o la región C consiste de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 análogos de nucleótido, tal como unidades de ANB, tal como entre 2 y 5 análogos de nucleótido, tal como 2 a 5 unidades de ANB, tal como 3 o 4 análogos de nucleótido, tal como 3 o 4 unidades de ANB.
- 20 En algunas realizaciones, B consiste o comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos consecutivos que son capaces de reclutar ARNasa, o entre 6 y 10, o entre 7 y 9, tal como 8 nucleótidos consecutivos que son capaces de reclutar ARNasa. En algunas realizaciones, la región B consiste o comprende por lo menos una unidad nucleótida de ADN, tal como 1 a 12 unidades de ADN, preferentemente entre 4 y 12 unidades de ADN, más preferentemente entre 6 y 10 unidades de ADN, tal como entre 7 y 10 unidades de ADN, todavía más preferentemente 8, 9 o 10 unidades de ADN.
- 25 En algunas realizaciones, la región A consiste de 3 o 4 análogos de nucleótido, tal como ANB; la región B consiste de 7, 8, 9 o 10 unidades de ADN, y la región C consiste de 3 o 4 análogos de nucleótido, tal como ANB. Entre dichos diseños se incluyen (A-B-C) 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3, y puede incluir además la región D, que puede presentar una o 2 unidades nucleótidas, tal como unidades de ADN.
- 30 Se dan a conocer diseños de gápmo adicionales en el documento nº WO 2004/046160.
- 35 El documento nº WO 2008/113830 se refiere a oligómeros gápmo 'shortmero' (oligómeros cortos) que, en algunas realizaciones, puede ser el oligómero gápmo según la presente invención.
- 40 En algunas realizaciones el oligómero consiste de una secuencia contigua de nucleótidos de un total de 10, 11, 12, 13 o 14 unidades nucleótidas, en la que la secuencia contigua de nucleótidos es de fórmula (5'-3') A-B-C, u opcionalmente A-B-C-D o D-A-B-C, en la que A consiste de 1, 2 o 3 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de ANB; B consiste de 7, 8 o 9 unidades de nucleótido contiguo que son capaces de reclutar la ARNasa al formar un dúplex con una molécula de ARN complementario (tal como un ARNm diana), y C consiste de 1, 2 o 3 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de ANB. En caso de hallarse presente, D consiste de una única unidad de ADN.
- 45 En algunas realizaciones A consiste de 1 unidad de ANB. En algunas realizaciones A consiste de 2 unidades de ANB. En algunas realizaciones A consiste de 3 unidades de ANB. En algunas realizaciones C consiste de 1 unidad de ANB. En algunas realizaciones C consiste de 2 unidades de ANB. En algunas realizaciones C consiste de 3 unidades de ANB. En algunas realizaciones B consiste de 7 unidades nucleótidas. En algunas realizaciones B consiste de 8 unidades nucleótidas. En algunas realizaciones B consiste de 9 unidades nucleótidas. En algunas realizaciones B comprende entre 1 y 9 unidades de ADN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de ADN. En algunas realizaciones B consiste de unidades de ADN. En algunas realizaciones B comprende por lo menos una unidad de ANB que se encuentra en la configuración alfa-L, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades de ANB en la configuración alfa-L. En algunas realizaciones B comprende por lo menos una unidad de alfa-L-oxi-ANB o en la que todas las unidades de ANB en la configuración alfa-L son unidades de alfa-L-oxi-ANB. En algunas realizaciones el número de nucleótidos presente en A-B-C se selecciona de entre el grupo que consiste de (unidades de análogo de nucleótido-región B-unidades de análogo de nucleótido): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, o 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4 o 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1.
- 50 En algunas realizaciones el número de nucleótidos en A-B-C se selecciona de entre el grupo que consiste de: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 y 4-7-3. En algunas realizaciones tanto A como C consisten de dos unidades ANB cada uno, y B consiste de 8 o 9 unidades nucleótidas, preferentemente unidades de ADN.
- 60

## Enlaces internucleótidas

5 Las expresiones "grupo de enlace" o "enlace internucleotídico" pretenden referirse a un grupo capaz de acoplar covalentemente entre sí dos nucleótidos, dos análogos de nucleótido, y un nucleótido y un análogo de nucleótido, etc. Entre los ejemplos específicos y preferentes se incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato.

10 Los nucleótidos del oligómero de la invención o secuencia contigua de nucleótidos del mismo se acoplan entre sí mediante grupos de enlace. Convenientemente cada nucleótido se une al nucleótido 3' contiguo mediante un grupo de enlace.

15 Entre los enlaces internucleotídicos adecuados se incluyen los listados en el documento nº WO 2007/301091, por ejemplo los enlaces internucleotídicos listados en el primer párrafo de la página 34 del documento nº WO 2007/031091.

20 En algunas realizaciones resulta preferente modificar el enlace internucleotídico de su forma fosfodiéster normal a una que sea más resistente al ataque de las nucleasas, tal como el fosforotioato o el boranofosfato, siendo estos dos cortables por ARNasa H, y permitiendo también la ruta de inhibición con antisentido para la reducción de la expresión del gen diana.

25 Pueden resultar preferentes enlaces internucleotídicos que contienen azufre (S) adecuados tal como se proporcionan en la presente memoria. Los enlaces internucleotídicos fosforotioato también resultan preferentes, particularmente para la región de hueco (B) de los gápmers. Los enlaces fosforotioato también pueden utilizarse para las regiones flanqueantes (A y C, y para unir A o C a D, y dentro de la región D, según resulte apropiado).

30 Las regiones A, B y C puede comprender, sin embargo, enlaces internucleotídicos diferentes de fosforotioato, tal como enlaces fosfodiéster, particularmente, por ejemplo, en el caso de que la utilización de análogos de nucleótido proteja los enlaces internucleotídicos dentro de las regiones A y C frente a la degradación por endonucleasas, tal como en el caso de que las regiones A y C comprendan nucleótidos de ANB.

35 Los enlaces internucleotídicos en el oligómero pueden ser fosfodiéster, fosforotioato o boronafosfato, de manera que permitan el corte con ARNasa H del ARN diana. Resulta preferente el fosforotioato, para una resistencia mejorada a las nucleasas y por otros motivos, tales como la facilidad de preparación.

40 En un aspecto del oligómero de la invención, los nucleótidos y/o análogos de nucleótido se unen entre sí mediante grupos fosforotioato.

45 Se reconoce que la inclusión de enlaces fosfodiéster, tal como uno o dos enlaces, en un oligómero de otra manera fosforotioato, particularmente entre unidades de análogo de nucleótido o contiguamente a las mismas (típicamente en la región A y/o C) puede modificar la biodisponibilidad y/o biodistribución de un oligómero; ver el documento nº WO 2008/053314.

50 En algunas realizaciones, tal como las realizaciones indicadas anteriormente, en donde resulte adecuado y no se indique específicamente, todos los grupos de enlace restantes son fosfodiéster o fosforotioato, o una mezcla de los mismos.

55 En algunas realizaciones todos los grupos de enlace internucleotídico son fosforotioato. En referencia a secuencias específicas de oligonucleótido gápmero, tal como las proporcionadas en la presente memoria, se entenderá que, en diversas realizaciones, en el caso de que los enlaces sean enlaces fosforotioato, pueden utilizarse enlaces alternativos, tales como los dados a conocer en la presente memoria, por ejemplo enlaces fosfato (fosfodiéster), particularmente para enlaces entre análogos de nucleótidos, tal como unidades de ANB. De manera similar, en referencia a secuencias específicas de oligonucleótido gápmero, tales como las proporcionadas en la presente memoria, en el caso de que los residuos de C se anoten como citosina modificada con 5'-metilo, en diversas realizaciones, una o más de las C presentes en el oligómero pueden ser residuos de C no modificados.

## Compuestos oligoméricos

60 Los oligómeros indicados en la solicitud se identifican como SEC ID nº 26-50. Un oligómero preferente de la invención es la SEC ID nº 29.

## Conjugados

En el contexto, el término "conjugado" pretende indicar una molécula heterogénea formada mediante unión

covalente ("conjugación") del oligómero tal como se indica en la presente memoria a uno o más fracciones no nucleótidas o no polinucleótidas. Entre los ejemplos de fracciones no nucleótidas o no polinucleótidas se incluyen agentes macromoleculares tales como proteínas, cadenas de ácido graso, residuos sacáridos, glucoproteínas, polímeros o combinaciones de los mismos. Típicamente las proteínas pueden ser anticuerpos para una proteína diana. Los polímeros típicos pueden ser polietilenglicol.

Por lo tanto, en diversas realizaciones, el oligómero de la invención puede comprender tanto una región polinucleótida que típicamente consiste de una secuencia contigua de nucleótidos y una región adicional no nucleótida. En referencia al oligómero de la invención que consiste de una secuencia contigua de nucleótidos, el compuesto puede comprender componentes no nucleótidos, tal como un componente conjugado.

En diversas realizaciones de la invención, el compuesto oligomérico se une a ligandos/conjugados, que pueden utilizarse, por ejemplo, para incrementar la incorporación celular de compuestos oligoméricos. El documento nº WO 2007/031091 proporciona ligandos y conjugados adecuados.

La invención proporciona además un conjugado que comprende el compuesto según la invención tal como se indica en la presente memoria y por lo menos una fracción no nucleótida o no polinucleótida unida covalentemente a dicho compuesto. Por lo tanto, en diversas realizaciones en las que el compuesto de la invención consiste de una secuencia especificada de ácidos nucleicos o nucleótidos, tal como se da a conocer en la presente memoria, el compuesto puede comprender además por lo menos una fracción no nucleótida o no polinucleótida (por ejemplo que no comprende uno o más nucleótidos o análogos de nucleótido) unidos covalentemente a dicho compuesto.

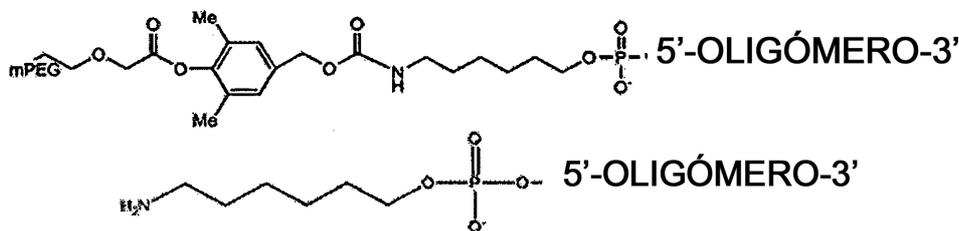
La conjugación (con una fracción conjugada) puede potenciar la actividad, distribución celular o incorporación celular del oligómero de la invención. Entre dichas fracciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, anticuerpos, polipéptidos, fracciones lipídicas tales como una fracción colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo hexil-S-tritilitol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo residuos dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-o-hexadecil-rac-glicero-3-h-fosfonato trietilamónico, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, un ácido acético adamantano, una fracción palmitilo, una octadecilamina o una fracción hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Los oligómeros de la invención pueden conjugarse además con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

En determinadas realizaciones, la fracción conjugada es un esteroil, tal como colesterol.

En diversas realizaciones, la fracción conjugada comprende o consiste de un polímero cargado positivamente, tal como un péptido cargado positivamente de, por ejemplo, entre 1 y 50, tal como entre 2 y 20, tal como entre 3 y 10 residuos aminoácidos de longitud, y/o óxido de polialquileno, tal como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol; ver el documento nº WO 2008/034123. Convenientemente, el polímero cargado positivamente, tal como un óxido de polialquileno puede unirse al oligómero de la invención mediante un conector, tal como un conector liberable indicado en el documento nº WO 2008/034123.

A título de ejemplo, pueden utilizarse las fracciones conjugadas siguientes en los conjugados de la invención:



Oligómeros activados

La expresión "oligómero activado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un oligómero de la invención que se encuentra unido covalentemente (es decir, funcionalizado) con por lo menos una fracción funcional que permite el enlace covalente del oligómero con una o más fracciones conjugadas, es decir, fracciones que no son ellas mismas ácidos nucleicos o monómeros, formando los conjugados indicados en la presente memoria. Típicamente una fracción funcional comprenderá un grupo químico que es capaz de unirse covalentemente al oligómero mediante, por ejemplo, un grupo 3'-hidroxilo o el grupo NH<sub>2</sub> exocíclico de la base adenina, un espaciador que preferentemente es hidrofílico, y un grupo terminal que es capaz de unión a una fracción conjugada (por ejemplo

un grupo amino, sulfhidrido o hidroxilo). En algunas realizaciones, dicho grupo terminal no se encuentra protegido, por ejemplo es un grupo NH<sub>2</sub>. En otras realizaciones, el grupo terminal se encuentra protegido, por ejemplo mediante cualquier grupo protector adecuado, tal como los indicados en "Protective Groups in Organic Synthesis", de Theodora W Greene y Peter G M Wuts, 3a edición (John Wiley & Sons, 1999). Entre los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo adecuados se incluyen ésteres tales como el éster de acetato, grupos aralquilo tales como bencilo, difenilmetilo o trifenilmetilo, y tetrahidropiraniolo. Entre los ejemplos de grupos protectores de amino adecuados se incluyen bencilo, alfa-metil-bencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, benciloxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo y grupos acilo tales como tricloroacetilo o trifluoroacetilo. En algunas realizaciones, la fracción funcional es autocortable. En otras realizaciones, la fracción funcional es biodegradable. Ver, por ejemplo, la patente US nº 7.087.229.

En algunas realizaciones, los oligómeros de la invención se funcionalizan en el extremo 5' con el fin de permitir la unión covalente de la fracción conjugada con el extremo 5' del oligómero. En otras realizaciones, los oligómeros de la invención pueden funcionalizarse en el extremo 3'. En todavía otras realizaciones, los oligómeros de la invención pueden funcionalizarse a lo largo del esqueleto o en la fracción de base heterocíclica. En todavía otras realizaciones, los oligómeros de la invención pueden funcionalizarse en más de una posición seleccionada independientemente de entre el extremo 5', el extremo 3', el esqueleto y la base.

En algunas realizaciones, se sintetizan oligómeros activados de la invención mediante la incorporación durante la síntesis de uno o más monómeros que se unen covalentemente a una fracción funcional. En otras realizaciones, se sintetizan oligómeros activados de la invención con monómeros que no han sido funcionalizados, y el oligómero se funcionaliza tras completar la síntesis. En algunas realizaciones, los oligómeros se funcionalizan con un éster impedido que contiene un conector aminoalquilo, en el que la parte alquilo presenta la fórmula (CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>, en la que w es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente aproximadamente 6, en el que la parte alquilo del grupo alquilamino puede ser de cadena lineal o ramificada, y en el que el grupo funcional se une al oligómero mediante un grupo éster (-O-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>NH).

En otras realizaciones, los oligómeros se funcionalizan con un éster impedido que contiene un conector (CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-sulfhidrido (SH), en el que w es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente aproximadamente 6, en el que la parte alquilo del grupo alquilamino puede ser de cadena lineal o ramificada, y en el que el grupo funcional se une al oligómero mediante un grupo éster (-O-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>NH).

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos activados por sulfhidrido se conjugan con fracciones polímero, tales como polietilenglicol o péptidos (mediante la formación de un enlace disulfuro).

Los oligómeros activados que contiene ésteres impedidos tal como se ha indicado anteriormente pueden sintetizarse mediante cualquier método conocido de la técnica, y en particular mediante métodos dados a conocer en la publicación de patente PCT nº WO 2008/034122 y ejemplos en la misma.

En todavía otras realizaciones, los oligómeros de la invención se funcionalizan mediante la introducción de grupos sulfhidrido, amino o hidroxilo en el oligómero mediante un reactivo funcionalizador sustancialmente tal como se indica en las patentes US nº 4.962.029 y nº 4.914.210, es decir, un reactivo sustancialmente lineal que presenta una fosforamidita en un extremo unido mediante una cadena espaciadora hidrofílica en el extremo opuesto que comprende un grupo sulfhidrido, amino o hidroxilo protegido o no protegido. Dichos reactivos reaccionan principalmente con grupos hidroxilo del oligómero. En algunas realizaciones, dichos oligómeros activados presentan un reactivo funcionalizado acoplado con un grupo 5'-hidroxilo del oligómero. En otras realizaciones, los oligómeros activados presentan un reactivo funcionalizado acoplado con un grupo 3'-hidroxilo. En todavía otras realizaciones, los oligómeros activados de la invención presentan un reactivo funcionalizador acoplado con un grupo hidroxilo en el esqueleto del oligómero. En realizaciones todavía adicionales, el oligómero de la invención se funcionaliza con más de uno de los reactivos funcionalizadores tal como se indica en las patentes US nº 4.962.029 y nº 4.914.210. Los métodos de síntesis de dichos reactivos funcionalizadores y de incorporación de los mismos en monómeros u oligómeros se dan a conocer en las patentes US nº 4.962.029 y nº 4.914.210.

En algunas realizaciones, el extremo 5'-terminal de un oligómero unido a fase sólida se funcionaliza con un derivado dienil-fosforamidita, seguido de la conjugación del oligómero desprotegido con, por ejemplo, un aminoácido o péptido mediante una reacción de cicloadición de Diels-Alder.

En diversas realizaciones, la incorporación de monómeros que contienen modificaciones sacáridas en 2', tal como un azúcar sustituido por 2'-carbamato o un azúcar 2'-(O-pentil-N-ftalimido)-desoxirribosa en el oligómero facilita la unión covalente de fracciones conjugadas con los azúcares del oligómero. En otras realizaciones, un oligómero con un conector que contiene amino en la posición 2' de uno o más monómeros se prepara utilizando un reactivo tal como, por ejemplo, 5'-dimetoxitritil-2'-O-(e-ftalimidilaminopentil)-2'-desoxiadenosina-3'-N,N-diisopropil-cianoetoxi-fosforamidita. Ver, por ejemplo, Manoharan et al., Tetrahedron Letters 34:7171, 1991.

5 En realizaciones todavía adicionales, los oligómeros de la invención pueden presentar fracciones funcionales que contienen amino en la nucleobase, incluyendo en los grupos amino de la purina en N6, en el N2 exocíclico de la guanina o en las posiciones N4 o 5 de la citosina. En diversas realizaciones, dicha funcionalización puede llevarse a cabo mediante la utilización de un reactivo comercial que ya se encuentra funcionalizado en la síntesis del oligómero.

10 Algunas fracciones funcionales se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo se encuentran disponibles fracciones de unión heterobifuncionales u homobifuncionales de Pierce Co. (Rockford, IL.). Otros grupos de unión disponibles comercialmente son los reactivos modificador 5'-amino C6 y modificador 3'-amino, ambos disponibles de Glen Research Corporation (Sterling, Va.). El modificador 5'-amino en C6 también se encuentra disponible de ABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) como Aminolink-2, y el modificador 3'-amino también se encuentra disponible de Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, Calif.).

#### 15 Composiciones

20 El oligómero de la invención puede utilizarse en formulaciones y composiciones farmacéuticas. Convenientemente, dichas composiciones comprenden un diluyente, portador, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable. El documento n° WO 2007/031091 proporciona diluyentes, portadores y adyuvantes adecuados y preferentes farmacéuticamente aceptables. En el documento n° WO 2007/031091 también se proporcionan dosis, formulaciones, vías de administración, composiciones, formas de dosificación, combinaciones con otros agentes terapéuticos y formulaciones de profármaco adecuados.

#### 25 Aplicaciones

Los oligómeros de la invención pueden utilizarse como reactivos de investigación para, por ejemplo, diagnóstico, terapéutica y profilaxis.

30 En la investigación, dichos oligómeros pueden utilizarse para inhibir específicamente la síntesis de la proteína APO-B100 (típicamente mediante la degradación o la inhibición del ARNm, evitando de esta manera la formación de proteína) en células y animales experimentales, facilitando de esta manera el análisis funcional de la diana o una evaluación de su utilidad como diana para la intervención terapéutica.

35 En el diagnóstico los oligómeros pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión de APO-B100 en células y tejidos mediante transferencia northern, hibridación in situ o técnicas similares.

40 Para la terapéutica, un animal o un ser humano, que se sospecha que presenta una enfermedad o trastorno, que puede tratarse mediante la modulación de la expresión de APO-B100, se trata mediante la administración de compuestos oligoméricos de acuerdo con la presente invención. Se proporcionan además métodos de tratamiento de un mamífero, tal como el tratamiento de un ser humano, que se sospecha que presenta o es propenso a presentar una enfermedad o condición, asociado a la expresión de APO-B100 mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los oligómeros o composiciones de la invención. El oligómero, un conjugado o una composición farmacéutica según la invención se administra típicamente en una cantidad eficaz.

45 La invención proporciona además la utilización del compuesto o conjugado de la invención tal como se ha indicado, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria, o para un método de tratamiento del trastorno tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria.

50 Se describe además un método para el tratamiento de un trastorno tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria, comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según la invención tal como se indica en la presente memoria, y/o un conjugado según la invención, y/o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que requiere del mismo.

#### 55 Indicaciones médicas

60 Los oligómeros y otras composiciones según la invención pueden utilizarse para el tratamiento de condiciones asociadas a la sobreexpresión o expresión de una versión mutada de la APO-B100.

La invención proporciona además la utilización de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria.

5 De manera general, un aspecto de la exposición se refiere a un método de tratamiento de un mamífero que sufre o es susceptible de sufrir condiciones asociadas a niveles anormales de APO-B100, que comprende administrar en el mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero con diana en APO-B100 que comprende una o más unidades de ANB. El oligómero, un conjugado o una composición farmacéutica según la invención se administra típicamente en una cantidad eficaz.

10 La enfermedad o trastorno, tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria, puede estar asociado, en algunas realizaciones, a una mutación del gen APO-B100 o de un gen cuyo producto proteína está asociado o interactúa con APO-B100. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el ARNm diana es una forma mutada de la secuencia de APO-B100.

15 Un aspecto interesante de la invención se refiere a la utilización de un oligómero (compuesto) tal como se define en la presente memoria o a un conjugado tal como se define en la presente memoria, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria.

20 Los métodos dados a conocer preferentemente se utilizan para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades causadas por los niveles anormales de APO-B100.

En otras palabras, se da a conocer además un método para el tratamiento de los niveles anormales de APO-B100, comprendiendo dicho método la administración de un oligómero de la invención, o un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención en un paciente que lo necesita.

25 La invención se refiere además a un oligómero, una composición o un conjugado tal como se define en la presente memoria para la utilización como medicamento.

30 La invención se refiere además a la utilización de un compuesto, composición o conjugado tal como se define en la presente memoria para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los niveles anormales de APO-B100 o a la expresión de formas mutantes de APO-B100 (tales como variantes alélicas, tales como las asociadas a una de las enfermedades a las que se hace referencia en la presente memoria).

35 Además, se da a conocer un método de tratamiento de un sujeto que sufre una enfermedad o condición tal como las indicadas en la presente memoria.

Un paciente que requiere el tratamiento es un paciente que sufre o es probable que sufra la enfermedad o trastorno.

40 En algunos aspectos, el término "tratamiento" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere tanto al tratamiento de una enfermedad existente (por ejemplo una enfermedad o trastorno tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria) o a la prevención de una enfermedad, es decir la profilaxis. Por lo tanto, se reconoce que el tratamiento tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria puede, en algunos aspectos, ser profiláctico.

#### 45 REALIZACIONES

En una realización, uno o más de los análogos de nucleótido oxi-ANB en el compuesto de SEC ID nº 29 son sustituidos por un ANB diferente de oxi-ANB.

50 En una realización adicional, el ANB se selecciona de entre ácido nucleico bicíclico 2'-O-metoxietilo, ácido nucleico bicíclico 2'-O-etilo, ENA, beta-D-amino-ANB y beta-D-tio-ANB.

#### EJEMPLOS

55 Ejemplo 1: síntesis de monómeros

Los bloques constructivos de monómero de ANB y derivados de los mismos se preparan utilizando métodos estándares, tales como los procedimientos publicados y referencias citadas en el documento nº WO 2007/031081.

60 Ejemplo 2: Síntesis de oligonucleótidos

Se sintetizaron oligonucleótidos mediante el método descrito en el Ejemplo 2 del documento nº WO 2007/031081.

Tabla 2 Compuestos oligonucleótidos de la invención

Sustancia de ensayo	Longitud	Sec. diana
SEC ID nº 1	14	5'-TCTGAAGTCCATGA-3'
SEC ID nº 2	14	5'-GGATCAAATATAAG-3'
SEC ID nº 3	14	5'-GTTGACACTGTCTG-3'
SEC ID nº 4	12	5'-GTTGACACTGTC-3'
SEC ID nº 5	14	5'-GACTGCCTGTTCTC-3'
SEC ID nº 6	13	5'-CGTTGGAGTAAGC-3'
SEC ID nº 7	14	5'-GCGTTGGAGTAAGC-3'
SEC ID nº 8	14	5'-CTCTGTGATCCAGG-3'
SEC ID nº 9	14	5'-GGACTCTGTGATCC-3'
SEC ID nº 10	14	5'-CTGTTTGAGGGACT-3'
SEC ID nº 11	14	5'-GAGATGGCAGATGG-3'
SEC ID nº 12	14	5'-GCTGGTGTGCCCAC-3'
SEC ID nº 13	13	5'-CAGATCCTTGACAC-3'
SEC ID nº 14	14	5'-CCAGATCCTTGACAC-3'
SEC ID nº 15	12	5'-ACCTTTTGAGAC-3'
SEC ID nº 16	14	5'-CAATGTTCCAGACTG-3'
SEC ID nº 17	14	5'-CCTGCAATGTTCCAG-3'
SEC ID nº 18	14	5'-TAGGGCTGTAGCTG-3'
SEC ID nº 19	14	5'-GTTGGTCTACTTCA-3'
SEC ID nº 20	14	5'-CCAACCAATTTCTC-3'
SEC ID nº 21	14	5'-GTCAATTGTAAAGG-3'
SEC ID nº 22	14	5'-GTTTAAGAAATCCA-3'
SEC ID nº 23	12	5'-CTTAGTGTAGC-3'
SEC ID nº 24	12	5'-GGTTCCTTAGTGT-3'
SEC ID nº 25	14	5'-CTGGTTCCTTAGTGT-3'
SEC ID nº 26		5'-T <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> gsasasgstscscsasT <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 27		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> tscsasasastsastsA <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 28		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> gsascasascstsgsts <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 29		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> tsgsascasascstsgsT <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 30		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> tsgscscstsgststs <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 31		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> tsgsgsasgstsasasG <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 32		5'-G <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> tstsgsgsasgstsasA <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 33		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> tsgtsgsastscscsA <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 34		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> cstscstsgstsgsasT <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 35		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> tststsgsasgsgsA <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 36		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> astsgsgscsasgsasT <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 37		5'-G <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> gsgstsgstsgscs <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 38		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> astscscststsgscsA <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 39		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> gsastscscststsgs <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 40		5'-A <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> cststststsgsasgsA <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 41		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> tsgststscsasgsas <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 42		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> gscsasastsgststs <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 43		5'-T <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> gsgscstsgstsasgs <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 44		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> gsgstscstscststst <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 45		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> ascscsasastststs <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 46		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> asaststsgstsasasA <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 47		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> tsasasgsasasasts <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 48		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> tsasgstsgststsasG <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 49		5'-G <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> tstscststsasgstststG <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 50		5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> gststscstststststst <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> G <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sup>o</sup> -3'
SEC ID nº 51		5'-G <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> aststsggstststststststst <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> A <sup>o</sup> -3'

En las SEC ID nº 26-51, las letras mayúsculas indican unidades de análogo de nucleótido (ANB), el superíndice "o" indica oxi-ANB, "m" indica metil-C-ANB y el superíndice "s" representa un enlace fosforotioato. La ausencia de "s" indica un enlace fosfodiéster.

5

Ejemplo 3: ensayos

- 5 La modulación con antisentido de la expresión de apoB-100 puede someterse a ensayo en una diversidad de modos conocidos de la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm de apoB-100 pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real. La PCR cuantitativa en tiempo real actualmente resulta preferente. El análisis del ARN puede llevarse a cabo en ARN celular total o en ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN y de análisis de ARN tales como el análisis de transferencia northern son rutinarios en la técnica y se enseñan en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.
- 10 La PCR cuantitativa en tiempo real puede llevarse a cabo convenientemente utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real iQ Multi-Color comercialmente disponible de BioRAD. La PCR cuantitativa en tiempo real es una técnica bien conocida y se enseña en, por ejemplo, Heid et al., Real time quantitative PCR, Genome Research 6: 986-994, 1996.
- 15 Ejemplo 4: modelo in vitro: cultivo celular
- El efecto de los compuestos antisentido sobre la expresión de los ácidos nucleicos diana puede someterse a ensayo en cualquiera de entre una diversidad de tipos celulares, con la condición de que el ácido nucleico diana se encuentre presente a niveles medibles. La diana puede expresarse endógenamente o mediante transfección transitoria o estable de un ácido nucleico codificante de dicho ácido nucleico.
- 20 El nivel de expresión de ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente utilizando, por ejemplo, ensayos de análisis de transferencia northern, PCR cuantitativa y de protección frente a ribonucleasas. Los tipos celulares siguientes se proporcionan con fines ilustrativos, aunque pueden utilizarse rutinariamente otros tipos celulares, con la condición de que la diana se expresa en el tipo celular seleccionado.
- 25 Se cultivaron células en el medio apropiado tal como se indica posteriormente y se mantuvieron a 37°C bajo una humedad de 95%-98% y con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se subcultivaron rutinariamente 2 a 3 veces a la semana.
- 30 BNCL-2: la línea celular de hígado de ratón BNCL-2 se obtuvo de la ATCC y se cultivó en DMEM (Sigma) con FBS al 10% + Glutamax I + aminoácidos no esenciales + gentamicina.
- 35 Hepa1-6: la línea celular de hígado de ratón Hepa1-6 se obtuvo de la ATCC y se cultivó en DMEM (Sigma) con FBS al 10% + Glutamax I + aminoácidos no esenciales + gentamicina.
- HepG2: la línea celular de hígado de ratón HepG2 se obtuvo de la ATCC y se cultivó en Eagle MEM (Sigma) con FBS al 10% + Glutamax I + aminoácidos no esenciales + gentamicina.
- 40 HuH-7: la línea celular de hígado de ratón HepG2 se obtuvo de la ATCC y se cultivó en Eagle MEM (Sigma) con FBS al 10% + Glutamax I + aminoácidos no esenciales + gentamicina.
- Ejemplo 5: modelo in vitro tratamiento con oligonucleótido antisentido
- 45 Cultivos celulares y transfecciones: se sembraron células Huh-7 y Hepa 1-6 en placas de 6 pocillos a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>) en medio de cultivo complementado con FBS al 10%, Glutamax I y gentamicina. Al llegar las células a una confluencia de 60-70%, se transfectaron por duplicado con diferentes concentraciones de oligonucleótidos (0,04 a 25 nM) utilizando lipofectamina 2000 (5 µg/ml y 10 µg/ml para Huh-7 y Hepa 1-6, respectivamente). Las transfecciones se llevaron a cabo esencialmente tal como describen Dean et al. (JBC 269:16416-16424, 1994). Brevemente, las células se preincubaron durante 7 min. con lipofectamina en OptiMEM seguido de la adición de oligonucleótido a un volumen total de 1,5 ml de mezcla de transfección en cada pocillo. Tras 4 horas, se sacó la mezcla de transfección, se lavaron las células y se cultivaron a 37°C durante aproximadamente 20 horas (análisis de ARNm y análisis de las proteínas) en el medio de cultivo apropiado. A continuación las células se recolectaron para el análisis de las proteínas y el ARN.
- 50
- 55 Ejemplo 6: modelo in vitro: extracción de ARN y síntesis del ADNc
- Aislamiento del ARN total
- 60 Se aisló el ARN total utilizando el minikit RNeasy (Qiagen). Las células se lavaron con PBS y tampón de lisis celular (RTL, Qiagen) complementado con mercaptoetanol al 1% añadido directamente a los pocillos. Tras unos cuantos minutos, se procesaron las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Síntesis de primera cadena

- 5 La síntesis de primera cadena se llevó a cabo utilizando el kit de transcriptasa inversa OmniScript o transcriptasa inversa de M-MLV (esencialmente tal como indica el fabricante (Ambion)) siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Al utilizar la transcriptasa inversa OmniScript, 0,5 µg de ARN total en cada muestra, se ajustó a 12 µl y se mezcló con 0,2 µl de poli(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl) (Life Technologies), 2 ml de mezcla de dNTP (5 mM cada uno), 2 µl de 10x tampón RT, 0,5 µl de inhibidor de ARNasa RNAGuard™ (33 unidades/ml, Amersham) y 1 µl de transcriptasa inversa OmniScript, seguido de la incubación a 37°C durante 60 min. y la inactivación por calor a 93°C durante 5 min.
- 10 Tras llevar a cabo la síntesis de primera cadena utilizando decámeros aleatorios y transcriptasa inversa de M-MLV (esencialmente tal como indicaba el fabricante (Ambion)), se ajustaron 0,25 µg de ARN total de cada muestra a 10,8 µl en H<sub>2</sub>O. Se añadieron 2 µl de decámeros y 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno). Se calentaron muestras a 70°C durante 3 min. y se enfriaron inmediatamente en agua helada y se añadieron 3,25 ml de una mezcla que contenía 2 µl de 10x tampón RT, 1 µl de transcriptasa inversa de M-MLV, 0,25 µl de inhibidor de ARNasa. Se sintetizó el ADNc a 42°C durante 60 min. seguido de la etapa de inactivación por calor a 95°C durante 10 min. y finalmente se enfrió a 4°C.

Ejemplo 7: resultados del cribado de diferentes oligonucleótidos de ANB

- 20 Se determinó la expresión de ARNm de apoB mediante PCR cuantitativa en tiempo real en células Huh-7 tras el tratamiento con los compuestos de SEC ID nº 26-50. Los datos se normalizaron respecto a GAPDH y se normalizaron respecto al control simulado (figuras 1A y B).

Ejemplo 8: niveles de colesterol en suero

- 25 Se midió el nivel del colesterol total en plasma utilizando un ensayo colorimétrico Cholesterol CP de ABX Pentra. Se midió el colesterol tras la hidrólisis y oxidación enzimáticas. Se añadieron 21,5 µl de agua a 3 µl de suero. Se añadieron 250 µl de reactivo y dentro de los 15 min. posteriores se midió el contenido de colesterol a una longitud de onda de 540 nm. Las mediciones en cada animal se realizaron por duplicado. Se sometió a ensayo la sensibilidad y linealidad con una serie de dilución de un compuesto de control (control de ABX Pentra N). Se determinó el nivel de colesterol restando el fondo y se expresó respecto a los niveles de colesterol en suero de ratones tratados con solución salina.

Estudios in vivo

- 35 Los oligonucleótidos de ANB en los estudios presentados posteriormente se administraron en ratones C57BL/6J hembra en una dieta chow estándar.

Ejemplo 9: resultados del cribado de diferentes oligonucleótidos de ANB in vivo

- 40 En el presente estudio se administraron los oligonucleótidos de ANB en ratones por vía subcutánea una vez a la semana durante 4 semanas (total de 5 administraciones) a dos niveles de dosis diferentes (10 mg/kg de SEC ID nº 28, 29, 44 y 45). Se muestreó el suero una vez a la semana y en el momento del sacrificio (48 horas después de la última administración) con el fin de examinar el efecto de los compuestos sobre el colesterol total.

- 45 La administración de cualquiera de los 4 oligonucleótidos de ANB resultó en una reducción significativa del colesterol total en la primera semana de administración. Tras 2 semanas se alcanzó un estado estable del colesterol total al medir una semana después de la administración (reducción de 40% a 65% del colesterol total). Sin embargo, la medición del colesterol total 48 horas después de la administración mostró una reducción adicional del colesterol total, observado a 30 días del sacrificio, con una reducción de 60% a 80% del colesterol total, indicando un efecto máximo sobre el colesterol total 2 a 3 días después de la administración (figura 2).

Ejemplo 10: resultados de la administración repetida de diferentes oligonucleótidos de ANB in vivo

- 55 En el presente estudio se administraron en ratones oligonucleótidos de ANB por vía subcutánea una vez a la semana durante 4 semanas (total de 5 administraciones). SEC ID nº 45 se administró a 4 niveles de dosis diferentes (0,02, 0,4, 2 y 10 mg/kg/semana), mientras que SEC ID nº 29 y 51 se administraron a una dosis de 10 mg/kg/semana. Se muestreó el suero una vez a la semana y en el momento del sacrificio (48 horas después de la última administración) con el fin de examinar el efecto de los compuestos sobre el colesterol total.

- 60 La administración de cualquiera de los 3 oligonucleótidos de ANB a una dosis de 10 mg/kg/semana resultó en una reducción significativa del colesterol total en la primera semana de administración. Tras 2 y 4 semanas, en la medición una semana después de la administración, se alcanzó una reducción del colesterol total de 58% y 70%,

respectivamente, con los tres compuestos (figura 3A). El análisis de los niveles de ALT en suero mostró incrementos con niveles de dosis de 10 mg/kg/semana, aunque para las SEC ID nº 29 y nº 45 se encontraba dentro del intervalo normal, mientras que la SEC ID nº 51 resultó en un incremento de 5 veces del nivel sérico de ALT (figura 3B).

5 Ejemplo 11: duración de la acción de una única dosis de SEC ID nº 29

10 En los ratones se administró una dosis intravenosa de SEC ID nº 29 el día 0 a diferentes niveles de dosis (1, 2,5, 5 y 10 mg/kg) y se midió el colesterol sérico los días 0, 1, 3, 8, 16, 24 y 32. Ya un día después de la administración del oligonucleótido se consiguió un efecto significativo sobre el colesterol total a dosis de 5 y 10 mg/kg. Se midió el efecto máximo sobre el colesterol el día 3; se alcanzaron reducciones de 16%, 36%, 42% y 70% del colesterol sérico total con 1, 2,5, 5 y 10 mg/kg, respectivamente. Tras 24 días, los niveles de colesterol total todavía se encontraban significativamente reducidos en 13% y 19% en los grupos de nivel de dosis de 5 y 10 mg/kg.

15 El rápido efecto de reducción de apoB se demostró en el perfil de lipoproteínas. La proporción HDL/no HDL se incrementó muy rápidamente tras la administración del oligonucleótido. La proporción se incrementó de una manera dependiente de la dosis 140% a 170% a los niveles de dosis baja (1 y 2,5 mg/kg) y 325% a los niveles de dosis alta (5 y 10 mg/kg) ya 24 horas después de la administración (figura 4B).

20 Ejemplo 12: administración repetida semanal o quincenal de SEC ID nº 29

25 En los ratones se administró por vía subcutánea SEC ID nº 29 a niveles de dosis 1, 2,5 o 5 mg/kg semanal o quincenalmente durante 70 días. Tras el periodo de tratamiento se dejó que los ratones se recuperasen 7 o 21 días antes del sacrificio. Se muestreó el suero una vez a la semana durante las primeras 5 semanas, seguido del muestreo quincenal entre los días 35 y 63 y el muestreo semanal nuevamente entre los días 63 y 91. En los grupos con administración semanal, el día 14 (tras 2 dosis), el colesterol sérico total alcanzó niveles sostenidos de reducción de aproximadamente 30% a 40% con los niveles de dosis de 2,5 y 5 mg/kg, mientras que el nivel de dosis de 1 mg/kg presentó un efecto sostenido medio de sólo un 10% de reducción del colesterol total durante el periodo de tratamiento (figura 5A). La reducción de la frecuencia de administración a la administración quincenal consiguió una reducción sostenida del colesterol total más tarde, a partir del día 35, con 30% y 20% para los niveles de dosis de 2,5 y 5 mg/kg. El nivel de dosis de 1 mg/kg no proporcionó ninguna reducción del colesterol total (figura 5B).

35 Durante el periodo de recuperación, se redujo el efecto y en los grupos administrados quincenalmente, el colesterol había retornado a la línea base el día 91 para todos los niveles de dosis. En los grupos administrados semanalmente, los grupos de 2,5 y 5 mg/kg todavía presentaban una reducción de 13% a 17% del colesterol sérico total al final del periodo de recuperación.

40 Una y tres semanas después del final del tratamiento se sacrificaron los ratones y se muestrearon los hígados para el análisis de qPCR para determinar la expresión del ARNm de apoB hepático. La administración tanto semanal como quincenal resultó en una regulación negativa dependiente de la dosis de la expresión de ARNm de apoB (figura 6). La administración semanal de 5 mg/kg proporcionó el efecto más grande, con una reducción de 75% del ARNm de apoB, mientras que la administración quincenal proporcionó una reducción de 63%. Tras 3 semanas de recuperación, sólo los grupos de 2,5 y 5 mg/kg/semana y los 5 mg/kg/quincenales presentaron reducciones medibles de los niveles de apoB hepático en comparación con el control: 25%, 40% y 33%, respectivamente.

45 Los niveles séricos de ALT se midieron los días 77 y 91. No se observaron diferencias significativas de ALT en comparación con el control de suero salino ni el día 77 ni el día 91 (figura 7).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Santaris Pharma A/S  
 <120> Potentes compuestos antisentido anti-APOB  
 <130> 1087WO  
 <140> 61/186,388 <141> 2010-06-10  
 <150> 61/186,388 <151> 2009-06-12
- <160> 51
- <170> PatentIn versión 3.3
- 55 <210> 1  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

5 <400> 1  
 tctgaagtcc atga 14

10 <210> 2  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

15 <400> 2  
 ggatcaata taag 14

20 <210> 3  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

25 <400> 3  
 gttgacactg tctg 14

30 <210> 4  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

35 <400> 4  
 gttgacactg tc 12

40 <210> 5  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

50 <400> 5  
 gactgcctgt tctc 14

50 <210> 6  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

55 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

60 <400> 6  
 cgttgagta agc 13

60 <210> 7  
 <211> 14

<212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 5 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 7  
 gcgttgagc aagc 14

10 <210> 8  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 8  
 20 ctctgtgac cagg 14

<210> 9  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 9  
 30 ggactctgtg atcc 14

<210> 10  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial

<220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 10  
 40 ctgtttgagg gact 14

<210> 11  
 <211> 14  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 11  
 50 gagatggcag atgg 14

<210> 12  
 55 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 60 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 12  
 gctggtgtg ccac 14

<210> 13  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico  
  
 10 <400> 13  
 cagatccttg cac 13  
  
 <210> 14  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico  
  
 <400> 14  
 ccagatcctt gcac 14  
  
 <210> 15  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico  
  
 <400> 15  
 35 accttttgag ac 12  
  
 <210> 16  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 40 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico  
  
 <400> 16  
 45 caatgtcag actg 14  
  
 <210> 17  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico  
  
 <400> 17  
 55 cctgcaatgt tcag 14  
  
 <210> 18  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 60 <213> Artificial  
  
 <220>

<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 18  
tagggctgta gctg                    14

5

<210> 19  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 19  
gttggtctac ttca                    14

15

<210> 20  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 20  
ccaaccaatt tctc                    14

25

<210> 21  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 21  
gtcaattgta aagg                    14

35

<210> 22  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial

40

<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 22  
gtttaagaaa tcca                    14

45

<210> 23  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> Artificial

50

<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 23  
cttagtgta gc                        12

60

<210> 24  
<211> 12  
<212> ADN

<213> Artificial

<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

5 <400> 24  
ggttcttagt gt 12

10 <210> 25  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<400> 25  
ctggttctta gtgt 14

20 <210> 26  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

45 <400> 26  
tctgaagtcc atga 14

50 <210> 27  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato

60 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(14)  
 5 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 27  
 ggatcaaata taag 14
- 10 <210> 28  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 15 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (1)..(14)  
 <223> Fosforotioato
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (1)..(3)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (12)..(14)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 28  
 gttgacactg tctg 14
- 35 <210> 29  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 40 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(12)  
 45 <223> Fosforotioato
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 50 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(12)  
 55 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 29  
 gttgacactg tc 12
- 60 <210> 30  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

- <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- 5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato
- 10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 20 <400> 30  
gactgcctgt tctc 14
- <210> 31  
<211> 13
- 25 <212> ADN  
<213> Artificial
- <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- 30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> Fosforotioato
- 35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(13)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 45 <400> 31  
cgttggagta agc 13
- <210> 32  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 55 <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)
- 60 <223> Fosforotioato
- <220>  
<221> misc\_feature

# ES 2 555 057 T3

- <222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 10 <400> 32  
gcgttgagat aagc 14
- <210> 33  
<211> 14  
<212> ADN  
15 <213> Artificial
- <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- 20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato
- 25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 35 <400> 33  
ctctgtgatc cagg 14
- <210> 34  
<211> 14  
40 <212> ADN  
<213> Artificial
- <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- 45 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato
- 50 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 55 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 60 <400> 34  
ggactctgtg atcc 14

- <210> 35  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> Fosforotioato
- <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(14)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 35  
 25 ctgtttgagg gact 14
- <210> 36  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial
- <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> Fosforotioato
- 40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(14)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 36  
 50 gagatggcag atgg 14
- <210> 37  
 <211> 14  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial
- <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- 60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)

- <223> Fosforotioato
- <220>  
<221> misc\_feature  
5 <222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <220>  
<221> misc\_feature  
10 <222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 37  
15 gctggtgttg ccac 14
- <210> 38  
<211> 13  
<212> ADN  
<213> Artificial  
20
- <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- <220>  
25 <221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato
- <220>  
30 <221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <220>  
35 <221> misc\_feature  
<222> (12)..(13)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 38  
40 cagatccttg cac 13
- <210> 39  
<211> 14  
<212> ADN  
45 <213> Artificial
- <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- <220>  
50 <221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato
- <220>  
55 <221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <220>  
60 <221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

<400> 39  
ccagatcctt gcac 14

5 <210> 40  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<220>  
<221> misc\_feature  
15 <222> (1)..(12)  
<223> Fosforotioato

<220>  
<221> misc\_feature  
20 <222> (1)..(2)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

<220>  
<221> misc\_feature  
25 <222> (11)..(12)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

<400> 40  
gttgacactg tc 12

30 <210> 41  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

<220>  
<221> misc\_feature  
40 <222> (1)..(12)  
<223> Fosforotioato

<220>  
<221> misc\_feature  
45 <222> (1)..(2)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

<220>  
<221> misc\_feature  
50 <222> (11)..(12)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

<400> 41  
accttttgag ac 12

<210> 42  
<211> 14  
<212> ADN  
60 <213> Artificial

<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 5 <223> Fosforotioato
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 10 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(14)  
 15 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 42  
 cctgcaatgt tcag                      14
- 20 <210> 43  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 25 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (1)..(14)  
 <223> Fosforotioato
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (1)..(3)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (12)..(14)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- <400> 43  
 tagggctgta gctg                      14
- 45 <210> 44  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 50 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (1)..(14)  
 <223> Fosforotioato
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (1)..(3)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

# ES 2 555 057 T3

- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 5  
<400> 44  
gttggtctac ttca                    14
- 10  
<210> 45  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 15  
<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- 20  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato
- 25  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 30  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 35  
<400> 45  
ccaaccaatt tctc                    14
- 40  
<210> 46  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 45  
<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico
- 50  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato
- 55  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 60  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C
- 65  
<400> 46  
gtcaattgta aagg                    14
- 70  
<210> 47  
<211> 14  
<212> ADN

<213> Artificial

<220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

20 <400> 47  
gtttaagaaa tcca                    14

25 <210> 48  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(14)  
<223> Fosforotioato

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

45 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(12)  
<223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

<400> 48  
cttagtgta gc                    12

50 <210> 49  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

60 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> Fosforotioato

<220>

# ES 2 555 057 T3

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(12)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

10

<400> 49  
 ggttcttagt gt 12

<210> 50  
 <211> 14

15

<212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

20

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> Fosforotioato

25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(14)  
 <223> ANB, preferentemente beta-D-oxi-ANB, C de ANB, preferentemente 5-metil-C

35

<400> 50  
 ctggttctta gtgt 14

<210> 51  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> Motivo de secuencia de oligo o compuesto oligomérico

45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(13)  
 <223> Fosforotioato

50

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> beta-D oxi-ANB

55

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(13)  
 <223> beta-D oxi-ANB

60

<400> 51  
 gcattggtat tca 13

**REIVINDICACIONES**

- 1 Oligómero de entre 12 y 16 nucleótidos de longitud que comprende SEC ID nº 4 capaz de modular la expresión de la apolipoproteína B.
- 2 Oligómero según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos presenta una longitud de entre 12 y 14 nucleótidos.
- 3 Oligómero según la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia de nucleótidos comprende análogos de nucleótido.
- 4 Oligómero según la reivindicación 3, en el que los análogos de nucleótido son nucleótidos modificados con sacárido, tal como nucleótidos modificados con sacárido seleccionados de entre el grupo que consiste de: unidades de ácido nucleico bloqueado (ANB), unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN y unidades de 2'-fluoro-ADN.
- 5 Oligómero según la reivindicación 3 o 4, en el que los análogos de nucleótido son de ANB.
- 6 Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que es un gápmero.
- 7 Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la secuencia de nucleótidos del oligómero consiste de la SEC ID nº 4.
- 8 Oligómero según la reivindicación 7, en el que el oligómero es 5'-G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>t<sub>s</sub>g<sub>s</sub>a<sub>s</sub>c<sub>s</sub>a<sub>s</sub>c<sub>s</sub>t<sub>s</sub>g<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>m</sup>C -3', en el que las letras mayúsculas son unidades de beta-D-oxi-ANB, las letras minúsculas son unidades de ADN, el superíndice m indica 5-metil-citosina-ANB y el subíndice s representa un enlace fosforotioato.
- 9 Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la utilización en la inhibición de la expresión del gen o ARNm de APO-B100 en una célula que expresa el gen o ARNm de APO-B100.
- 10 Conjugado que comprende el oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y por lo menos una fracción no nucleótida o no polinucleótida unida covalentemente a dicho oligómero.
- 11 Conjugado según la reivindicación 10, que comprende el oligómero según la reivindicación 8.
- 12 Composición farmacéutica que comprende el oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el conjugado según la reivindicación 10 o 11, y un diluyente, portador, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 13 Composición farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende el oligómero según la reivindicación 8.
- 14 Composición farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende el conjugado según la reivindicación 11.
- 15 Oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el conjugado según la reivindicación 10 o 11, para la utilización como medicamento.
- 16 Utilización de un oligómero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o un conjugado según la reivindicación 10 o 11, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades asociadas a la actividad de la apolipoproteína B, seleccionadas de entre el grupo que consiste de desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipemias, por ejemplo la hiperlipemia combinada familiar (HLCF), la hiperlipemia adquirida, la hipercolesterolemia, la hipercolesterolemia resistente a estatinas, la enfermedad arterial coronaria (EAC), la enfermedad cardíaca coronaria (ECC) y la aterosclerosis.
- 17 Utilización según la reivindicación 16, que comprende el oligómero según la reivindicación 8.

FIGURA 1

a

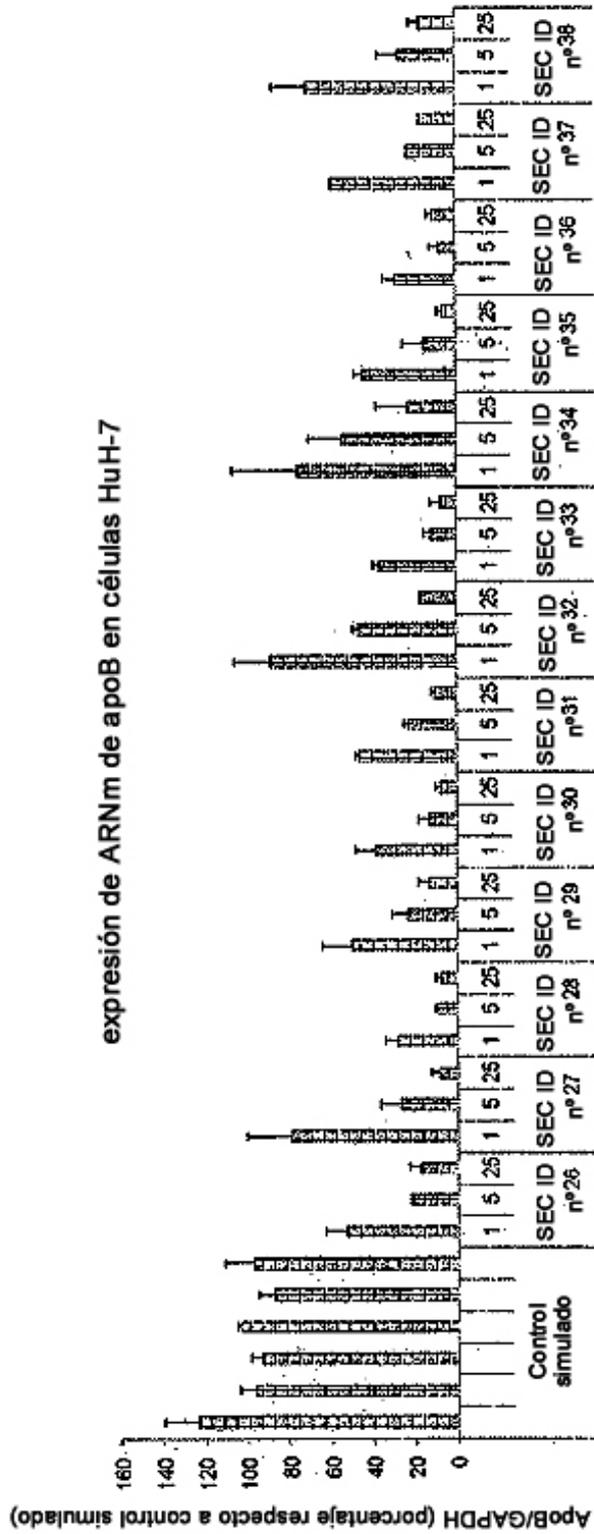


FIGURA 2

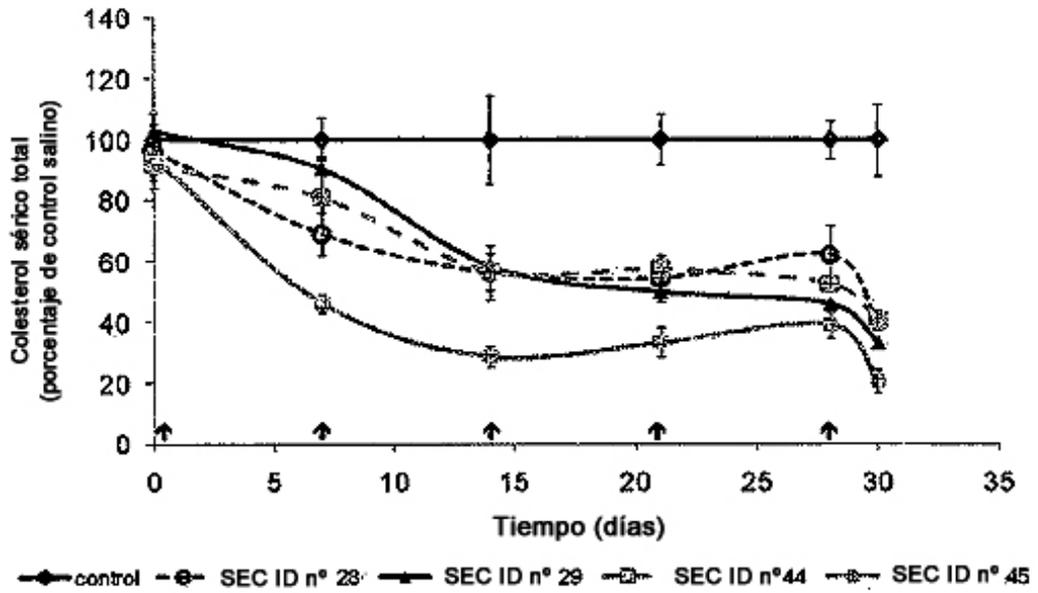
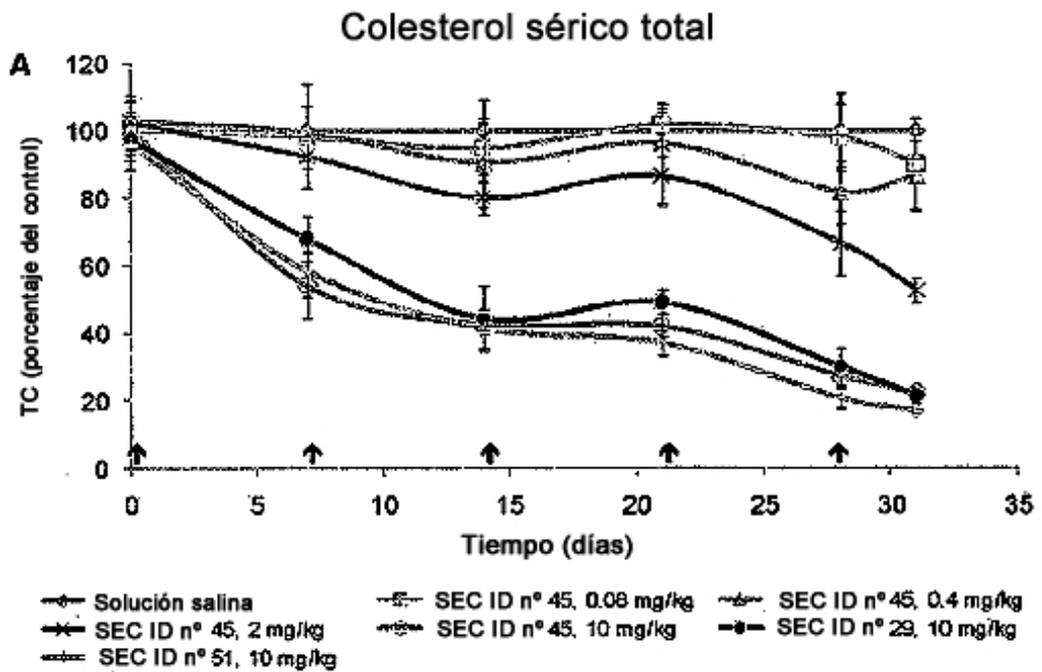


FIGURA 3



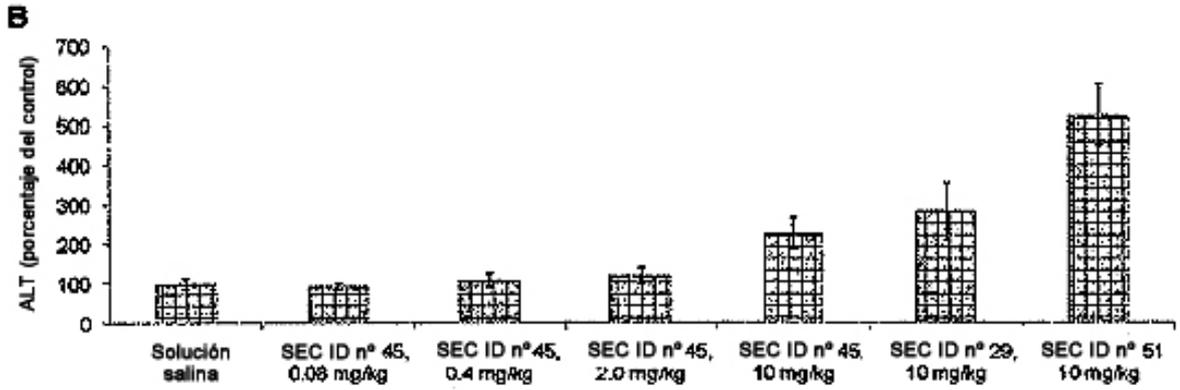
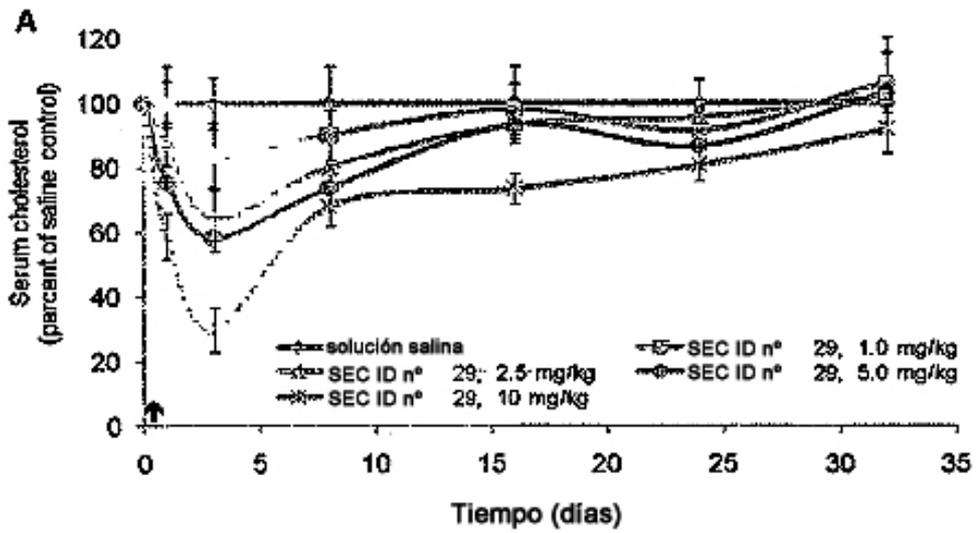


FIGURA 4



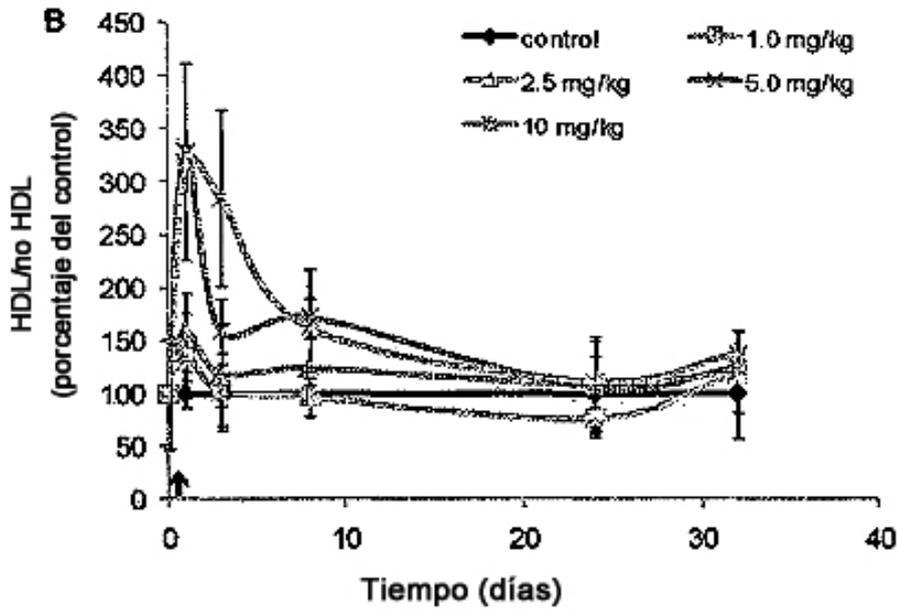
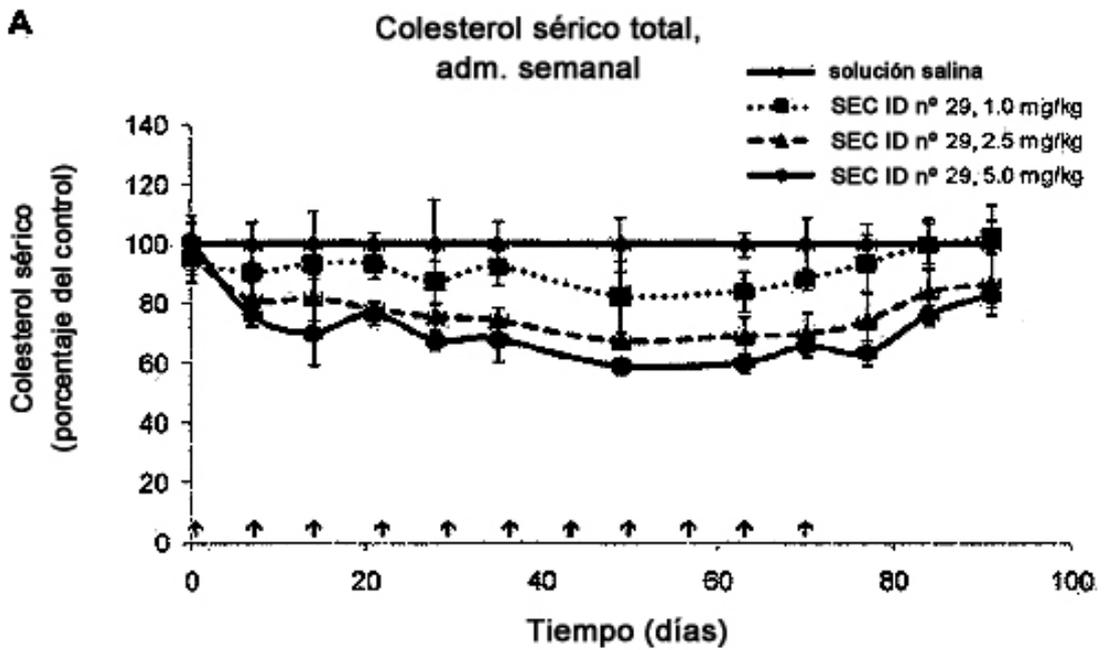


FIGURA 5



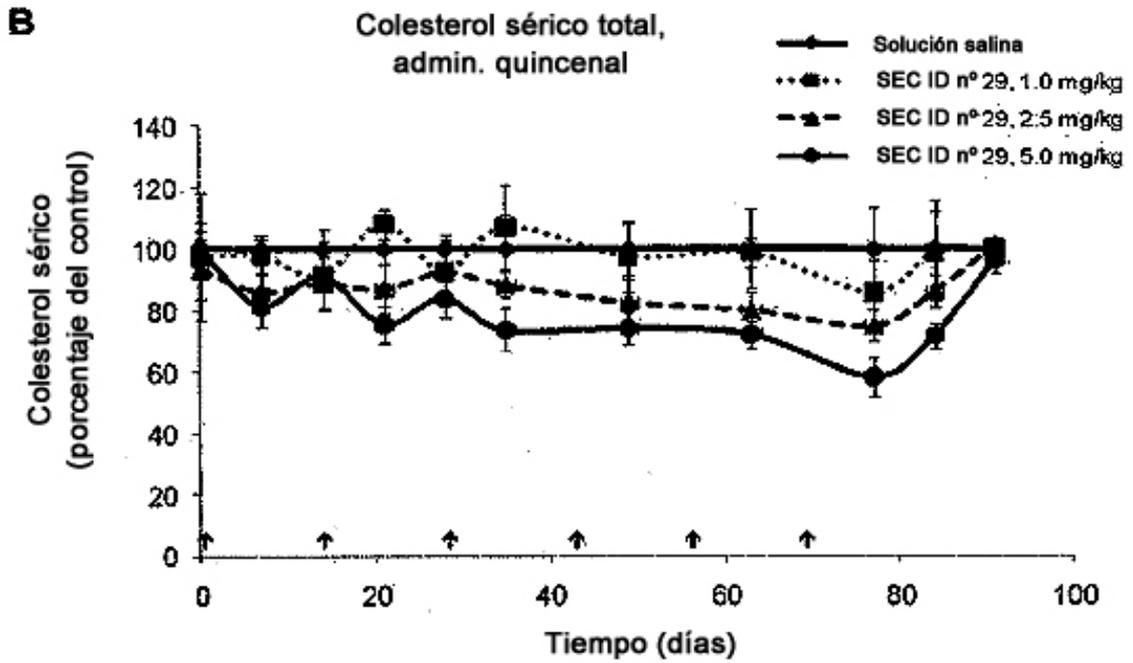


FIGURA 6

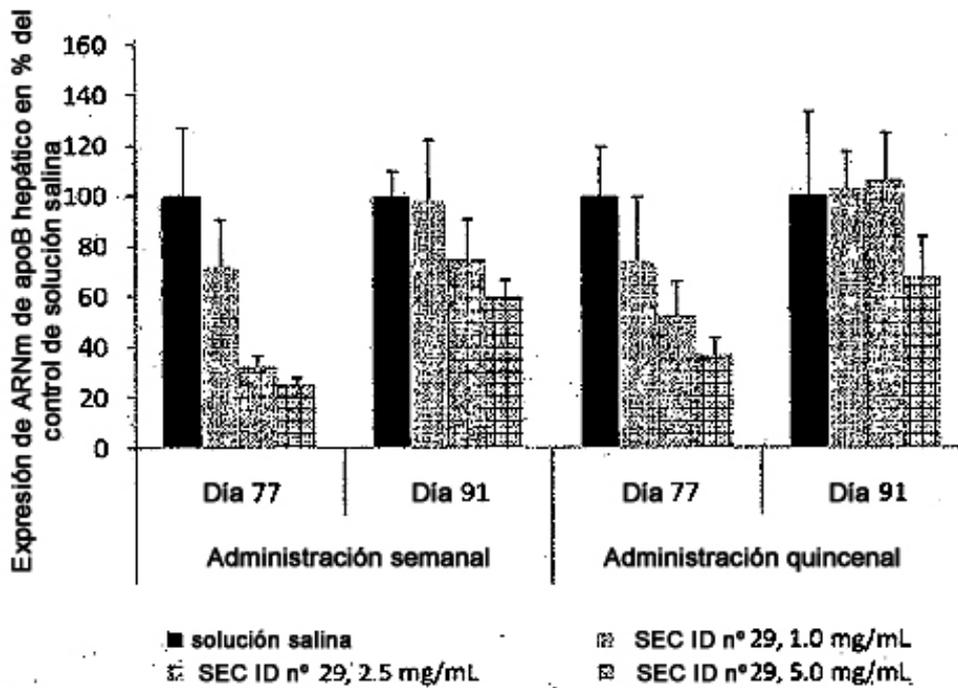


FIGURA 7

