

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 471**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2003 E 09169370 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2141233**

54 Título: **Diseño antisentido**

30 Prioridad:

18.11.2002 DK 200201774

20.10.2003 DK 200301540

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

31.03.2017

73 Titular/es:

ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN

A/S (100.0%)

Fremtidsvej 3

2970 Hørsholm , DK

72 Inventor/es:

CHRISTENSEN, SIGNE;

MIKKELSEN, NIKOLAJ;

FRIEDEN, MIRIAM;

HANSEN, HENRIK;

KOCH, TROELS;

PEDERSEN, DANIEL;

ROSENBOHM, CHRISTOPH;

THRUE, CHARLOTTE y

WESTERGAARD, MAJKEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 607 471 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

Diseño antisentido

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a productos farmacéuticos que comprenden oligonucleótidos antisentido y nuevos oligonucleótidos que tienen propiedades antisentido mejoradas.

10 Antecedentes de la invención

Los Profesores Imanishi y Wengel inventaron de forma independiente el Ácido Nucleico Bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés *Locked Nucleic Acid*) en 1997 (Solicitudes de Patente Internacional WO 99114226, WO 98/39352; P. Nielsen *et al.*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1997, 3423; P. Nielsen *et al.*, Chem. Commun., 1997, 9, 825; N. K. Christensen *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 5458; A. A. Koshkin *et al.*, J. Org. Chem., 1998, 63, 2778; A. A. Koshkin *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 13252-53; Kumar *et al.* Bioorg. & Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; y S. Obika *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 515). El primer monómero de LNA se basó en la estructura bicíclica 2'-O-CH₂-4'. Debido a la configuración de esta estructura se denomina: beta-D-oxi-LNA. Este oxo-LNA ha mostrado desde entonces aplicaciones biológicas prometedoras (Braasch y Corey, Biochemistry, 2002, 41(14), 4503-19; Childs *et al.* PNAS, 2002, 99(17), 11091-96; Crinelli *et al.*, Nucl. Acid. Res., 2002, 30(11), 2435-43; Elayadi *et al.*, Biochemistry, 2002, 41, 9973-9981; Jacobsen *et al.*, Nucl. Acid. Res., 2002, 30(19), en prensa; Kurreck *et al.*, Nucl. Acid. Res., 2002, 30(9), 1911-1918; Simeonov y Nikiforov, Nucl. Acid. Res., 2002, 30(17); Alayadi y Corey, Curr. opinion in Inves. Drugs., 2001, 2(4), 558-61; Obika *et al.*, Bioorg. & Med. Chem., 2001, 9, 1001-11; Braasch y Corey, Chem. & Biol., 2000, 55, 1-7; Wahlestedt *et al.*, PNAS, 2000, 97(10), 5633-38), Freier y Altmann, Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-43; Cook, 1999, Nucleosides & Nucleotides, 18(6&7), 1141-62.

Justo después del descubrimiento de oxo-LNA se derivatizó químicamente la estructura furanosídica bicíclica. Por lo tanto, se desvelaron los análogos bicíclicos 2'-S-CH₂-4' (tio-LNA) y 2'-NH-CH₂-4' (amino-LNA) (Singh, S. K., J. Org. Chem., 1998, 63, 6078-79; Kumar *et al.* Bioorg. & Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh *et al.* J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-39). Se ha mostrado la síntesis del tio-LNA que contiene uridina como nucleobase (Singh, S. K., J. Org. Chem., 1998, 63, 6078-79). Para amino-LNA se ha desvelado la síntesis de la nucleobase timidina (Kumar *et al.* Bioorg. & Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh *et al.* J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-39). Se ha preparado una serie de diastereoisómeros de LNA (Rajwanshi *et al.*, J. Chem Commun. 1999; 2073-2074; Hakansson y Wengel, Bioorg Med Chem Lett 2001; 11(7): 935-938; Rajwanshi *et al.*, Chem Commun., 1999; 1395-1396; Wengel *et al.*, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2001; 20(4-7): 389-396; Rajwanshi *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., 2000; 39: 1656-1659; Petersen *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 2001, 123(30), 7431-32; Sørensen *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 2002, 124(10), 2164-76; Vester *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 2002, 124(46), 13682-13683). En la técnica anterior se ha mostrado la síntesis de alfa-L-xilo, xilo-LNA y alfa-L-oxo-LNA que contienen bases de timidina. Para el alfa-L-oxo-LNA también se han sintetizado los nucleósidos de 5-metilo y adenina. Se ha presentado la temperatura de fusión (T_m) de dobles cadenas que contienen los diastereoisómeros de LNA. Resultó que el alfa-L-oxo-LNA tiene propiedades interesantes. Se ha mostrado que el alfa-L-oxo-LNA puede incorporarse en quimeras complejas que comprenden restos de ADN/ARN y pueden adaptarse en la estructura oligo y aumentar la unión. Esta propiedad de incorporarse en oligonucleótidos que contienen varias otras clases monoméricas y actúan de forma cooperativa es una propiedad que el alfa-L-oxo-LNA comparte con el oxo-LNA precursor. Además, se ha demostrado que un segmento de 4 monómeros alfa-LT consecutivos pueden incorporarse junto con un segmento de 4 monómeros oxo-LNA-T consecutivos (Rajwanshi *et al.*, Chem. Commun., 1999, 2073-74). Se ha demostrado la estabilidad aumentada de oligonucleótidos que contienen monómeros alfa-L-oxo-LNA (monómeros ¹³C, A, T). Los monómeros de alfa-L-oxo-LNA se incorporaron en oligonucleótidos con monómeros de alfa-L-oxo-LNA y ADN alternantes (míxmeros) y en oligómeros de alfa-L-oxo-LNA completamente modificados. La estabilidad se comparó con oxo-LNA y con ADN y se descubrió que los monómeros de alfa-L-oxo-LNA desplazaban el mismo patrón de protección que oxo-LNA (Sørensen, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 2002, 124(10), 2164-76). Los mismos oligonucleótidos que contienen alfa-L-oxo-LNA se ensayaron en ensayos de RNasa H y se descubrió que los diseños desvelados no reclutaban eficazmente RNasa H. Cuando se toman estos ejemplos juntos también en combinación con los datos publicados por Arzumanov *et al.* (Biochemistry 2001, 40, 14645-54) no se ha mostrado que los oligonucleótidos que contienen alfa-L-oxo-LNA recluten eficazmente RNasa H. No se han demostrado oligonucleótidos que contengan cualquier combinación de los diastereoisómeros y cualquier otro miembro de la familia de LNA.

El ADN_{bc} natural existe a pH fisiológico como una hélice de forma B, mientras que ARN_{bc} existe como una hélice de forma A. Una hélice formada por ADN y ARN existe en una forma A/B intermedia. Esta diferencia morfológica se origina en la diferencia en las conformaciones de azúcar preferidas de las desoxirribosas y las ribosas. El anillo de furanosa de desoxirribosa existe a temperatura ambiente en un equilibrio entre conformación C2'-*endo* (tipo S) y C3'-*endo* (tipo N) con una barrera de energía de ~2 kcal/mol (Figura 3). Para desoxirribosa la conformación de tipo S está ligeramente reducida en energía (~0,6 kcal/mol) en comparación con el tipo N y explica por qué se encuentra ADN en la conformación de tipo S. La conformación conduce a la hélice de forma B. Para ribosa, y ARN, la preferencia es para el tipo N que conduce a la hélice de forma A. La hélice de forma A se asocia con mayor

estabilidad de hibridación. El oxi-LNA y los análogos de LNA se bloquean en la conformación N y en consecuencia los oligonucleótidos que forman serán de tipo ARN. El alfa-L-oxi-LNA está bloqueado en un tipo S y por lo tanto los oligonucleótidos que formarán serán más de tipo ADN (Sørensen *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 2002, 124(10), 2164-76; Rajwanshi *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., 2000; 39: 1656-1659). Se están desarrollando estrategias moleculares para modular la expresión génica no deseada que provoca directamente, participa en o agrava una patología. Una de dichas estrategias implica inhibir la expresión génica con oligonucleótidos complementarios en secuencia del ARN mensajero de un gen diana. La cadena de ARN mensajero es una copia de la cadena de ADN codificante y se denomina, por lo tanto, como la cadena de ADN, cadena con sentido. Los oligonucleótidos que hibridan con la cadena con sentido se denominan oligonucleótidos antisentido. La unión de estas cadenas con ARNm interfiere con el proceso de traducción y en consecuencia con la expresión génica. Zamecnik y colaboradores describieron originalmente la estrategia antisentido y el principio ha atraído desde entonces mucho interés (Zamecnik y Stephenson, PNAS, 1978, 75(1), 280-4; Bennet y Cowset, Blochim. Biophys. Acta, 1999, 1489, 19-30; Crooke, 1998, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 15, 121-57; Wengel, J. En Antisense Drug Technology; Principles, Strategies, and Applications; Editado por Crooke, S. T., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, Basel, 2001; págs. 339-357).

Un objetivo buscado durante mucho tiempo ha sido desarrollar fármacos con la capacidad de destruir genes malignos de forma específica de base. Las aplicaciones de dichos fármacos, por ejemplo, en cáncer y enfermedades infecciosas son evidentes. Los oligonucleótidos nativos no pueden emplearse como tal principalmente debido a su inestabilidad en el medio celular y a una afinidad demasiado baja por los genes diana. El deseo de desarrollar sondas de ácido nucleico con propiedades mejoradas a este respecto ha sido la principal fuerza impulsora detrás del intento de síntesis masiva en el área de preparación de análogos de ácido nucleico. La más importante directriz en este trabajo ha sido diseñar los análogos de ADN de tal modo que el análogo de ADN obtenga la conformación de tipo N/tipo "ARN" que se asocia con la mayor afinidad de los oligonucleótidos por ácidos nucleicos.

Uno de los mecanismos importantes implicados en Antisentido es el mecanismo de RNasa H. La RNasa H es una enzima intracelular que escinde la cadena de ARN en dobles cadenas de ARN/ADN. Por lo tanto, en la búsqueda de oligonucleótidos antisentido eficaces, ha sido una característica importante preparar oligonucleótidos que puedan activar RNasa H. Sin embargo, el prerrequisito de un oligonucleótido en este sentido es por lo tanto que el oligo sea de tipo ADN y como se ha indicado anteriormente la mayoría de los análogos de ADN de alta afinidad inducen oligonucleótidos de tipo ARN. Por lo tanto, para compensar la falta de capacidad de sustrato de RNasa H de la mayoría de los análogos de ADN (como por ejemplo análogo de ADN 2'-OMe y oxi-LNA) los oligonucleótidos deben tener segmentos/tramos consecutivos de ADN y/o fosforotioatos. Dependiendo del diseño de los segmentos de dichos oligonucleótidos habitualmente se denominan Gápmeros, si el segmento de ADN está flanqueado por los segmentos del análogo de ADN, Headmeros, si el segmento del análogo de ADN está localizado en la región 5' del oligonucleótido y Tailmeros, si el segmento del análogo de ADN está localizado en la región 3' del oligonucleótido.

Debería mencionarse que están implicados otros mecanismos importantes en Antisentido que no dependen de la activación de RNasa H. Para dichos oligonucleótidos los análogos de ADN, como LNA, pueden colocarse en cualquier diseño de combinación (Childs *et al.* PNAS, 2002, 99(17), 11091-96; Crinelli *et al.*, Nucl. Acid. Res., 2002, 30(11), 2435-43; Elayadi *et al.*, Biochemistry, 2002, 1, 9973-9981; Kurreck *et al.*, Nucl. Acid. Res., 2002, 30(9), 1911-1918; Alayadi y Corey, Curr. opinion in Inves. Drugs., 2001, 2(4), 558-61; Braasch y Corey, Chem. & Biol., 2000, 55, 1-7).

A diferencia del beta-D-oxi-LNA, el alfa-L-oxi-LNA tiene una conformación bloqueada de tipo ADN y se ha demostrado que alfa-L-oxi-LNA puede activar RNasa H (Sørensen *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 2002, 124(10), 2164-76). Sin embargo, la tasa de escisión de RNasa H es mucho menor en comparación con ADN en los diseños desvelados y, por lo tanto, no se ha mostrado que los oligonucleótidos en los diseños desvelados sean reactivos antisentido eficaces.

El documento WO01/48190 desvela un oligonucleótido antisentido gápmero (Cur102) que consiste en dos flancos modificados por LNA y un tramo central de oligonucleótidos de ADN con enlaces fosforotioato.

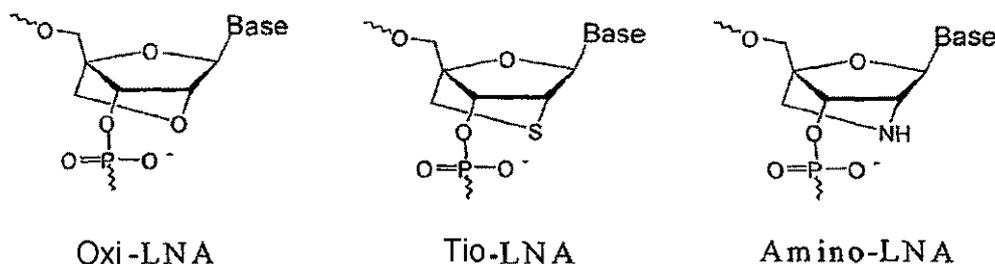
Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto una nueva clase de productos farmacéuticos que pueden usarse en terapia antisentido. Además, los inventores desvelan nuevos oligonucleótidos con propiedades antisentido mejoradas. Los nuevos oligonucleótidos están compuestos de al menos un Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) alfa-L-oxi LNA. Los oligonucleótidos que comprenden LNA también pueden incluir nucleótidos de ADN y/o ARN.

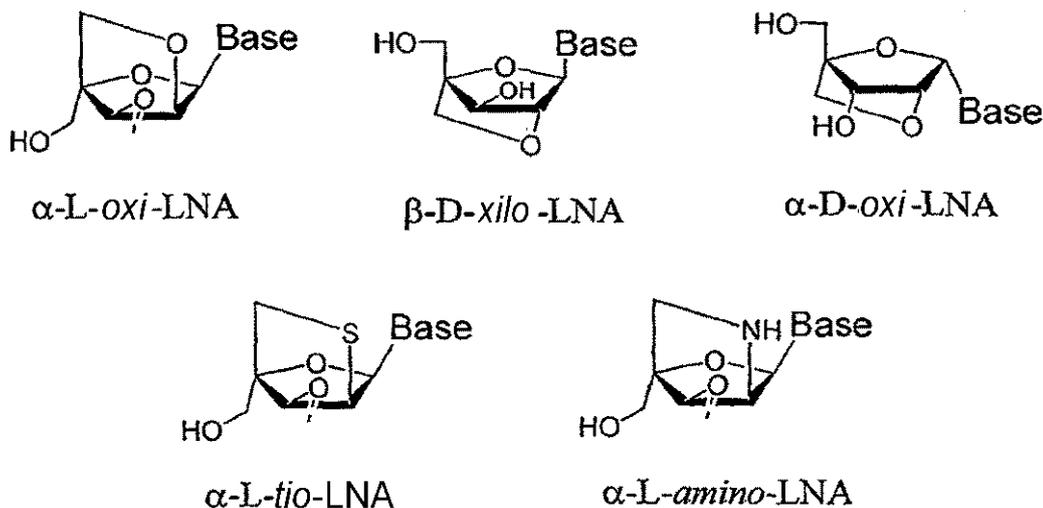
La invención proporciona un oligonucleótido gápmero antisentido que puede reclutar RNasa H cuando se hibrida con un ácido nucleico de ARN diana, en el que dicho oligonucleótido gápmero se basa en un tramo central de 6-12 nucleótidos de azúcares 2'-desoxi-eritropentofuranosilo (hueco) flanqueado por 1-6 restos de nucleótidos 2'-O modificados (flancos), en los que 1-4 de dichos nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo se reemplazan con alfa-L-oxi LNA.

Los presentes inventores han demostrado que α -L-oxi-LNA proporciona sorprendentemente la posibilidad del diseño de oligonucleótidos Antisentido mejorados que son sustratos eficaces para RNasa H. Estos nuevos diseños no se han descrito previamente y las directrices desarrolladas amplían las posibilidades de diseño de oligonucleótidos antisentido potentes. Además la presente invención comprende la divulgación de oligonucleótidos antisentido que tienen otras propiedades mejoradas distintas de la capacidad de ser sustratos de RNasa H. El diseño de reactivos antisentido más potentes es una combinación de varias características. Entre las características de estos diseños de oligonucleótidos nuevos están la estabilidad enzimática aumentada, captación celular aumentada y capacidad eficaz de reclutar RNasa H. Además es importante la relación entre la longitud y la potencia de los oligonucleótidos (por ejemplo un 15mero que tiene la misma potencia que un 21mero se considera mucho más óptimo). La potencia de los nuevos oligonucleótidos comprendidos en esta invención se ensaya en ensayos *in vitro* celulares y ensayos *in vivo*. Se muestra además que los nuevos diseños también mejoran las propiedades *in vivo* tales como mejores propiedades farmacocinéticas/farmacológicas y perfiles de toxicidad.

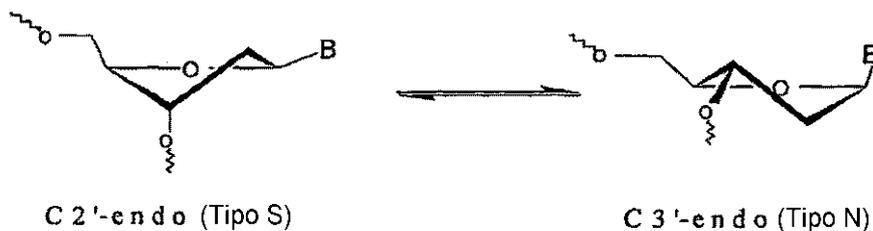
Beta-D-oxi-LNA y los análogos tio y amino LNA:



Diastereoisómeros de LNA:



Conformaciones de azúcares en ADN:



Divulgación de la invención

En otra realización interesante, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una construcción oligonucleotídica que contiene tres secuencias de nucleótidos localizadas de forma adyacente, A, B y C, en el siguiente orden (5' a 3'):

A-B-C o C-B-A, en el que

A representa una secuencia que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, al menos una de las cuales es una unidad alfa-L-oxi-LNA, y cuya secuencia contiene opcionalmente una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos no bloqueados (tales como unidades desoxirribonucleotídicas, unidades ribonucleotídicas o derivados de las mismas) y/u opcionalmente contiene una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos bloqueadas, tales como una unidad seleccionada del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, amino-LNA (todos en configuración alfa-L o beta-D) y derivados de los mismos;

B representa una secuencia de 6-10 nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo localizados de forma consecutiva, en la que uno o más de dichos nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo se reemplazan con alfa-L-oxi LNA; y

C representa una secuencia que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, al menos una de las cuales es una unidad alfa-L-oxi-LNA, y cuya secuencia contiene opcionalmente una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos no bloqueados (tales como unidades desoxirribonucleotídicas, unidades ribonucleotídicas o derivados de las mismas) y/u opcionalmente contiene una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos bloqueados, tales como una unidad seleccionada del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, amino-LNA (todas en configuración alfa-L o beta-D) y derivados de las mismas.

Otra realización de la invención se refiere a una construcción oligonucleotídica que contiene tres secuencias de nucleótidos localizadas de forma adyacente, A, B y C, en el siguiente orden (5' a 3'): A-B-C o C-B-A, en el que

A representa una secuencia que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, al menos una de los cuales es una unidad de alfa-L-oxi-LNA, y cuya secuencia contiene opcionalmente una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos no bloqueados (tales como unidades desoxirribonucleotídicas, unidades ribonucleotídicas o derivados de las mismas) y/u opcionalmente contiene una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos bloqueados tales como una unidad seleccionada del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, amino-LNA (todas en configuración alfa o beta) y derivados de las mismas;

B representa una secuencia de 6-10 nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo localizadas consecutivamente, en la que uno o más de dichos nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo se reemplazan con alfa-L-oxi LNA;

C representa una secuencia que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, al menos una de los cuales es una unidad alfa-L-oxi-LNA, y cuya secuencia contiene opcionalmente una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos no bloqueados (tales como unidades desoxirribonucleotídicas, unidades ribonucleotídicas o derivados de las mismas) y/u opcionalmente contiene una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos bloqueados, tales como una unidad seleccionada del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, amino-LNA (todas en configuración alfa o beta) y derivados de las mismas. Se prefiere que A tenga una longitud de 1-6 (preferentemente 2, 3, 4, 5, 6) unidades de nucleótidos; B tenga una longitud de 1-10 (preferentemente 5, 6, 7 u 8) unidades de nucleótidos;

C tenga una longitud de 1-6 (preferentemente 2, 3, 4, 5, 6) unidades de nucleótidos; la longitud general de la construcción puede ser de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de nucleótidos.

Otra realización interesante es una construcción en la que A representa una secuencia de unidades de nucleótidos que comprenden al menos tres unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, seleccionándose al menos una de dichas unidades de nucleótidos bloqueados del grupo que consiste en alfa-L-oxi-LNA y derivados del mismo; C representa una secuencia de unidades de nucleótidos que comprende al menos tres unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, seleccionándose al menos una de dichas unidades de nucleótidos bloqueados del grupo que consiste en alfa-L-oxi-LNA y derivados del mismo; y/o B representa una secuencia de 6-12 unidades de nucleótidos (tal como 6, 7, 8, 9 o 10 unidades), cuya secuencia además de la unidad o las unidades de nucleótidos que tienen resto o restos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo y/o resto o restos de ribopentofuranosilo comprende alfa-L-oxi-. Especialmente se prefiere una construcción en la que A y C comprenden al menos una unidad alfa-L-oxi-LNA o alfa-L-tio-LNA localizada adyacente a B.

En una realización adicional, la invención se refiere a un oligonucleótido que tiene la fórmula (en orden 5' a 3'): A-B-C-D, en la que A representa una secuencia de unidades de nucleótidos bloqueados; B representa una secuencia de unidades de nucleótidos no bloqueados, preferentemente al menos una unidad tiene un resto de azúcar 2'-desoxi-pentofuranosa, en cuya secuencia se sustituyen 1 o 2 unidades de nucleótidos con alfa-L-oxi-LNA; C representa una secuencia de unidades de nucleótidos bloqueados; y D representa una unidad de nucleótido no bloqueado o una secuencia de unidades de nucleótidos no bloqueados. Se prefiere que A tenga una longitud de 2-6 (preferentemente 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos; B tenga una longitud de 4-12 (preferentemente 6, 7, 8, 9, 10 u 11) unidades de

nucleótidos; C tenga una longitud de 1-5 (preferentemente 2, 3 o 4) unidades de nucleótidos; D tenga una longitud de 1-3 (preferentemente 1-2) unidades de nucleótidos; y que la longitud general de la construcción sea de 8-26 (preferentemente 12-21) unidades de nucleótidos. En una construcción preferida en la actualidad, A tiene una longitud de 4 unidades de nucleótidos; B tiene una longitud de 7-9, preferentemente 8, unidades de nucleótidos; C tiene una longitud de 3 unidades de nucleótidos; D tiene una longitud de 1 unidad de nucleótido; y la longitud general de la construcción es de 15-17 (preferentemente 16) unidades de nucleótidos. Se prefiere además que las unidades de nucleótidos bloqueados en A y C sean unidades beta-D-oxi-LNA o derivados de las mismas.

Las construcciones oligonucleotídicas de acuerdo con la invención pueden contener enlaces internucleosídicos fosfodiéster de origen natural, así como otros enlaces internucleosídicos como se definen en la presente memoria descriptiva. Son ejemplos de enlaces internucleosídicos los enlaces seleccionados del grupo que consiste en -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -O-PO(R^{''})-O-, -O-PO(CH₃)-O- y -O-PO(NHR^N)-O-, en los que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄ y R^{''} se selecciona de alquilo C₁₋₆ y fenilo.

En una realización adicional, la invención se refiere a un oligonucleótido de la invención que comprende al menos una unidad de nucleótido bloqueado seleccionada del grupo que consiste en amino-LNA, tio-LNA (ambas en configuración alfa-L o beta-D), alfa-L-oxi-LNA, y derivados de los mismos; en el que al menos uno de los enlaces entre las unidades de nucleótidos es diferente del enlazador de fosfodiéster (-O-P(O)₂-O-) de origen natural. Se prefieren en la actualidad construcciones en las que el enlace internucleosídico (entre el carbono 3' y el carbono 5' en nucleósidos adyacentes (3', 5' dideoxi) se selecciona del grupo que consiste en: -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -O-PO(R^{''})-O-, -O-PO(CH₃)-O-, y -O-PO(NHR^N)-O-, en los que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄ y R^{''} se selecciona de alquilo C₁₋₆ y fenilo, y se prefiere más en la actualidad el enlace internucleosídico de fosforotioato.

Una realización de las construcciones oligonucleotídicas de acuerdo con la invención se refiere a dichas construcciones que son capaces de mediar en la inactivación enzimática (al menos parcialmente) del ácido nucleico diana (por ejemplo una molécula de ARN) para la construcción. Las construcciones que median en el corte por RNasa H de la diana están dentro del alcance de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención se refiere a construcciones que son capaces de reclutar RNasa, especialmente construcciones en las que la secuencia B representa una secuencia de unidades de nucleótidos que hacen la construcción capaz de reclutar RNasa H cuando hibrida con un ácido nucleico diana (tal como ARN, ARNm).

Debería entenderse que la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una construcción oligonucleotídica antisentido de la invención como principio activo. Debería entenderse que la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende opcionalmente un vehículo farmacéutico, y que la composición farmacéutica opcionalmente comprende compuestos antisentido adicionales, compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios y/o compuestos antivirales.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área para tratar. La administración puede ser (a) oral (b) pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; Intratraqueal, intranasal, (c) tópica incluyendo epidérmica, transdérmica, oftálmica y a membranas mucosas incluyendo suministro vaginal y rectal; o (d) parenteral incluyendo inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, pulverizaciones, supositorios, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos, guantes recubiertos y similares. Las formulaciones tópicas preferidas incluyen en las que los oligonucleótidos de la invención están en mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen pero sin limitación polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, bolsitas, comprimidos o minicomprimidos. Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes u otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitación, potenciadores de la penetración, compuestos de vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse de una diversidad de componentes que incluyen, pero sin limitación, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el vehículo o los vehículos farmacéuticos o excipiente o excipientes. En general las formulaciones se preparan poniendo

uniformemente y de forma íntima en asociación los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, moldeando el producto.

5 Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de múltiples formas de dosificación posibles tales como, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

10 Las construcciones nucleotídicas antisentido de la invención abarcan, en su espectro más amplio, cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptable. Además la invención abarca cualquier otro compuesto que, tras la administración a un ser humano o animal, sea capaz de proporcionar directa o indirectamente el metabolito biológicamente activo o resto del mismo. La invención abarca también por lo tanto profármacos de los compuestos de la invención y sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos, y otros bioequivalentes. El término profármaco indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva y que se convierte a una forma activa, un fármaco, dentro del cuerpo o células del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen pero sin limitación sales formadas con cationes; sales de adición de ácidos formadas con sales de ácidos inorgánicos formadas con ácidos orgánicos tales como sales formadas de aniones elementales.

20 En una realización, la presente invención emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar el suministro eficaz de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos, a la piel de animales o seres humanos. La mayoría de los fármacos están presentes en solución en formas tanto ionizadas como no ionizadas. Sin embargo, habitualmente solamente los fármacos solubles en lípidos o lipófilos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden cruzar las membranas celulares si la membrana para cruzar se trata con un potenciador de la penetración. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen un vehículo farmacéutico que puede contener una diversidad de componentes que proporcionan una diversidad de funciones, incluyendo regulación de la concentración farmacológica, regulación de la solubilidad, estabilización química, regulación de la viscosidad, potenciación de la absorción, regulación del pH y similares. El vehículo farmacéutico puede comprender un vehículo o excipiente líquido adecuado y un adyuvante o adyuvantes auxiliares opcionales. Los vehículos y excipientes líquidos son convencionales y están disponibles en el mercado. Son ilustrativos de los mismos, agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones acuosas de dextrosa y similares. Para formulaciones solubles en agua, la composición farmacéutica incluye preferentemente un tampón tal como un tampón fosfato, u otra sal de ácido orgánico. Para formulaciones que contienen compuestos antisentido débilmente solubles, pueden emplearse microemulsiones. Otros componentes pueden incluir antioxidantes, tales como ácido ascórbico, polímeros hidrófilos, tales como, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo celulosa y sus derivados, dextrinas, agentes quelantes y componentes similares bien conocidos por los expertos en la ciencia farmacéutica. Los oligonucleótidos pueden encapsularse en liposomas para suministro terapéutico.

45 En una cierta realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos antisentido y (b) uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales que actúan mediante un mecanismo no antisentido. Cuando se usan con los compuestos de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, mitramicina y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, mitramicina y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de otro agente y oligonucleótido) o en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos tales adicionales o en combinación con radioterapia.

50 También pueden combinarse fármacos antiinflamatorios, incluyendo pero sin limitación fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, en composiciones de la invención. Pueden usarse juntos o secuencialmente dos o más compuestos combinados.

55 En otra realización, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

60 La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología para tratar, y el ciclo de tratamiento que dura de varios días a varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se consigue una disminución de la patología. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente.

65 Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales. En general se puede estimar basándose en CE50 que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales *in vitro*

e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 μg a 25 g por kg de peso corporal, y puede proporcionarse una o más veces al día, a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada 2 a 10 años. Las velocidades de repetición para la dosificación pueden estimarse basándose en los tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales. Después del tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para evitar la reaparición de la patología.

Los compuestos antisentido que contienen LNA de la presente invención pueden utilizarse para diagnóstico, terapia, profilaxis y como reactivos y kits de investigación. Para terapia, un animal o un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno, puede tratarse modulando la expresión de un gen administrando compuestos antisentido de acuerdo con la presente invención. Se proporcionan además métodos para tratar un animal y seres humanos, que se sospecha que tienen o son propensos a una enfermedad o afección, asociada con la expresión de un gen diana administrando una cantidad terapéutica o profiláctica eficaz de uno o más de los compuestos antisentido o composiciones de la invención. Son ejemplos de dichas enfermedades por ejemplo diferentes tipos de cáncer, enfermedades infecciosas e inflamatorias.

En una cierta realización, la presente invención se refiere a un método de síntesis de una composición farmacéutica, un oligonucleótido o una construcción de acuerdo con la presente invención.

Definiciones

La expresión "secuencia de nucleótidos" o "secuencia" comprende una pluralidad (es decir, más de uno) de nucleósidos (o derivados de los mismos), en cuya secuencia cada dos nucleósidos adyacentes (o derivados de los mismos) están unidos por un enlazador internucleosídico. Cuando la longitud de una secuencia se define por un intervalo (tal como de 2 a 10 unidades de nucleótidos), se entiende que el intervalo comprende todos los números enteros en ese intervalo, es decir "una secuencia de 2-10 unidades de nucleótidos" comprende secuencias que tienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de nucleótidos.

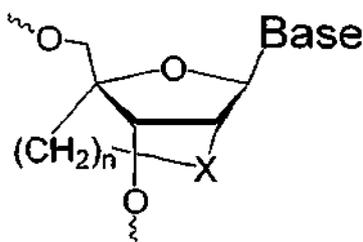
En el presente contexto, el término "oligonucleótido" (u oligo, oligómero) significa una cadena sucesiva de unidades de nucleósidos (es decir glucósidos de bases heterocíclicas) conectadas mediante enlaces internucleosídicos.

Por el término "unidad" se entiende un monómero.

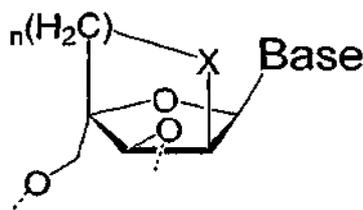
La expresión "al menos uno" comprende los números enteros mayores de o iguales a 1, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y así sucesivamente.

La expresión "nucleótido bloqueado" comprende nucleótidos en los que el resto de azúcar 2' desoxi ribosa se modifica por la introducción de una estructura que contiene un heteroátomo que conecta los átomos de carbono 2' a 4'. La expresión incluye nucleótidos que tienen las siguientes subestructuras (el oxígeno en los extremos 3' y 5' ilustra ejemplos del punto de partida de los enlaces internucleosídicos):

Derivados de beta-D-LNA:



Derivados de alfa-L-LNA



En ambas estructuras, X representa O, S o N-R (R = H; alquilo C1-C6 tal como metilo, etilo, propilo, *i*-propilo, butilo, *i*-butilo, *t*-butilo y pentilo); y

n es un número entero 1, 2 o 3, de modo que el grupo $-(\text{CH}_2)_n-$ comprende grupos metileno, etileno o propileno. En estos grupos alquilenos (y el grupo $-\text{N}(\text{alquilo (C1-C6)})-$), uno o más átomos H pueden reemplazarse con sustituyentes, tales como uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en átomos de halógeno (Cl,

F, Br, I), Nitro, alquilo C1-6 o alcoxi C1-6, ambos opcionalmente halogenados.

En el presente contexto, la expresión “alquilo C₁₋₆” significa un grupo hidrocarburo lineal, cíclico o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, propilo, *iso*-propilo, butilo, *terc*-butilo, *iso*-butilo, pentilo, ciclopentilo, hexilo, ciclohexilo, en particular metilo, etilo, propilo, *iso*-propilo, *terc*-butilo, *iso*-butilo y ciclohexilo. “Alcoxi C₁₋₆” significa -O-(alquilo C1-6).

La expresión “nucleótido no bloqueado” comprende nucleótidos que no contienen una estructura de enlace en el resto de azúcar ribosa. Por lo tanto, la expresión comprende monómeros de nucleótidos de ADN y ARN (adenosina fosforilada, guanosina, uridina, citidina, desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, desoxicitidina) y derivados de los mismos así como otros nucleótidos que tienen un resto de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo o un resto de ribo-pentofuranosilo.

La expresión “tio-LNA” comprende un nucleótido bloqueado en el que X en las fórmulas anteriores representa S y n es 1. Tio-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

La expresión “amino-LNA” comprende un nucleótido bloqueado en el que X en las fórmulas anteriores representa -NR-, y n es 1. Amino-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

La expresión “oxi-LNA” comprende un nucleótido bloqueado en el que X en las fórmulas anteriores representa O y n es 1. Oxi-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

Por la expresión “alfa-L-LNA” como se usa en el presente documento se entiende normalmente alfa-L-oxi-LNA (n = 1 en el grupo de enlace), y por la expresión “LNA” como se usa en el presente documento se entiende monómero de beta-D-oxi-LNA en el que n en el grupo de enlace es 1.

Sin embargo, los derivados de los LNA bloqueados anteriores comprenden nucleótidos en los que n es un número entero distinto de 1.

Por la expresión “derivados de los mismos” en relación con nucleótidos (por ejemplo LNA y derivados de los mismos) se entiende que el nucleótido, además del enlace del anillo furano, puede derivatizarse adicionalmente. Por ejemplo, la base del nucleótido, además de adenina, guanina, citosina, uracilo y timina, puede ser un derivado de los mismos, o la base puede sustituirse con otras bases. Dichas bases incluyen análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Son ejemplos ilustrativos de nucleobases xantina, diaminopurina, 8-oxo-N⁶-metiladenina, 7-desazaxantina, 7-desazaguanina, N⁴,N⁴-etanocitosina, N⁶,N⁶-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C³-C⁶)-alquilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina, N⁶-alilpurinas, N⁶-acilpurinas, N⁶-bencilpurina, N⁶-halopurina, N⁶-vinilpurina, N⁶-purina acetilénica, N⁶-acil purina, N⁶-hidroxialquil purina, N⁶-tioalquil purina, N²-alquilpurinas, N⁴-alquilpirimidinas, N⁴-acilpirimidinas, N⁴-bencilpurina, N⁴-halopirimidinas, N⁴-vinilpirimidinas, N⁴-pirimidinas acetilénicas, N⁴-acilpirimidinas, N⁴-hidroxialquilpirimidinas, N⁶-tioalquilpirimidinas, timina, citosina, 6-azapirimidina, incluyendo 6-azacitosina, 2 y/o 4-mercaptopirimidina, uracilo, C⁵-alquilpirimidinas, C⁵-bencilpirimidinas, C⁵-halopirimidinas, C⁵-vinilpirimidina, C⁵-pirimidina acetilénica, C⁵-acil pirimidina, C⁵-hidroxialquil purina, C⁵-amidopirimidina, C⁵-cianopirimidina, C⁵-nitropirimidina, C⁵-aminopirimidina, N²-alquilpurinas, N²-alquil-6-tiopurinas, 5-azacitidinilo, 5-azauracililo, trazolopiridinilo, imidazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo y pirazolopirimidinilo. Los grupos de oxígeno y nitrógeno funcionales en la base pueden protegerse según sea necesario o se desee. Se conocen bien por los expertos en la materia grupos protectores adecuados e incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo y *t*-butildifenilsililo, tritilo, grupos alquilo, grupos acilo tales como acetilo y propionilo, metanosulfonilo y *p*-toluenosulfonilo. Las bases preferidas incluyen citosina, metil citosina, uracilo, timina, adenina y guanina. Además de la derivatización de la base, los nucleótidos tanto bloqueados como no bloqueados pueden derivatizarse en el resto de ribosa. Por ejemplo, puede introducirse un sustituyente 2', tal como un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halógeno (tal como flúor), alcoxi C1-C9 (tal como metoxi, etoxi, *n*-propoxi o *t*-propoxi), aminoalcoxi C1-C9 (tal como aminometoxi y aminoetoxi), aliloxi, imidazolalcoxi y polietilenglicol o un sustituyente 5' (tal como un sustituyente como se ha definido anteriormente para la posición 2').

Por las expresiones “enlace internucleosídico” y “enlace entre las unidades de nucleótidos” (que se usan indistintamente) deben entenderse el grupo enlazador divalente que forma el enlace covalente de dos nucleósidos adyacentes, entre el átomo de carbono 3' en el primer nucleósido y el átomo de carbono 5' en el segundo nucleósido (siendo dichos nucleósidos 3',5' didesoxi). Los oligonucleótidos de la presente invención comprenden secuencias en las que pueden derivatizarse nucleótidos tanto bloqueados como no bloqueados de forma independiente en el enlace internucleosídico que es un enlace que consiste preferentemente en de 2 a 4 grupos/átomos seleccionados de -CH₂-, -O-, -S-, -NR^H-, >C=O, >C=NR^H-, >C=S-, -Si(R^H)₂-, -SO-, -S(O)₂-, -P(O)₂-, -PO(BH₃)-, -P(O,S)-, -P(S)₂-, -PO(R^H)-, -PO(OCH₃)- y -PO(NHR^H)-, en los que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆ y R^H se selecciona de alquilo y fenilo C₁₋₆. Son ejemplos ilustrativos de dichos enlaces internucleosídicos -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CO-CH₂-, -CH₂-CHOH-CH₂-, -O-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH(R^H)-, -CH₂-CH₂-O-, -NR^H-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NR^H-, -CH₂-NR^H-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -NR^H-CS-NR^H-, -NR^H-C(=NR^H)-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-CH₂-O-, -O-CH₂-CO-O-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -

O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CH=N-O-, -CH₂-NR^H-O-, -CH₂-O-N(R⁵)-, -CH₂-O-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-O-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-NR^H-CH₂-, -O-NR^H-, -O-CH₂-S-, -S-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-S-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH(R⁵)-, -S-CH₂-CH₂-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-S-CH₂-, -CH₂-SO-CH₂-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -O-SO-O-, -O-S(O)₂-O-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-NR^H-, -NR^H-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -O-P(S)₂-S-, -S-P(O)₂-S-, -S-P(O,S)-S-, -S-P(S)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, -O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(OCH₂CH₃)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^N)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -CH₂-P(O)₂-O-, -O-P(O)₂-CH₂- y -O-Si(R^H)₂-O-; en los que R⁵ se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆, R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆ y R^N se selecciona de alquilo C₁₋₆ y fenilo.

Se prefieren especialmente -CH₂-CO-NR^H-, -CH₂-NR^H-O-, -S-CH₂-O-, -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NR^H-P(O)₂-O-P(O,NR^H)-O-, -O-PO(R^H)-O-, -O-PO(CH₃)-O- y -O-PO(NHR^N)-O-, en los que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆, y R^N se selecciona de alquilo C₁₋₆ y fenilo.

Las unidades de nucleótidos también pueden contener un grupo 3' terminal o un grupo 5' terminal, preferentemente -OH.

Por la expresión "capaz de reclutar RNasa H" se entiende que una construcción oligonucleotídica para inducir la escisión por enzima RNasa H de un ácido nucleico diana (tal como ARNm diana), debe incluir un segmento o subsecuencia que es de tipo de ADN. Esto significa que al menos algunas unidades de nucleótidos de la construcción oligonucleotídica (o una subsecuencia de la misma) deben tener restos de azúcar 2'-desoxi-eritropentofuranosilo. Probablemente es necesaria una subsecuencia que tenga más de tres unidades de nucleótidos que contengan 2'-desoxi-eritropentofuranosilo unidas, consecutivas, para inducir actividad RNasa H tras hibridación de una construcción oligonucleotídica de la invención con un ácido nucleico diana, tal como un ARN. Preferentemente, una secuencia que es capaz de reclutar RNasa H contiene más de tres nucleótidos localizados de forma consecutiva que tienen restos de azúcar 2'-desoxi-eritropentofuranosilo, tales como 4, 5, 6, 7, 8 o más unidades. Sin embargo, dicha subsecuencia de nucleótidos localizados consecutivamente que tienen restos de azúcar 2'-desoxi-eritropentofuranosilo pueden añadirse (es decir se reemplazan uno o más (tal como 1, 2, 3, 4 o más) nucleótidos) con otros nucleótidos, preferentemente unidades alfa-L-oxi, tio- o amino-LNA o derivados de las mismas.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se conoce bien por los expertos en la materia.

Son ejemplos de dichas sales farmacéuticamente aceptables el yoduro, acetato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, ascorbato, benzoato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, *o*-acetoxibenzoato, naftaleno-2-benzoato, bromuro, isobutirato, fenilbutirato, *g*-hidroxibutirato, *b*-hidroxibutirato, butin-1,4-dioato, hexin-1,4-dioato, hexin-1,6-dioato, caproato, caprilato, cloruro, cinamato, citrato, decanoato, formiato, fumarato, glicolato, heptanoato, hipurato, lactato, malato, maleato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, isonicotinato, nitrato, oxalato, ftalato, tereftalato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, propiolato, propionato, fenilpropionato, salicilato, sebacato, succinato, suberato, sulfato, bisulfato, pirofosfato, sulfito, bisulfito, sulfonato, bencenosulfonato, *p*-bromofenilsulfonato, clorobencenosulfonato, propanosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, metanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, *p*-toluenosulfonato, xilenosulfonato, tartrato y similares.

Leyendas de las figuras

Figura 1: estabilidad de oligonucleótidos que contienen beta-D-amino-LNA contra SVPD (las mayúsculas son LNA, T^N significa beta-D-amino-LNA y las minúsculas son ADN. El oligonucleótido se sintetiza en soporte de desoxinucleósido, t.).

Figura 2: distribución subcelular en células MiaPacall de oligonucleótidos marcados con FAM (2740, 2774, 2752, 2746) transfectados con Lipofectamine2000.

Figura 3: comparación de la captación de oligonucleótidos tritizados (tio=2748; amino=2754; oxi=2742) en MiaPacall y células 15PC3 a diferentes concentraciones de oligonucleótidos con Lipofectamine2000 como agente de transfección.

Figura 4: regulación negativa de la expresión de luciferasa de gápmoros oligonucleotídicos que contienen beta-D-amino-LNA o beta-D-tio-LNA y el control de gápmoro de beta-D-oxi-LNA correspondiente a una concentración de oligonucleótido de 50 nM.

Figura 5: análisis de transferencia de Northern de oligonucleótidos que contienen beta-D-amino-LNA (2754 y 2755), beta-D-tio-LNA (2748 y 2749) o beta-D-oxi-LNA (2742) a 400 y 800 nM en células 15PC3 transfectadas con Lipofectamine2000.

Figura 6: Análisis de transferencia de Northern de oligonucleótidos que contienen beta-D-amino-LNA (2754), beta-D-tio-LNA (2748), alfa-L-oxi-LNA (2776) o beta-D-oxi-LNA 2742) a 50-400 nM en células 15PC3 transfectadas con Lipofectamine 2000; comparación con el control de desapareamiento correspondiente a 400

nM. También se analizaron controles de desapareamiento (tio=2750, amino=2756, alfa=2778) a 30-90 nM y se compararon con la coincidencia correspondiente a 30 nM. Tabla que contiene análisis de transferencia de Northern de oligonucleótidos que contienen beta-D-amino-LNA (2754), alfa-L-oxi-LNA (2776) y beta-D-oxi-LNA (2742) a 5-40 nM en células 15PC3 transfectadas con Lipofectamine2000; comparación con los controles de desapareamiento correspondientes a 20 nM.

Figura 7: eliminación y biodistribución de suero de 2754=amino, 2748=tio y 2742=oxi tritiado después de 30 min de inyección de embolada intravenosa. 2131 es un gápmero oligonucleotídico que contiene beta-D-oxi-LNA usado como referencia.

Figura 8: biodistribución de 2754=amino, 2748=tio y 2742=oxi tritiados después de 14 días de administración continua a una dosificación de 2,5 mg/kg/día usando minibombas osmóticas Alzet.

Figura 9: análisis de electroforesis de productos de degradación de ARN diana marcados con ³²P mediados por RNasaH y un oligonucleótido que contiene beta-D-amino-LNA. Alícuotas tomadas a 0, 10, 20 y 30 min para cada diseño. En los dibujos, la línea es ADN, el rectángulo beta-D-amino o tio-LNA.

Figura 10: estabilidad de oligonucleótidos que contienen beta-D-tio-LNA contra SVPD. (Las mayúsculas son LNA, T^s significa beta-D-tio-LNA y las minúsculas son ADN. El oligonucleótido se sintetiza en soporte de desoxinucleósido, t.).

Figura 11: análisis de FACS de oligonucleótidos que contienen beta-D-tio-LNA y los controles correspondientes.

Figura 12: estabilidad de oligonucleótidos que contienen alfa-L-oxi-LNA contra SVPD. (Las mayúsculas son LNA, T^o significa alfa-L-oxi-LNA y las minúsculas son ADN. El oligonucleótido se sintetiza en soporte de desoxinucleósido, t.)

Figura 13: estabilidad de diferentes oligonucleótidos (t₁₆, t_{s12}, T₁₆, T¹⁵T) frente a S1-endonucleasa (las mayúsculas son LNA, T^a significa alfa-L-oxi-LNA y las minúsculas son ADN. El oligonucleótido se sintetiza en soporte de oxi-LNA, T.)

Figura 14: análisis de FACS de oligonucleótidos que contienen alfa-L-oxi-LNA, y los controles correspondientes.

Figura 15: gápmeros que incluyen alfa-L-oxi-LNA (sombreados en gris).

Figura 16: regulación negativa de la expresión de luciferasa de oligonucleótidos que contienen alfa-L-oxi-LNA a concentración de oligonucleótidos de 50 nM.

Figura 17: diferentes mímmeros que contienen alfa-L-oxi-LNA. Los números significan el tramo contiguo alterno de ADN o LNA. En el dibujo, la línea es ADN, el rectángulo beta-D-oxi-LNA, la sombra gris corresponde a restos de alfa-L-oxi-LNA.

Figura 18: otros mímmeros que contienen alfa-L-oxi-LNA. Los números significan el tramo contiguo alterno de ADN o alfa-L-oxi-LNA. En el dibujo, la línea es ADN, la sombra gris corresponde a restos de alfa-L-oxi-LNA.

Figura 19: análisis de electroforesis de productos de degradación de ARN diana marcados con ³²P mediados por RNasaH y un oligonucleótido que contiene alfa-L-oxi-LNA. Alícuotas tomadas a 0, 10, 20 y 30 min para cada diseño. En los dibujos, la línea es ADN, el rectángulo beta-D-oxi-LNA, la sombra gris corresponde a restos de alfa-L-oxi-LNA.

Figura 20: crecimiento tumoral en ratones desnudos tratados con las dosis indicadas durante 14 días usando minibombas osmóticas Alzet, tanto para MiaPacall como para 15PC3.

Figura 21: niveles de ASAT, ALAT y fosfatasa alcalina en suero de ratones después del tratamiento de 14 días usando minibombas osmóticas Alzet con los oligonucleótidos indicados y a las concentraciones indicadas. 2722 y 2713 son oligonucleótidos no relevantes para este estudio.

Figura 22: control de la temperatura corporal de los ratones durante el experimento *in vivo*. 2722 y 2713 son oligonucleótidos no relevantes para este estudio.

Figura 23: construcciones especiales con beta-D-oxi-LNA. Los números significan el tramo contiguo alterno de ADN y beta-D-oxi-LNA. En el dibujo, la línea es ADN, el rectángulo es beta-D-oxi-LNA.

Figura 24: regulación negativa de la expresión de luciferasa de construcciones especiales que contienen beta-D-oxi-LNA (diseños 3-9-3-1) a concentración de oligonucleótido 2 nM.

Experimental

Síntesis de oligonucleótidos

5 Se sintetizaron oligonucleótidos usando el enfoque con fosforamidita en un sintetizador Expedite 8900/MOSS (Sistema de Síntesis de Oligonucleótidos Múltiple) a una escala 1 μ M. Al final de la síntesis (DMT-on), los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido usando amoniaco acuoso durante 1 h a temperatura ambiente, y se desprotegieron adicionalmente durante 4 h a 65 °C. Los productos en bruto se purificaron por HPLC de fase inversa. Después de la retirada del grupo DMT, los oligonucleótidos se caracterizaron por AE-HPLC o RP-HPLC, y la estructura se confirmó adicionalmente por ESI.

Estudio de estabilidad de 3'-exonucleasa

15 Se realizaron ensayos de fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD, Amersham Pharmacia) usando oligonucleótido 26 μ g/ml, enzima 0,3 μ g/ml a 37 °C en un tampón de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 8. Se mostró que la enzima mantenía su actividad en estas condiciones durante al menos 2 h. Se retiraron alícuotas de la digestión enzimática a los tiempos indicados, se detuvo por desnaturalización por calor durante 3 minutos y se almacenó a -20 °C hasta su análisis mediante RP-HPLC.

20 Estudio de estabilidad de S1-endonucleasa

Se realizaron ensayos de S1 endonucleasa (Amersham Pharmacia) usando 1,5 μ mol de oligonucleótido y enzima 16 U/ml a 37 °C en un tampón de NaOAc 30 mM, NaCl 100 mM, ZnSO₄ 1 mM, pH 4,6. Se mostró que la enzima mantenía su actividad en estas condiciones durante al menos 2 h. Se retiraron alícuotas de la digestión enzimática en los tiempos indicados, se inactivaron por liofilización, y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis mediante RP-HPLC y ES-MS o electroforesis en poliacrilamida.

Ensayo de luciferasa

30 Se usó la línea celular Hela X1/5 (ECACC Ref. n.º 95051229), que se transfecta de forma estable con un sistema de luciferasa de "tet inactivado". En ausencia de tetraciclina el gen de la luciferasa se expresa de forma constitutiva. La expresión puede medirse como luz en un luminómetro, cuando se ha añadido el sustrato de luciferasa, luciferina.

35 La línea celular Hela X1/5 se cultivó en Medio Esencial Mínimo de Eagle (Sigma M2279) complementado con Aminoácido No Esencial 1x (Sigma M7145), Glutamax I 1x (Invitrogen 35050-038), suero de ternero FBS 10 %, Gentamicina 25 μ g/ml (Sigma G 1397), G418 500 μ g/ml (Invitrogen 10131-027) e Higromicina B 300 μ g/ml (Invitrogen 10687-010). Las células Hela X1/5 se sembraron a una densidad de 8000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos blanca (Nunc 136101) el día antes de la transfección. Antes de la transfección, las células se lavaron una vez con OptiMEM (Invitrogen) seguido de adición de 40 μ l de OptiMEM con 2 μ g/ml de Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células se incubaron durante 7 minutos antes de la adición de los oligonucleótidos. Se añadieron 10 μ l de soluciones de oligonucleótidos y las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C y CO₂ 5 %. Después de las 4 horas de incubación las células se lavaron una vez en OptiMEM y se añadió el medio de cultivo (100 μ l). La expresión de luciferasa se midió al día siguiente.

45 Se midió la expresión de luciferasa con el sistema de ensayo de luciferasa Steady-Glo de Promega. Se añadieron 100 μ l del reactivo Steady-Glo a cada pocillo y la placa se agitó durante 30 s a 700 rpm. La placa se leyó en un instrumento Luminoskan Ascent de ThermoLabsystems después de 8 min de incubación hasta la lisis total completa de las células. La expresión de luciferasa se mide como unidades de luz relativa por segundo (ULR/s). Los datos se procesaron en el software de Ascent (v2.6) y se dibujaron gráficos en SigmaPlot2001.

50 Ensayo de RNasaH

Se incubó ARN 25 nM en presencia de un exceso 10 veces de diversos oligonucleótidos complementarios en tampón de TMK-glutamato 1 x (Tris acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM y glutamato de potasio 200 mM, pH 7,25) proporcionado con DTT 1 mM de en un volumen de reacción de 40 μ l. Las reacciones se preincubaron durante 3 minutos a 65 °C seguido de 15 minutos a 37 °C antes de la adición de RNasa H (Promega, Cat. n.º 4285). Se añadieron 0,2 U de RNasa H, y se extrajeron muestras (6 μ l) al colorante de formamida (3 μ l) en hielo en los puntos temporales de 0, 10, 20 y 30 minutos después de la adición de RNasa H. Se cargaron 3 μ l de las muestras de 0, 10, 20 y 30 minutos en un gel de poliacrilamida al 15 % que contenía urea 6 M y tampón de Tris borato/EDTA 0,9 x. El gel fue de 0,4 mm de grosor y se procesó a 35 vatios como el parámetro limitante durante 2 horas. El gel se secó durante 60 minutos a 80 °C, seguido de exposición durante una noche en pantalla fosforescente de Kodak. La pantalla fosforescente de Kodak se leyó en un instrumento Bio-Rad FX y el resultado se analizó en el software Bio-Rad Quantity One.

65

Ensayo celular: diana de luciferasa

5 Cultivo celular: se usaron líneas celulares 15PC3 (cáncer de próstata humano) y X1/5 (células HeLa transfectadas de forma estable con una construcción de luciferasa de Tet-Off), 15PC3 fueron donadas amablemente por F. Baas, Neurozintuigen lab, Ámsterdam, Países Bajos, X1/5 se obtuvo de ECACC. Se mantuvieron 15PC3 en DMEM + FCS 10 % + glutamax + gentamicina y se mantuvieron X1/5 en DMEM + FCS 10 % + glutamax + gentamicina + higromicina + G418 y ambas líneas celulares se pasaron dos veces por semana.

10 Transfección: se sembraron células a 150000 células por pocillo en placas de 12 pocillos el día antes de la transfección. Para la transfección con lípido, se mezcló Lipofectamine 2000 (GIBCO BRL) con OptiMem y se añadieron 300 µl de la mezcla a cada pocillo y se incubó durante 7 min antes de la adición de 100 µl de oligo diluido en OptiMem. Para cada línea celular, se determinó el Lipofectamine 2000 óptimo, para X1/5, la concentración de Lipofectamine óptima fue de 2 µg/ml y para 15PC3 la concentración óptima fue de 10 µg/ml.

15 Para transfección sin lípidos, las células se lavaron en OptiMem (GIBCO BRL) y se añadieron 300 µl de OptiMem a cada pocillo. Se prepararon reservas de trabajo de 200 µM de cada oligonucleótido para ensayar y se añadieron a cada pocillo obteniendo la concentración deseada. Para controles de simulación, el oligonucleótido se sustituyó con agua en ambos protocolos.

20 Las células se incubaron con el oligonucleótido durante 4 horas a 37 °C y CO₂ 5 % en una atmósfera humidificada y posteriormente se lavaron en OptiMem antes de añadirse el medio de cultivo completo. Las células se incubaron durante 20 h adicionales.

25 Para análisis de FACS, las células se recogieron por tripsinación y se lavaron dos veces en Lavado Celular (BD) y se resuspendieron en Cell Fix 1x (BD).

Análisis de FACS: se realizó análisis de FACS en un FACSCalibur (BD), la configuración se ajustó en controles de simulación. Se realizó análisis de datos usando el software Cell Quest Pro (BD).

30 Captación celular asistida

35 Se realizaron transfecciones en placas de cultivo de 6 pocillos en cubreobjetos de vidrio de microscopio con oligonucleótidos marcados con FAM a 400 nM. Se realizaron transfecciones con DAC30 (Eurogentec) o Lipofectamine 2000 como agentes de transfección liposómica durante 5 h en DMEM sin suero a 37 °C. Inmediatamente después del periodo de transfección, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 %.

Líneas celulares: diana de Ha-Ras

40 Se mantuvieron la línea celular de cáncer de próstata 15PC3 y la línea celular de carcinoma pancreático MiaPacall mediante pase en serie en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Las células se cultivaron a 37 °C y CO₂ 5 %. El medio se complementó con suero de ternero fetal al 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml.

45 Transfecciones: diana de Ha-Ras

50 Se realizaron transfecciones celulares con células 15PC3 sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos. Las células se sembraron (70 % de confluencia) el día antes de la transfección. Las transfecciones se realizaron habitualmente usando lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto por el uso de DMEM sin suero. Las células se transfectaron durante 5 horas. A continuación el medio se reemplazó con DMEM nuevo. También se comparó Lipofectamine 2000 con DAC30 (Eurogentec). Cuando se usó DAC30 se siguió el protocolo descrito en Ten Asbroek *et al.* (NAR 28, 1133-1138).

55 Para estudios de fluorescencia las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio en placas de cultivo de 6 pocillos. Se realizaron transfecciones como se ha descrito anteriormente pero usando oligonucleótidos marcados con FAM. En el momento del análisis, las células se fijaron en el vidrio en paraformaldehído al 4 % y se sellaron en vidrio de microscopio en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories Inc.). Se realizó microscopía de fluorescencia con un microscopio Vanox y filtros apropiados.

60 Análisis de ARNm: diana de Ha-Ras

Después de 20 horas, las células se recogieron en TRIZOL (Invitrogen), 1 ml por pocillo.

65 El ARN se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante para TRIZOL. El ARN se separó en geles de glioxal que contenían agarosa 1 % siguiendo protocolos convencionales. Posteriormente se transfirió ARN a membrana de Hybond N+ (Amersham) en SSC 20x. Después de la transferencia, el ARN se reticuló por UV, y después la

membrana se horneó durante 2 horas a 80 °C. Se realizaron hibridaciones y lavados posthibridación de acuerdo con Church y Gilbert (PNAS 81, 1991-1995). La sonda de Ha-Ras se generó usando cebadores Ha-Ras de acuerdo con Sharpe *et al.* (J. AM. Soc. Nephrol. 11 1600- 606) clonados en vector pGEM-T Easy (Promega). Las cargas de los niveles de ARNm de Ha-Ras se corrigieron usando una sonda 28S como se describe en Ten Asbroek *et al.* (NAR 28, 1133-1138).

Estudios de biodistribución

Los experimentos animales se aprobaron por el comité ético y se registran con el n.º DNL19.

Se realizó marcaje de tritio de oligonucleótidos usando el método de intercambio de calor descrito en Graham *et al.* (Graham, M. J., Freler, S. M., Crooke, R. M., Ecker, D. J., Maslova, R. N., y Lesnik, E. A. (1993). Tritium labeling of antisense oligonucleotides was carried out by exchange with tritiated water *Nucleic Acids Res.*, 21: 3737-3743). Las únicas dos diferencias introducidas al protocolo fueron que solamente se marcó 1 mg por oligonucleótido y que la separación de tritio libre del oligonucleótido marcado se realizó mediante columnas de Sephadex G10 de 30 cm 3 x (las columnas se prepararon usando pipetas de plástico de 10 ml). Se contó la radiactividad en todas las muestras después de disolver las muestras en fluido de centelleo Ultima Gold (Packard) y usando un contador de centelleo.

Para los estudios de biodistribución, se usaron ratones desnudos hembra (NMRI nu/nu, Charles River Netherlands, Maastricht, Países Bajos) con xenoinjertos de 15PC3 y Miapacall. Véase la sección de experimentos *in vivo* para detalles adicionales.

Se realizaron estudios de distribución tisular de oligonucleótidos trititados de acuerdo con Bijsterbosch *et al.* (Bijsterbosch, M. K., Manoharan, M., Rump, E. T., De Vruhe, R. L., van Veghel, R., Tivel, K. L., Biessen, E. A., Bennett, C. F., Cook, P. D., y van Berkel T. J. (1997) *In vivo* fate of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: predominant uptake by scavenger receptors on endothelial liver cells. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3290-3296)

La radiactividad en los diferentes órganos se corrigió con respecto a suero presente en el momento de la toma de muestras como se determinó por la distribución de ¹²⁵I-BSA (comunicación personal de K. Kruijt, Universidad de Leiden, Países Bajos).

Los oligonucleótidos se administraron mediante inyección de embolada en la vena cava inferior (circulación durante 30 minutos) o usando minibombas osmóticas Alzet (véase sección de experimento *in vivo*), para una circulación sistémica prolongada. Las muestras tisulares se disolvieron en NaOH 5 M a 65 °C y posteriormente se mezclaron con 10 volúmenes de fluido de centelleo Ultima Gold. El suero y la orina pueden contarse mezclando directamente con Ultima Gold.

Experimento *in vivo*

Los experimentos animales se aprobaron por el comité de ética y se registran con el número DNL19. Los protocolos detallados de los estudios animales se describen en dos publicaciones: inhibición de crecimiento específico de genotipo tumoral *in vivo* mediante oligonucleótidos antisentido contra un sitio polimórfico de la subunidad grande de ARN polimerasa II humana. Fluiter K, ten Asbroek AL, van Groenigen M, Nooij M, Aalders MC, Baas F. *Cancer Res* 1 abr 2002; 62(7): 2024-2028 *In vivo* tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides. Fluiter K, ten Asbroek AL, de Wissel MB, Jakobs ME, Wissenbach M, Olsson H, Olsen O, Oerum H, Baas F. *Nucleic Acids Res* 1 feb 2003; 31(3): 953-962.

Ratones: NMRI nu/nu hembras (Charles River Netherlands, Maastricht, Países Bajos). Xenoinjertos: MiaPaca II inyectado en el flanco derecho s.c. con Matrigel (collaborative biomedical products Bedford, MA); 15PC3 inyectado en el flanco izquierdo s.c. con Matrigel. Bombas osmóticas: Alzet 1002 (DURECT Corporation, Cupertino, CA) n.º de lote 10045-02. Dosificación para 2776, 2778 (alfa-L-oxi-LNA), 2742 y 2744 (beta-D-oxi-LNA): 1 y 2,5 mg/kg/día. Control: solución salina fisiológica.

Se supervisó la temperatura e ID de animal usando: microplacas de ELAM (IPTT 200) usando un lector de microplacas DAS 5002 (BMDS, Seaford, Delaware).

Se tomaron muestras de suero para ASAT/ALAT y determinación de fosfatasa alcalina. Se determinaron los niveles de aspartato aminotransferasa (ASAT) y alanina aminotransferasa (ALAT) y fosfatasa alcalina en suero usando procedimientos de diagnóstico convencionales con el H747 (Hitachi/Roche) con los kits apropiados (Roche Diagnostics). Se determinaron los niveles de ALAT/ASAT y fosfatasa alcalina aproximadamente 20 horas después de la extracción de suero del animal.

Resultados

Beta-D-amino-LNA

Estabilidad de nucleasa

Una de las principales dificultades encontradas usando los oligonucleótidos fosfodiéster de origen natural como sondas antisentido es su rápida degradación por diversas actividades nucleolíticas en células, suero, tejidos o medio de cultivo. Ya que el centro de fósforo es el sitio de ataque nucleolítico, se han introducido muchas modificaciones en el enlace internucleosídico para prevenir la degradación enzimática. Hasta la fecha, la modificación sintética más habitualmente empleada es el análogo de fosforotioato de cadena principal, realizado reemplazando uno de los átomos de oxígeno no de enlace del enlace internucleosídico por azufre.

Se quiso evaluar el efecto de introducir el nuevo LNA dentro de un oligonucleótido en presencia de nucleasas, y compararlo con los oligonucleótidos de fosforotioato bien estudiados. El estudio se llevó a cabo con oligotimidilatos bloqueando el extremo 3' con los nuevos parientes de LNA. El oligonucleótido se sintetiza en soporte de desoxinucleósido (t).

A partir de la figura 1 se puede apreciar las propiedades de estabilidad, que confieren beta-D-amino-LNA. Los oligonucleótidos que contienen monómero T de 2'-beta-D-amino-LNA (T^N) presentan una estabilidad notable frente a una 3'-exonucleasa. El bloqueo del extremo 3' con solamente dos T^N detiene la degradación enzimática del oligonucleótido al menos durante 2 h. Véase Figura 1.

Captación celular asistida y distribución subcelular

Se midió la eficacia de captación de oligonucleótido marcado con FAM que contenía beta-D-amino-LNA como la intensidad de fluorescencia media de las células transfectadas mediante análisis de FACS. Se ensayaron dos agentes de transfección diferentes (Lipofectamine 2000 y DAC30) en dos líneas celulares diferentes (MiaPacall y 15PC3).

Tabla 1. Oligonucleótidos que contienen beta-D-amino-LNA usados en experimentos de captación celular y distribución subcelular. El resto c es metil-c tanto para ADN como para LNA

Ref	oligonucleótidos	DAC30		Lipofectamine 2000	
		% de células	% de captación	% de células	% de captación
2753	T ^N C ^N C ^N g _s t _s C _s a _s t _s C _s g _s C _s t _s C ^N C ^N T ^N c-FAM	-	-	100	100
2752	T ^N _s C ^N _s C ^N _s g _s t _s C _s a _s t _s C _s g _s C _s t _s C ^N _s C ^N _s T ^N _s c-FAM	30	30	100	100
2740	T _s C _s C _s g _s t _s C _s a _s t _s C _s g _s C _s t _s C _s T _s c-FAM	80	30	100	100

Se transfectaron oligonucleótidos tanto completamente tiolados (PS, 2752) como parcialmente tiolados (PO en los flancos y PS en el hueco, 2753) que contenían beta-D-amino-LNA enumerados en la tabla 1 con buena eficacia, véase tabla 1. Ambos agentes de transfección, DAC30 y Lipofectamine, presentaron buena eficacia de transfección; sin embargo, Lipofectamine fue superior.

Lipofectamine mostró 100 % de eficacia en todos los casos: para ambos oligonucleótidos (2753 y 2752) y en ambas líneas celulares. Además, no se observó ninguna diferencia significativa en la eficacia de transfección asistida entre 2752 y 2753.

El oligonucleótido marcado con FAM 2752 también se usó para ensayar la distribución subcelular de oligonucleótidos que contenían beta-D-amino-LNA, véase figura 2. La mayor parte de la tinción se detectó como fluorescencia nuclear que aparecía como estructuras esféricas brillantes (también se tiñen los nucleolos) en un fondo nucleoplásmico difuso, así como algo de tinción citoplásmica en estructuras puntuadas brillantes. Los patrones de distribución observados fueron similares para 15PC3 y MiaPacall.

La distribución subcelular de beta-D-amino-LNA fue comparable a la observada con beta-D-oxi-LNA, 2740.

La eficacia de captación también se midió con oligonucleótido marcado con tritio 2754 (véase tabla 3 y figura 3) a diferentes concentraciones 100, 200, 300 y 400 nM, usando Lipofectamine2000 como agente de transfección, en células tanto MiaPacall como 15PC3, y se comparó con el beta-D-oxi-LNA equivalente, 2742 (véase tabla 3). 2754 muestra menor captación que 2742.

Ensayo de actividad antisentido: diana de luciferasa

Se ha mostrado que beta-D-oxi-LNA no induce actividad RNasaH, que es el modo más común de acción para un oligonucleótido antisentido que se dirige a la región cadena abajo del ARNm. Sin embargo, esta desventaja puede superarse creando oligonucleótidos quiméricos compuestos de beta-D-oxi-LNA y un hueco de ADN situado en la

mitad de la secuencia. Un gápmero se basa en un tramo central de 4-12 ADN (hueco) típicamente flanqueado por 1 a 6 restos de nucleótidos 2'-O modificados (beta-D-oxi-LNA en el caso de los inventores, flancos).

5 Fue de interés para los inventores evaluar la actividad antisentido de oligonucleótidos, que contienen beta-D-amino-LNA en un diseño de gápmero, y compararlos con gápmeros beta-D-oxi-LNA/ADN.

10 Se prepararon los oligonucleótidos de la tabla 2. Se decidió llevar a cabo el estudio con gápmeros de 16nt de longitud y un hueco de 7nt, que contenían 4 restos de beta-D-amino-LNA en un flanco y 4 restos de beta-D-oxi-LNA en el otro flanco, y un hueco tiolado. Se mostró que el grupo de FAM no afectaba a la capacidad antisentido de los oligonucleótidos. Por lo tanto, se preparó un oligonucleótido marcado con FAM para ensayarse en el ensayo de luciferasa y en la captación celular (no asistido).

15 El oligonucleótido, que se dirige a un motivo del ARNm de la Luciferasa de Luciérnaga, contiene dos desapareamientos en los flancos. Dos T se sustituyeron por dos restos C del flanco de LNA del extremo 5' por razones sintéticas. En ese punto temporal solamente estaban disponibles los restos de T. Por lo tanto y para poder establecer una comparación correcta, también se incluyó en el ensayo el control de beta-D-oxi-LNA correspondiente. No fue necesario en este caso ningún marcaje de FAM.

20 Tabla 2 Oligonucleótido que contiene beta-D-amino-LNA usado en el ensayo de actividad antisentido y el control de oxi-LNA (mayúsculas para LNA y minúsculas para ADN, T^N es beta-D-amino-LNA). El resto c es metil-c para ambos LNA

ref	secuencia	diseño	tamaño
U-14	FAM-T ^N T ^N T ^N T ^N g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s TCTTT	Amino-LNA en un flanco/hueco de PS de 7	16mero
2023-m; 02579	TTTTg _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s TCTTT	Control con oxi-LNA	16mero

25 A partir de la figura 4, se puede ver que el oligonucleótido con beta-D-amino-LNA presenta buena actividad antisentido a concentración de oligonucleótidos 50 nM. La inclusión de beta-D-amino-LNA en los flancos de un oligonucleótido da como resultado buena regulación negativa. Se puede concluir que la actividad antisentido de un oligonucleótido que contiene beta-D-amino-LNA es al menos tan buena como el gápmero beta-D-oxi-LNA parental.

Ensayo de actividad antisentido: diana de Ha-Ras

30 Fue de interés para los inventores evaluar adicionalmente la actividad antisentido de oligonucleótidos que contenían beta-D-amino-LNA en un diseño de gápmero, y compararlos con gápmeros de beta-D-oxi-LNA.

35 Se prepararon los oligonucleótidos de la tabla 3. Se decidió llevar a cabo el estudio con oligonucleótidos de 16nt de longitud y un hueco de 8nt, que contienen 3 restos de beta-D-amino-LNA en cada flanco y un diferente grado de tiolación. 2754 está completamente tiolado (PS), mientras que 2755 solamente está tiolado en el hueco (PO en los flancos y PS en el hueco). Los oligonucleótidos se diseñaron para dirigirse a un motivo del ARNm de Ha-Ras. También se incluyeron controles de desapareamiento diferentes, 2756 está completamente tiolado y 2757 presenta tiolación solamente en el hueco, véase tabla 3. Además, los gápmeros beta-D-oxi-LNA correspondientes (véase tabla 3, 2742 es todo PS, 2744 es el control de desapareamiento correspondiente; 2743 tiene PS en el hueco, 2745 es el control de desapareamiento correspondiente) también fueron

Tabla 3. Oligonucleótidos que contienen beta-D-amino-LNA y beta-D-oxi-LNA usados en los experimentos de actividad antisentido. El resto c es metil-c tanto para ADN como para LNA

ref	oligonucleótidos	
2755	T ^N C ^N C ^N g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C ^N C ^N T ^N c	PO/PS
2754	T ^N _s C ^N _s C ^N _s g _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C ^N _s C ^N _s T ^N _s c	Todo PS
2743	TCCg _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s CCTc	PO/PS
2742	T _s C _s C _s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C _s C _s T _s c	Todo PS
2757	T ^N C ^N T ^N g _s t _s a _s t _s a _s g _s c _s c _s C ^N C ^N C ^N c	Control de desapareamiento
2756	T ^N _s C ^N _s T ^N _s g _s t _s a _s t _s a _s g _s c _s c _s C ^N _s C ^N _s C ^N _s c	Control de desapareamiento
2745	TCTg _s t _s a _s t _s a _s g _s c _s C _s CCCc	Control de desapareamiento

ref	oligonucleótidos	
2744	T _s C _s T _s G _s T _s A _s A _s T _s A _s G _s C _s C _s C _s C _s C	Control de desapareamiento

La familia de Ras de protooncogenes de mamífero incluye tres isoformas bien conocidas denominadas Ha-Ras (Ha-Ras), K-Ras (K-Ras) y N-Ras. Los protooncogenes de *ras* codifican un grupo de proteínas G asociadas a membrana plasmática que se unen con nucleótidos de guanina con alta afinidad y activa varios efectores incluyendo raf-1, PI3-K etc. que se sabe que activan varias cascadas de señalización definidas implicadas en la regulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación celular.

Varios estudios *in vitro* (e *in vivo*) han demostrado que la familia de Ras de protooncogenes está implicada en la inducción de transformación maligna. En consecuencia, la familia Ras se considera dianas importantes en el desarrollo de fármacos antineoplásicos, y se ha descubierto que las proteínas Ras están sobreexpresadas o mutadas (lo que conduce con frecuencia a proteínas Ras activas de forma constitutiva) en aproximadamente 25 % de todos los cánceres humanos.

Resulta interesante que las mutaciones del gen *ras* en la mayoría de tipos de cáncer están limitadas frecuentemente a solamente uno de los genes *ras* y dependen del tipo tumoral y tejido. Las mutaciones en el gen de Ha-Ras están principalmente restringidas al tracto urinario y cáncer de vejiga.

La inclusión de beta-D-amino-LNA en los flancos de un oligonucleótido da como resultado buenos niveles de regulación negativa. A partir de la figura 5, se puede ver que los oligonucleótidos con beta-D-amino-LNA presentan buena actividad antisentido a dos concentraciones diferentes, 400 y 800 nM. No puede verse ninguna diferencia significativa en la regulación negativa entre oligonucleótidos 2755 y 2754, que presentan un diferente grado de tiolación. Se puede concluir que la actividad antisentido de un oligonucleótido que contiene beta-D-amino-LNA es al menos tan buena como el gámpero beta-D-oxi-LNA precursor. A partir de la figura 6, se ensayó un mayor intervalo de concentraciones. Hay una potente regulación negativa entre 50-400 nM para 2754. También se ensayó la especificidad; a 30 nM hay una diferencia significativa en la regulación negativa entre el desapareamiento 2756 (menos potente) y la coincidencia 2754. También se incluyeron concentraciones menores (5-40 nM) de la tabla en la figura 6. Se observó potente regulación negativa incluso a 5 nM para 2754, y estos niveles de regulación negativa son comparables al control de beta-D-LNA correspondiente, 2742. La especificidad también es notable, si se compara la actividad antisentido para 2754 a 20 nM (regulación negativa de 8,7 %) en comparación con el control que contiene desapareamiento 2756 (regulación negativa del 56,2 %).

Biodistribución

También se estudió la biodistribución de oligonucleótidos que contenían beta-D-amino-LNA (2754 tritiado), tanto después de la inyección i.v. como usando minibombas osmóticas Alzet.

Se administró 2754 a ratones con xenoinjertos con tumores 15PC3 en el lado izquierdo y tumores MiaPacall en el lado derecho como una inyección intravenosa, y el análisis se llevó a cabo después de 30 min en circulación. A partir de la figura 7, la eliminación de suero para 2754 es muy rápida, y la biodistribución parece muy similar al patrón de biodistribución presentado por la referencia que contiene beta-o-oxi-LNA; el riñón y el hígado (en un menor grado) son los principales sitios de captación, cuando se corrige con respecto a peso tisular.

Además, un grupo de 4 ratones desnudos con xenoinjertos de tumores 15PC3 en el lado izquierdo y tumores MiaPacall en el lado derecho se trataron durante 72 horas con minibombas osmóticas Alzet con una dosificación de 2,5 mg/kg/día de 2754 tritiado. Después del tratamiento, se midió la radiactividad presente en los diferentes tejidos. La Figura 8 muestra la distribución de 2754 en los tejidos como una captación total y como una captación específica. Parece que el tejido capta significativamente mejor amino-LNA que beta-D-oxi LNA. Los principales sitios de captación fueron hígado, músculo, riñón, piel, hueso y corazón. Cuando se corrige con respecto a peso tisular, el riñón, el corazón y el hígado (pulmones y músculo en menor grado) fueron los principales sitios de captación. Este patrón difiere en cierto grado del observado para beta-D-oxi-LNA. También es notable que la captación de amino-LNA es significativamente mejor en tejido tumoral que para por ejemplo beta-D-oxi LNA (véase Figura 7 y 8).

Ensayo de RNasa H

Rnasa H es una enzima celular ubicua que degrada específicamente la cadena de ARN de híbridos de ADN/ARN, y de este modo inactiva el ARNm hacia procesos metabólicos celulares adicionales. La potencia inhibitoria de algunos agentes antisentido parece correlacionarse con su capacidad para inducir degradación de ribonucleasa H (RNasaH) de la diana de ARN, que se considera un modo potente de acción de oligonucleótidos antisentido. Como tal, el entendimiento de los mecanismos de la función catalítica y el reconocimiento de sustrato para la RNasaH es crítico en el diseño de moléculas antisentido potenciales.

Fue el objetivo de los inventores evaluar la actividad RNasaH de gápmers que contienen beta-D-amino-LNA. A partir de la figura 9, se puede apreciar una buena actividad de escisión para un oligonucleótido que contiene beta-D-amino-LNA, como en la tabla 2.

5 *Beta-D-Tio-LNA*

Estabilidad de nucleasa

10 Como se hizo para beta-D-amino-LNA, también se evaluó beta-D-tio-LNA frente a una 3'-exonucleasa (SVPD). El oligonucleótido se sintetiza en soporte de desoxinucleósido (t). El estudio se llevó a cabo con oligotimidilatos bloqueando el extremo 3' con beta-D-tio-LNA.

15 A partir de la figura 10, se puede ver que la incorporación de solamente un monómero T de 2'-beta-D-tio-LNA (T^s) tiene un efecto significativo en la resistencia nucleolítica del oligonucleótido hacia SVPD. Después de 2 h de digestión, permanece más del 80 % del oligonucleótido, mientras que el oligonucleótido beta-D-oxi-LNA correspondiente se digiere por la exonucleasa, véase figura 10.

Captación celular no asistida

20 La eficacia de la captación de oligonucleótido marcado con FAM se midió como la intensidad de fluorescencia media de las células transfectadas mediante análisis FACS.

25 La transfección sin lípido mostró diferencias definidas entre los oligonucleótidos ensayados. La captación como se mide a partir de la intensidad de fluorescencia media de células transfectadas fue dependiente de la dosis.

30 Se analizaron gápmers (16nt de longitud y hueco de 7nt) que contenían beta-D-tio-LNA en los flancos y se compararon con los gápmers de beta-D-oxi-LNA correspondientes. Beta-D-tio-LNA (un flanco con beta-D-tio-LNA y el otro con oxi-LNA, como en la tabla 5) mostró mayor captación que los oligonucleótidos que contenían solo oxi-LNA. Los oligonucleótidos de beta-D-tio-LNA (ambos gápmers de todo PO y gápmers con hueco de PS y flancos de PO) tuvieron buena eficacia de captación. Específicamente, el gápmers de todo PO que contenía beta-D-tio-LNA era muy superior a otros oligonucleótidos de todo PO ensayados hasta la fecha, como puede apreciarse a partir de la figura 11.

35 Captación celular asistida y distribución subcelular

40 La eficacia de captación de oligonucleótido marcado con FAM que contenía beta-D-tio-LNA se midió como la intensidad de fluorescencia media de las células transfectadas mediante análisis de FACS. Se ensayaron dos agentes de transfección diferentes (Lipofectamine 2000 y DAC30) en dos líneas celulares diferentes (MiaPacall y 15PC3).

Tabla 4. Oligonucleótidos que contienen beta-D-tio-LNA usados en experimentos de captación celular y distribución subcelular. El resto c es metil-c tanto para ADN como para LNA.

ref	oligonucleótidos	DAC30		Lipofectamine 2000	
		% de células	% de captación	% de células	% de captación
2747	T ^s C ^s C ^s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C ^s C ^s T ^s c-FAM	-	-	100	100
2746	T ^s C ^s C ^s C ^s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C ^s SC ^s T ^s c-FAM	80	50	100	100
2740	T _s C _s C _s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C _s C _s T _s c-FAM	80	30	100	100

45 Se transfectaron con buena eficacia oligonucleótidos tanto completamente tiolados (PS, 2746) como parcialmente tiolados (PO en los flancos y PS en el hueco, 2747) que contenían beta-D-tio-LNA enumerado en la tabla 4, véase tabla 4. Ambos agentes de transfección, DAC30 y Lipofectamine, presentaron buena eficacia de transfección; sin embargo, Lipofectamine fue superior.

50 Lipofectamine mostró 100% de eficacia en todos los casos: para ambos oligonucleótidos (2746 y 2747) y en ambas líneas celulares. Además, no se observó ninguna diferencia significativa en la eficacia de transfección asistida entre 2746 y 2747.

55 El oligonucleótido marcado con FAM 2746 también se usó para ensayar la distribución subcelular de oligonucleótidos que contenían beta-D-tio-LNA, véase la figura 2. La mayor parte de la tinción se detectó como fluorescencia nuclear que aparecía como estructuras esféricas brillantes (también se tiñeron los nucleolos) en un fondo nucleoplasmático difuso, así como alguna tinción citoplasmática en estructuras punteadas brillantes. Los

patrones de distribución observados fueron similares para 15PC3 y MiaPacall.

La distribución subcelular de beta-D-tio-LNA fue comparable a la observada con beta-D-oxi-LNA, 2740.

5 La eficacia de captación también se midió con oligonucleótido marcado con tritio 2748 (véase tabla 6 y figura 3) a diferentes concentraciones 100, 200, 300 y 400 nM, usando Lipofectamine2000 como agente de transfección, en células tanto MiaPacall como 15PC3, y se comparó con el beta-D-oxi-LNA equivalente, 2742 (véase tabla 6). 2748 muestra captación superior a 2742.

10 Ensayo de actividad antisentido: diana de luciferasa

También se introdujo beta-D-tio-LNA en un diseño de gámpmero, y se evaluó con respecto a actividad antisentido.

15 Se prepararon los oligonucleótidos de la tabla 5. Se decidió llevar a cabo el estudio con gámpmeros de 16nt de longitud y un hueco de 7nt, que contenía 4 restos de beta-D-tio-LNA en un flanco y 4 restos de oxi-LNA en el otro flanco y un hueco tiolado.

20 Se mostró que el grupo de FAM no afectaba a la capacidad antisentido de los oligonucleótidos. Por lo tanto, se preparó un oligonucleótido marcado con FAM para ensayar tanto en el ensayo de luciferasa como en la captación celular (no asistido).

25 El oligonucleótido, que se dirige contra un motivo del ARNm de la luciferasa de luciérnaga, contiene dos desapareamientos en los flancos. Se sustituyeron dos T por dos restos C del flanco LNA del extremo 5' por razones sintéticas. En este momento, solamente estaban disponibles los restos T. Por lo tanto y para poder establecer una comparación correcta, también se incluyó en el ensayo el control de oxi-LNA correspondiente. No fue necesario ningún marcaje de FAM en este caso.

30 Tabla 5 Oligonucleótido que contiene beta-D-tio-LNA usado en el ensayo de actividad antisentido y el control de oxi-LNA correspondiente (mayúsculas para LNA y minúsculas para ADN, T^s es beta-D-tio-LNA). El resto c es metil-c para ambos LNA

ref	secuencia	diseño	tamaño
U-16	T ^s T ^s T ^s g _s t _s C _s a _s t _s C _s g _s TCTTT-FAM	Tio-LNA en un flanco/hueco de PS de 7	16mero
2023-m; 02579	TTTT g _a t _s C _a t _s C _s g _s TCTTT	Control con oxi-LNA	16mero

35 A partir de la figura 4, se puede ver que el oligonucleótido con beta-D-tio-LNA presenta buena actividad antisentido a una concentración de oligonucleótido de 50 nM. Por lo tanto, la inclusión de beta-D-tio-LNA en los flancos de un oligonucleótido da como resultado buena regulación negativa, y es al menos tan bueno como el gámpmero todo beta-D-oxi-LNA precursor.

Ensayo de actividad antisentido: diana de Ha-Ras

40 Fue de interés para los inventores evaluar adicionalmente la actividad antisentido de oligonucleótidos que contenían beta-D-tio-LNA en un diseño de gámpmero y compararlos con gámpmeros beta-D-oxi-LNA.

45 Se prepararon los oligonucleótidos de la tabla 6. Se decidió llevar a cabo el estudio con oligonucleótidos de 16nt de longitud y un hueco de 8nt, que contenían 3 restos de beta-D-tio-LNA en cada flanco y un grado diferente de tiolación. 2748 está completamente tiolado (PS), mientras que 2749 solamente está tiolado en el hueco (PO en los flancos y PS en el hueco). Los oligonucleótidos se diseñaron para dirigirse a un motivo del ARNm de Ha-Ras. También se incluyeron controles de desapareamiento diferentes, 2750 está completamente tiolado y 2751 presenta tiolación solamente en el hueco, véase tabla 6. Además, los gámpmeros beta-D-oxi-LNA correspondientes (véase tabla 6, 2742 es todo PS, 2744 es el control de desapareamiento correspondiente; 2743 tiene PS en el hueco, 2745 es el control de desapareamiento correspondiente) también fueron

50 Tabla 6. Oligonucleótidos que contienen beta-D-tio-LNA y beta-D-oxi-LNA usados en los experimentos de actividad antisentido. El resto c es metil-c tanto para ADN como para LNA.

ref	oligonucleótidos	
2749	T ^s C ^s C ^s g _s t _s C _s a _s t _s C _s g _s c _s t _s C ^s C ^s T ^s c	PO/PS
2748	T ^s _s C ^s _s C ^s _s C ^s _s g _s c _s g _s c _s t _s C ^s _s C ^s _s T ^s _s c	Todo PS
2743	TCCg _s t _s C _s a _s t _s C _s g _s c _s t _s CCTc	PO/PS

ref	oligonucleótidos	
2742	T _s C _s C _s G _s T _s C _s A _s T _s C _s G _s C _s T _s C _s T _s C	Todo PS
2751	T ^S C ^S T ^S G _s T _s A _s T _s A _s G _s C _s C _s C ^S C ^S C ^S c	Control de desapareamiento
2750	T ^S C ^S T ^S G _s T _s A _s T _s A _s G _s C _s C _s C ^S C ^S C ^S sc	Control de desapareamiento
2745	TCTG _s T _s A _s T _s A _s G _s C _s C _s CCCc	Control de desapareamiento
2744	T _s C _s T _s G _s T _s A _s T _s A _s G _s C _s C _s C _s C _s C _s c	Control de desapareamiento

La inclusión de beta-D-tio-LNA en los flancos de un oligonucleótido da como resultado buenos niveles de regulación negativa. A partir de la figura 5, se puede ver que los oligonucleótidos con beta-D-tio-LNA presentan buena actividad antisentido a dos concentraciones diferentes, 400 y 800 nM. No puede verse ninguna diferencia significativa en la regulación negativa entre oligonucleótidos 2749 y 2748, que presentan un grado diferente de tiolación. Sin embargo, 2749 presenta mejores niveles de regulación negativa, tanto a 400 como a 800 nM. Se puede concluir que la actividad antisentido de un oligonucleótido que contiene beta-D-tio-LNA está en el intervalo del gápmero beta-D-oxi-LNA precursor. A partir de la figura 6, se ensayó un mayor intervalo de concentración. Hay una regulación negativa potente entre 50 y 400 nM para 2748. También se ensayó la especificidad; a 30 nM hay una diferencia significativa en la regulación negativa entre el desapareamiento 2750 (menos potente) y la coincidencia 2748.

Biodistribución

También se estudió la biodistribución de oligonucleótidos que contenían beta-D-tio-LNA (2748 tritiado), tanto después de la inyección i.v. como usando minibombas osmóticas Alzet.

Se administró 2748 a ratones con xenoinjertos con tumores 15PC3 en el lado izquierdo y tumores MiaPacall en el lado derecho como una inyección intravenosa, y el análisis se llevó a cabo después de 30 minutos en circulación. A partir de la figura 7, la eliminación del suero para 2748 es muy rápida, y la biodistribución parece muy similar al patrón de biodistribución presentado por la referencia que contiene beta-D-oxi-LNA; el riñón y el hígado (en menor grado) son los principales sitios de captación, cuando se corrige con respecto a peso tisular.

Además, se trató un grupo de 4 ratones desnudos con xenoinjertos con tumores 15PC3 en el lado izquierdo y tumores MiaPacall en el lado derecho durante 72 horas con minibombas osmóticas Alzet con una dosificación de 2,5 mg/kg/día. Después del tratamiento, se midió la radiactividad presente en los diferentes tejidos. La figura 8 muestra la distribución de 2748 en los tejidos como una captación total y como una captación específica. Los sitios principales de captación fueron hígado, músculo, riñón, piel y hueso. Cuando se corrigió con respecto a peso corporal, el riñón y el hígado fueron los principales sitios de captación.

Ensayo de RNasaH

También se evaluaron diseños de gápmero que contenían beta-D-tio-LNA, como en la tabla 5, con respecto a su capacidad para reclutar actividad de RNasaH.

A partir de la figura 9, se puede ver que un gápmero beta-D-tio-LNA recluta actividad RNasaH.

Alfa-L-oxi LNA

Estabilidad de nucleasa

También se evaluaron las propiedades de estabilización de alfa-L-oxi-LNA. El estudio se llevó a cabo con oligotimidilatos bloqueando el extremo 3' con alfa-L-oxi-LNA. El oligonucleótido se sintetiza en soporte de desoxinucleósido (t). A partir de la figura 12, se puede ver que la introducción de solamente un alfa-LT (T^o) en el extremo 3' del oligonucleótido representa ya un aumento del 40 % de la estabilidad (después de 2 h de digestión) con respecto a la versión oxi, para la que no hubo de hecho ningún aumento. La adición de dos modificaciones contribuye aún más a la estabilidad del oligonucleótido.

Además, se investigó el efecto en la estabilidad frente a endonucleasa S1 de alfa-L-oxi-LNA para oligotimidilatos completamente modificados de 16 unidades. La estabilidad aumentada de estos oligonucleótidos modificados en relación con sus parientes de cadena principal de desoxinucleótido y fosforotioato se comparó para evaluar cuidadosamente la contribución de la modificación de alfa-L-oxi-LNA.

Después de 2 h de digestión, la mayoría del oligonucleótido alfa-L-oxi-LNA permaneció (permaneció más del 80 % del producto de longitud completa), mientras que ni el oligodesoxinucleótido ni el análogo de fosforotioato de ADN

5 pudieron detectarse después de 30 minutos de digestión (véase figura 13). Se llevó a cabo el mismo estudio cinético frente a endonucleasa S1 con un oligonucleótido oxi-LNA completamente modificado, que también era muy resistente contra la endonucleasa S1. Permaneció más de un 85 % del producto de longitud completa después de 2 h de digestión (véase figura 13).

En conclusión, beta-D-oxi-LNA, beta-D-amino-LNA, beta-D-tio-LNA y alfa-L-oxi-LNA estabilizan oligonucleótidos contra nucleasas. Puede establecerse un orden de eficacia en la estabilización: fosforotioatos de ADN << oxi-LNA < alpha-L-oxi-LNA < beta-D-amino-LNA < beta-D-tio-LNA.

10 Captación celular no asistida

15 La eficacia de la captación de oligonucleótidos marcados con FAM se midió como la intensidad de fluorescencia media de las células transfectadas mediante análisis de FACS. La captación como se mide a partir de la intensidad de fluorescencia media de células transfectadas dependió de la dosis. Los gápmers (16nt de longitud y hueco de 7nt) que contenían alpha-L-oxi-LNA en los flancos se analizaron y se compararon con el gápmero beta-D-oxi-LNA correspondiente. alpha-L-oxi-LNA (en ambos flancos) mostró mayor captación que el oligonucleótido que contenía solamente beta-D-oxi-LNA. Tanto el todo PO como el gápmero con hueco de PS tuvieron buena eficacia de captación; especialmente el gápmero con todo PO fue muy superior a otros oligonucleótidos de todo PO ensayados hasta la fecha, véase figura 14 para análisis de FACS.

20 Captación celular asistida y distribución subcelular

25 La eficacia de captación de oligonucleótidos marcados con FAM que contenían alfa-L-oxi-LNA se midió como la intensidad de fluorescencia media de las células transfectadas mediante análisis de FACS. Se ensayaron dos agentes de transfección diferentes (Lipofectamine 2000 y DAC30) en dos líneas celulares de cáncer diferentes (MiaPacall y 15PC3).

Tabla 7. Oligonucleótidos que contienen alfa-L-oxi-LNA usados en experimentos de captación celular y distribución subcelular. El resto c es metil-c tanto para ADN como para LNA

ref	oligonucleótidos	DAC30		Lipofectamine 2000	
		% de células	% de captación	% de células	% de captación
2773	T ^a C ^a C ^a g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C ^a C ^a T ^a c-FAM	-	-	100	100
2774	T ^a _s C ^a _s C ^a _s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C ^a _s C ^a _s T ^a _s c-FAM	80	30	100	100
2740	T _s C _s C _s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C _s C _s T _s c-FAM	80	30	100	100

30 Se transfectaron con buena eficacia oligonucleótidos tanto completamente tiolados (PS, 2774) como parcialmente tiolados (PO en los flancos y PS en el hueco, 2773) que contenían alfa-L-oxi-LNA enumerados en la tabla 7, véase tabla 7. Ambos agentes de transfección, DAC30 y Lipofectamine, presentaron buena eficacia de transfección; sin embargo, Lipofectamine fue superior. Lipofectamine mostró 100% de eficacia en todos los casos: para ambos oligonucleótidos (2773 y 2774) y en ambas líneas celulares. Además, no se observaron diferencias significativas en la eficacia de transfección asistida entre 2773 y 2774.

35 El oligonucleótido marcado con FAM 2774 también se usó para ensayar la distribución subcelular de oligonucleótidos que contenían alfa-L-oxi-LNA, véase figura 2. La mayor parte de la tinción se detectó como fluorescencia nuclear que aparecía como estructuras esféricas brillantes (también se tiñen los nucleolos) en un fondo nucleoplasmático difuso, así como algo de tinción citoplasmática en estructuras punteadas brillantes. Los patrones de distribución observados fueron similares para 15PC3 y MiaPacall.

40 La distribución subcelular de alfa-L-oxi-LNA fue comparable a la observada con beta-D-oxi-LNA, 2740.

45 Actividad antisentido: diana de luciferasa

Gápmers que contienen alfa-L-oxi-LNA

50 También se quería observar la actividad antisentido en oligonucleótidos gápmero que contenían alfa-L-oxi-LNA (16nt de longitud con un hueco de 7nt tiolado). Se evaluaron dos diseños diferentes.

En primer lugar, se sustituyeron dos alfa-L-oxi-LNA por restos de oxi-LNA en un gápmero frente a un motivo del ARNm de la luciferasa de luciérnaga, y se colocó el alfa-L-oxi-LNA en los puntos de unión, véase figura 15.

55 Después, se sustituyeron ambos flancos con alfa-L-oxi-LNA en la misma construcción, véase figura 15.

Previamente, se ensayaron diferentes oligonucleótidos y se compararon con las moléculas marcadas con FAM correspondientes, y no se apreció diferencia significativa entre las libres y las marcadas con FAM. Por lo tanto, se incluyeron oligonucleótidos del Ensayo de Captación Celular No Asistido en el estudio de ensayo de Luciferasa, suponiendo que la actividad antisentido no se vería afectada por la presencia del grupo de FAM.

A partir de la figura 16, el oligonucleótido con alfa-L-oxi-LNA en los puntos de unión muestra potente actividad antisentido. Es de hecho 5 veces mejor que la del gápmero todo oxi-LNA correspondiente (hueco de 7nt), y ligeramente mejor que un gápmero con un hueco de 9nt optimizado con oxi-LNA. El segundo diseño (todo alfa-L-oxi-LNA en ambos flancos) presenta al menos niveles de regulación negativa tan buenos como el observado para gápmeros beta-D-oxi-LNA. También se puede concluir que la presencia del alfa-L-oxi-LNA en una construcción de gápmero muestra buen nivel de actividad antisentido.

Se ha revelado que alfa-L-oxi-LNA es una herramienta potente que permite la construcción de diferentes gápmeros, que muestran buena actividad antisentido. La colocación de alfa-L-oxi-LNA en los puntos de unión da como resultado un oligonucleótido muy potente.

Los gápmeros de tamaño corto que contienen alfa-L-oxi-LNA

Como regla general, la longitud de la construcción se diseña habitualmente para variar de 15 a 25 unidades de nucleótidos, para asegurar que tiene lugar identificación óptima y unión con una secuencia única en el genoma de mamífero y no con elementos similares genéticamente redundantes. Los análisis estadísticos especifican secuencias de 11-15 pares de bases humanas como los límites inferiores teóricos para suficiente reconocimiento de una única región genómica. En la práctica, sin embargo, se usa habitualmente un oligonucleótido más largo para compensar las transiciones de baja fusión, especialmente para oligonucleótidos tiolados que tienen menor afinidad.

Como se consigue un aumento significativo de la afinidad mediante la introducción de oxi-LNA o nuevos parientes de LNA, debería permitirse el diseño de oligonucleótidos antisentido cortos y potentes (<15nt).

El alfa-L-oxi-LNA puede desempeñar un papel importante en permitir el diseño de moléculas cortas manteniendo la alta afinidad requerida, pero también un tamaño de hueco óptimo. Se evaluaron 12 y 14meros frente a un motivo del ARNm de la luciferasa de luciérnaga.

Los resultados se muestran en la figura 16. La presencia de alfa-L-oxi-LNA en los flancos de un 12 (hueco de 7nt) y 14mero (hueco de 8nt) corresponde a buenos niveles de regulación negativa. A partir de la figura 16.

En conclusión, alfa-L-oxi-LNA es una herramienta potente para permitir el diseño de oligonucleótidos antisentido cortos con niveles de regulación negativa significativos.

Mixmeros que contienen alfa-L-oxi-LNA

También se consideraron otros diseños que contenían alfa-L-oxi-LNA frente a un motivo del ARNm de la luciferasa de luciérnaga, que se denominaron mixmeros. Consisten en una composición alternativa de ADN, alfa-L-oxi-LNA y beta-D-oxi-LNA. La siguiente figura ilustra los diseños elegidos. Se denominaron los mixmeros por el número alterno de unidades de cada alfa-L-oxi-LNA, beta-D-oxi-LNA o composición de ADN. Véase figura 17 y tabla 8 para los diferentes diseños.

Tabla 8. Mixmeros que contienen alfa-L-oxi-LNA usados en este estudio (mayúsculas para LNA y minúsculas para ADN, T° es alfa-L-oxi-LNA). El resto c es metil-c para ambos LNA.

ref	secuencia	míxmero
2023-q	TTCCg _s T ^a _s c _s a _s t _s c _s g _s T ^a _s c _s TTT	4-1-1-5-1-1-3 a
2023-r	T ^a T ^a C ^a C ^a g _s T ^a _s c _s a _s t _s c _s g _s T ^a _s c _s T ^a T	4-1-1-5-1-1-3 b
2023-t	TTCCg _s t _s c _s A ^a _s t _s c _s g _s TCTTT	4-3-1-3-5 a
2023-u	TTCC ^a _s t _s c _s A ^a _s t _s c _s g _s T ^a CTTT	4-3-1-3-5 b

En el diseño 4-1-1-5-1-1-3 (figura 17, tabla 8), se colocaron dos restos de alfa-L-oxi-LNA que interrumpían el hueco, siendo los flancos beta-D-oxi-LNA. Además, se interrumpió el hueco con dos restos de alfa-L-oxi-LNA, y se sustituyeron ambos flancos con alfa-L-oxi-LNA. La presencia de alfa-L-oxi-LNA podría introducir una transición flexible entre los flancos bloqueados con Norte (oxi-LNA) y el resto de alfa-L-oxi-LNA añadiendo restos de desoxinucleótidos.

También es interesante estudiar el diseño 4-3-1-3-5 (figura 17, tabla 8), en el que un resto de alfa-L-oxi-LNA interrumpe el tramo de ADN. Además del alfa-L-oxi-LNA en el hueco, también se sustituyeron dos restos de oxi-LNA

en los extremos de los flancos con dos restos de alfa-L-oxi-LNA.

La presencia de solamente un resto de beta-D-oxi-LNA (diseño 4-3-1-3-5) que interrumpe el tramo de ADN en el hueco da como resultado una pérdida dramática de regulación negativa. Solamente usando alfa-L-oxi-LNA en su lugar, el diseño muestra regulación negativa significativa a una concentración de oligonucleótidos de 50 nM, véase figura 16. La colocación de alfa-L-oxi-LNA en los puntos de unión y un alfa-L-oxi-LNA en el medio del hueco también muestra regulación negativa, véase figura 16.

La interrupción del hueco con dos beta-D-oxi-LNA (diseño 4-1-1-5-1-1-3) también está relacionada con una pérdida de la actividad antisentido. De nuevo la sustitución completa de alfa-L-oxi-LNA por beta-D-oxi-LNA proporciona actividad antisentido significativa, véase figura 916.

Se ha revelado que alfa-L-oxi-LNA es una herramienta potente que permite la construcción de diferentes mixmeros, que pueden presentar altos niveles de actividad antisentido.

Otros diseños

Se estudiaron otros mixmeros que contenían alfa-L-oxi-LNA, véase figura 18. Además, también se ensayaron mixmeros, tales como en la tabla 8 y figura 17, pero sin tiolación.

Ensayo de actividad antisentido: diana de Ha-Ras

Fue de interés para los inventores evaluar adicionalmente la actividad antisentido de oligonucleótidos que contenían alfa-L-oxi-LNA en un diseño de gápmo, y compararlos con gápmos beta-D-oxi-LNA.

Se prepararon los oligonucleótidos de la tabla 9. Se decidió llevar a cabo el estudio con oligonucleótidos de 16nt de longitud y hueco de 8nt, que contenían 3 restos de alfa-L-oxi-LNA en cada flanco y un grado diferente de tiolación. 2776 está completamente tiolado (PS), mientras que 2775 solamente está tiolado en el hueco (PO en los flancos y PS en el hueco). Los oligonucleótidos se diseñaron para dirigirse a un motivo del ARNm de Ha-Ras. También se incluyeron diferentes controles de desapareamiento, 2778 está completamente tiolado y 2777 presenta tiolación solamente en el hueco, véase tabla 9. Además, también se ensayaron los gápmos de beta-D-oxi-LNA correspondientes (véase tabla 9, 2742 es todo PS, 2744 es el control de desapareamiento correspondiente; 2743 tiene PS en el hueco, 2745 es el control de desapareamiento correspondiente).

Tabla 9. Oligonucleótidos que contienen alfa-L-oxi-LNA y beta-D-oxi-LNA usados en los experimentos de actividad antisentido. El resto c es metil-c tanto para ADN como para LNA

ref	oligonucleótidos	
2775	T ^a C ^a C ^a g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C ^a C ^a T ^a c	PO/PS
2776	T ^a _s C ^a _s C ^a _s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C ^a _s C ^a _s T ^a _s c	Todo PS
2743	TCCg _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s CC7c	PO/PS
2742	T _s C _s C _s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C _s C _s T _s c	todo PS
2777	T ^a C ^a T ^a g _s t _s a _s t _s a _s g _s c _s C ^a C ^a C ^a c	Control de desapareamiento
2778	T ^a _s C ^a _s T ^a _s g _s t _s a _s t _s a _s g _s c _s C ^a _s C ^a _s C ^a _s c	Control de desapareamiento
2745	TCTg _s t _s a _s t _s a _s g _s c _s CCCC	Control de desapareamiento
2744	T _s C _s T _s g _s t _s a _s t _s a _s g _s C _s C _s C _s C _s c	Control de desapareamiento

La inclusión de alfa-L-oxi-LNA en los flancos de un oligonucleótido da como resultado buenos niveles de regulación negativa. A partir de la figura 6, se puede ver que el oligonucleótido 2776 con alfa-L-oxi-LNA presenta buena actividad antisentido a una serie de concentraciones diferente, 50 nM-400 nM. No puede verse ninguna diferencia significativa en la regulación negativa entre 2776 y 2742. Se puede concluir que la actividad antisentido de un oligonucleótido que contiene alfa-L-oxi-LNA es al menos tan buena como el gápmo beta-D-oxi-LNA precursor. También se ensayó la especificidad; a 30 nM hay una diferencia significativa en la regulación negativa entre el desapareamiento 2778 (menos potente) y la coincidencia 2776. También se incluyeron concentraciones menores (5-40 nM) de la tabla en la figura 6. Se observa regulación negativa potente incluso a 5 nM para 2776 en comparación con el control de beta-D-oxi-LNA correspondiente, 2742. También es notable la especificidad, si se compara la actividad antisentido para 2776 a 20 nM (regulación negativa de 2,6 %) en comparación con el control que contiene desapareamientos 2778 (regulación negativa del 77 %).

Ensayo de RNasaH

También se evaluaron diseños de gápmers que contenían alfa-L-oxi-LNA con respecto a su capacidad para reclutar actividad RNasaH.

5 Los diseños de gápmero y míxmero de alfa-L-oxi-LNA reclutan actividad RNasaH, véase figura 19.

Experimento *in vivo*

10 Se inyectaron en ratones desnudos s.c. células MiaPaca II (flanco derecho) y células 15PC3 (flanco izquierdo) una semana antes del inicio del tratamiento con oligonucleótidos para permitir el crecimiento del xenoinjerto. Los oligonucleótidos anti-Ha-Ras (2742 y 2776, tabla 10) y oligonucleótidos de control (2744 y 2778, tabla 10) se administraron durante 14 días usando minibombas osmóticas Alzet (modelo 1002) implantadas dorsalmente. Se usaron dos dosificaciones: 1 y 2,5 mg/kg/día. Durante el tratamiento se supervisó el crecimiento tumoral. El crecimiento tumoral se inhibió casi completamente a 2,5 mg/kg/día e incluso a 1 mg/kg/día de dosis con 2742 y 2776 en células 15PC3, figura 20. La especificidad con oligonucleótidos de control (2744 y 2778, que contenían desapareamientos) aumentó a medida que se reducía la dosis. A una dosis de 1 mg/kg/día el experimento presentó una buena especificidad, particularmente para oligonucleótidos alfa-L-oxi-LNA (2742 y 2744). En tumores de xenoinjerto de MiaPacall, el efecto de los oligonucleótidos es en general comparable a los de los xenoinjertos de 15PC3, excepto por el hecho de que la especificidad parecía ser un poco menor. Puede concluirse que el oligonucleótido que contiene alfa-L-oxi-LNA es tan potente, o quizás incluso mejor, que el que contiene beta-D-oxi-LNA en la inhibición de crecimiento tumoral en el intervalo de concentraciones ensayado.

25 Tabla 10. Oligonucleótidos que contienen alfa-L-oxi-LNA y beta-D-oxi-LNA usados en el experimento *in vivo*. El resto c es metil-c tanto para ADN como para LNA.

ref	oligonucleótidos	
2776	T ^a _s C ^a _s C ^a _s G ^a _s T ^a _s C ^a _s A ^a _s T ^a _s C ^a _s G ^a _s C ^a _s T ^a _s C ^a _s C ^a _s T ^a _s C	Coincidencia
2778	T ^a _s C ^a _s T ^a _s G ^a _s T ^a _s A ^a _s A ^a _s T ^a _s A ^a _s G ^a _s C	Control de desapareamiento
2742	T _s C _s C _s G _s T _s C _s A _s T _s C _s G _s C _s T _s C _s T _s C	Coincidencia
2744	T _s C _s T _s G _s T _s A _s A _s T _s A _s G _s C _s C _s C _s C _s C	Control de desapareamiento

Niveles de toxicidad

30 Se determinaron los niveles de aspartato aminotransferasa (ASAT), alanina aminotransferasa (ALAT) y fosfatasa alcalina en el suero, para estudiar los posibles efectos de este tratamiento de 14 días en los ratones desnudos. Se tomaron muestras de suero de cada ratón después del experimento de 14 días. A partir de la figura 21, los niveles de ALAT en el suero variaron entre 250-500 U/L. Los niveles de ASAT estaban en el intervalo de 80-150 U/L. Los ratones no parecían externamente estar enfermos, y no se observó ningún gran cambio en el comportamiento. Durante el tratamiento la temperatura corporal de los ratones también se supervisó (figura 22). La temperatura corporal no cambió significativamente durante el tratamiento, ni incluso a una dosis alta de 2,5 mg/kg/día, lo que es un indicio de que no se están produciendo efectos de toxicidad importantes. En algunos casos, la temperatura corporal de los ratones fue un poco más alta, dividida en dos grupos. Estos efectos no pueden explicarse por el hecho de que un oligonucleótido se comporte de forma diferente o una dosificación sea demasiado alta.

40 Construcciones de beta-D-oxi-LNA específicas

Diana de luciferasa: ensayo de actividad antisentido

45 El diseño 3-9-3-1 tiene un resto de desoxinucleósido en el extremo 3', véase la tabla 11 y figura 23. Muestra niveles significativos de regulación negativa, en el mismo intervalo que un gápmero completamente tiolado optimizado (de 9nt). Además, solamente es necesaria tiolación parcial para que estos míxmeros actúen también como el gápmero completamente tiolado, véase figura 24.

50 Tabla 11 Construcciones de beta-D-oxi-LNA especiales (mayúsculas para LNA y minúsculas para ADN). El resto c es metil-c para LNA.

ref	secuencia	míxmero
2023-l; 02574	TTCC _s G _s T _s C _s A _s T _s C _s G _s T _s CTTt	3-9-3-1
2023-k; 02575	TTCC _s G _s T _s C _s A _s T _s C _s G _s T _s CTT _s t	3-9-3-1

ref	secuencia	míxmero
2023-j; 02576	T _s T _s C _s C _s G _s T _s C _s A _s T _s C _s G _s T _s C _s T _s T _s t	3-9-3-1

Otros oligonucleótidos que contienen nuevos monómeros de LNA (beta-D-amino-, beta-D-tio- y alfa-L-LNA) y que portan un resto de desoxinucleósido en el extremo 3' se ensayaron en diferentes ensayos, véase tablas 3, 6, 9 y 10 para más detalle.

5 Realizaciones

4. Una composición farmacéutica que comprende una construcción oligonucleotídica que contiene tres secuencias de nucleótidos localizadas de forma adyacente, A, B y C, en el siguiente orden (5' a 3'):

10 A-B-C o C-B-A,

en la que

15 A representa una secuencia que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizados consecutivamente, al menos una de las cuales es una unidad alfa-L-oxi-LNA, y cuya secuencia contiene opcionalmente una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos no bloqueados (tales como unidades de desoxirribonucleótido, unidades de ribonucleótido o derivados de las mismas) y/u opcionalmente contiene una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos bloqueados, tal como una unidad seleccionada del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, amino-LNA (todas en configuración alfa-L o beta-D) y derivados de las mismas;

20 B representa una secuencia de 6-10 nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo localizados consecutivamente, en la que uno o más de dichos nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo se reemplazan con alfa-L-oxi-LNA;

25 C representa una secuencia que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, al menos una de las cuales es una unidad de alfa-L-oxi-LNA, y cuya secuencia contiene opcionalmente una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos no bloqueados (tales como unidades de desoxirribonucleótidos, unidades de ribonucleótidos o derivados de las mismas) y/u opcionalmente contiene una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos bloqueados tales como una unidad seleccionada del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, amino-LNA (todas en configuración alfa-L o beta-D) y derivados de las mismas.

35 5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 4, en la que B representa una secuencia de unidades de nucleótidos que componen la construcción capaz de reclutar RNasa H cuando se hibrida con un ácido nucleico diana.

40 6. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 4 o 5, en la que los enlaces entre las unidades de nucleótidos en la construcción oligonucleotídica se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -O-PO(R^N)-O-, -O-PO(CH₃)-O- y -O-PO(NHR^N)-O-, donde R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆ y R^N se selecciona de alquilo C₁₋₆ y fenilo.

45 7. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 4-6, en la que los enlaces entre los nucleótidos en la secuencia B en la construcción oligonucleotídica comprenden al menos un enlace que no es un enlace -OP(O)₂-O-, tal como un enlace de fosforotioato.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 4-7, que comprende además un vehículo farmacéutico.

50 9. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 4-8, que comprende además otros compuestos antisentido, compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios y/o compuestos antivirales.

55 22. Una construcción oligonucleotídica que contiene tres secuencias de nucleótidos localizadas de forma adyacente, A, B y C, en el siguiente orden (5' a 3'):

A-B-C o C-B-A,

en la que

60 A representa una secuencia que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, al menos una de las cuales es una unidad alfa-L-oxi-LNA, y cuya secuencia contiene

- 5 opcionalmente una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos no bloqueados (tales como unidades de desoxirribonucleótido, unidades de ribonucleótido o derivados de las mismas) y/u opcionalmente contiene una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos bloqueados, tal como una unidad seleccionada del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, amino-LNA (todas en configuración alfa-L o beta-D) y derivados de las mismas;
- 10 B representa una secuencia de 6-10 nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo localizados consecutivamente, en la que uno o más de dichos nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo se reemplazan con alfa-L-oxi-LNA;
- 15 C representa una secuencia que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizadas consecutivamente, al menos una de las cuales es una unidad de alfa-L-oxi-LNA, y cuya secuencia contiene opcionalmente una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos no bloqueados (tales como unidades de desoxirribonucleótidos, unidades de ribonucleótidos o derivados de las mismas) y/u opcionalmente contiene una o más (tal como 2, 3, 4 o 5) unidades de nucleótidos bloqueados, tales como una unidad seleccionada del grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA, amino-LNA (todas en configuración alfa o beta) y derivados de las mismas.
- 20 23. Una construcción de acuerdo con la realización 22, en la que las tres secuencias de nucleótidos localizadas de forma adyacente están en el siguiente orden (5' a 3'):
- A-B-C.
- 25 24. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 22-23, que tiene la fórmula (en orden 5' a 3'):
- A-B-C, en la que
- 30 A, B y C tienen el mismo significado que se define en cualquiera de las realizaciones 22-23, y en la que A tiene una longitud de 2 - 6 unidades de nucleótidos;
B tiene una longitud de 6-12 unidades de nucleótidos;
C tiene una longitud de 2-6 unidades de nucleótidos; y la longitud general de la construcción es de 8-30 (preferentemente 10-20) unidades de nucleótidos.
- 35 25. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 22-24, en la que A representa una secuencia de unidades de nucleótidos que comprende al menos tres unidades de nucleótidos bloqueados localizadas de forma consecutiva, seleccionándose al menos una de dichas unidades de nucleótidos bloqueados del grupo que consiste en alfa-L-oxi-LNA y derivados de los mismos.
- 40 26. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 22-25, en la que C representa una secuencia de unidades de nucleótidos que comprende al menos tres unidades de nucleótidos bloqueados localizadas de forma consecutiva, seleccionándose al menos una de dichas unidades de nucleótidos bloqueados del grupo que consiste en alfa-L-oxi-LNA y derivados de los mismos.
- 45 28. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 22-26, en la que los enlaces internucleosídicos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-O-P(O)_2-O-$, $-O-P(O,S)-O-$, $-O-P(S)_2-O-$, $-NR^H-P(O)_2-O-$, $-O-P(O,NR^H)-O-$, $-O-PO(R'')-O-$, $-O-PO(CH_3)-O-$ y $-O-PO(NHR^H)-O-$, en la que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C_{1-6} y R'' se selecciona de alquilo C_{1-6} y fenilo.
- 50 29. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 22-28, en la que B comprende al menos un enlace internucleotídico que no es un enlace $-O-P(O)_2-O-$, tal como un enlace fosforotioato.
- 55 30. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 22-29, en la que B comprende un nucleótido alfa-L-oxi-LNA.
- 60 31. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 22-30, en la que A y C comprende al menos una unidad alfa-L-oxi-LNA o alfa-L-tio-LNA localizada adyacente a B.
- 60 32. Un oligonucleótido que tiene la fórmula (en orden de 5' a 3'):
- A-B-C-D, en la que
- 65 A representa una secuencia de unidades de nucleótidos bloqueados;
B representa una secuencia de unidades de nucleótidos no bloqueados, preferentemente al menos una unidad tiene un resto de azúcar 2'-desoxi pentofuranosa, en cuya secuencia 1 o 2 unidades de nucleótidos son nucleótidos alfa-L-oxi-LNA sustituidos;

C representa una secuencia de unidades de nucleótidos bloqueados; y
 D representa una unidad de nucleótido no bloqueado o una secuencia de unidades de nucleótidos no bloqueados.

5 33. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32, que tiene la fórmula (en el orden 5' a 3'):

A-B-C-D, en la que

10 A, B y C tienen el mismo significado que se ha definido en la realización 32, y en la que

A tiene una longitud de 2-6 (preferentemente 3-5) unidades de nucleótidos;
 B tiene una longitud de 4-12 (preferentemente 6-10) unidades de nucleótidos;
 C tiene una longitud de 1-5 (preferentemente 2-4) unidades de nucleótidos;
 15 D tiene una longitud de 1-3 (preferentemente 1-2) unidades de nucleótidos; y la longitud general de la construcción es de 8-26 (preferentemente 12-21) unidades de nucleótidos.

34. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32-33, en la que

20 A tiene una longitud de 4 unidades de nucleótidos;
 B tiene una longitud de 7-9, preferentemente 8, unidades de nucleótidos;
 C tiene una longitud de 3 unidades de nucleótidos;
 D tiene una longitud de 1 unidad de nucleótido; y la longitud general de la construcción es de 15-17 (preferentemente 16) unidades de nucleótidos.

25 35. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32-34, en la que las unidades de nucleótidos bloqueados en A y C son unidades beta-D-oxi-LNA.

30 36. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32-35, en la que los enlaces internucleosídicos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -O-PO(Rⁿ)-O-, -O-PO(CH₃)-O- y -O-PO(NHR^N)-O-, en la que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆ y Rⁿ se selecciona de alquilo C₁₋₆ y fenilo.

35 37. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32-36, en la que B comprende al menos un enlace internucleotídico que no es un enlace -O-P(O)₂-O-, tal como un enlace fosforotioato.

38. Una construcción oligonucleotídica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32-37, en la que

40 B representa una secuencia de unidades de nucleótidos que hacen a la construcción capaz de reclutar RNasa H cuando se hibrida con un ácido nucleico diana.

39. Una construcción oligonucleotídica que comprende al menos una unidad de nucleótido bloqueado seleccionada del grupo que consiste en amino-LNA, tio-LNA (ambos en configuración bien alfa-L o bien beta-D), alfa-L-oxi-LNA y derivados de los mismos;

45 en la que al menos uno de los enlaces entre las unidades de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -O-PO(Rⁿ)-O-, -O-PO(CH₃)-O- y -O-PO(NHR^N)-O-, en el que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆ y Rⁿ se selecciona de alquilo C₁₋₆ y fenilo.

50 40. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 39, que comprende al menos un enlace internucleosídico de fosforotioato.

41. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 39-40, que comprende una subsecuencia de unidades de nucleótidos, teniendo dichas unidades de nucleótidos restos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo.

55 42. Un método de síntesis de una composición farmacéutica o construcciones de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-42.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido gápmero antisentido que es capaz de reclutar RNAsaH cuando se hibrida con un ácido nucleico de ARN diana, en el que dicho oligonucleótido gápmero se basa en un tramo central de 6-12 nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo (hueco) flanqueado por 1-6 restos de nucleótidos 2'-O modificados (flancos), en el que 1 - 4 de dichos nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo se reemplazan con alfa-L-oxi-LNA.
- 10 2. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los nucleótidos 2'-O modificados son unidades de nucleótidos bloqueados.
3. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los nucleótidos 2'-O modificados en los flancos son unidades de nucleótidos beta-D-oxi LNA.
- 15 4. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1-3, que comprende tres secuencias de nucleótidos localizadas de forma adyacente A-B-C en el siguiente orden (de 5' a 3'): A-B-C o C-B-A, en el que:
- A representa una secuencia de 2-5 unidades de nucleótidos que comprende al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados;
- 20 B representa una secuencia de 6-10 nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo localizados consecutivamente, en la que uno o más de dichos nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo se reemplazan con alfa-L-oxi LNA;
- C representa una secuencia de 2-5 unidades de nucleótidos que comprenden al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados, y en la que
- 25 ambas regiones A y C comprenden al menos dos unidades de nucleótidos bloqueados localizadas de forma consecutiva en las que al menos una es alfa-L-oxi-LNA.
5. El oligonucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 2-4, en el que una o más unidades de nucleótidos bloqueados son un beta-D-oxi-LNA.
- 30 6. El oligonucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 2-4, en el que una o más unidades de nucleótidos bloqueados son un alfa-L-oxi-LNA.
7. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que solamente uno o dos de dichos nucleótidos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo en el hueco o en la región B se reemplazan con alfa-L-oxi LNA.
- 35 8. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que más de tres nucleótidos localizados consecutivamente que tienen restos de azúcar 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo están presentes en el hueco.
- 40 9. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que las regiones A y/o C tienen una longitud de 2, 3, 4 o 5 unidades de nucleótidos bloqueados.
10. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en el que la región B tiene una longitud de 7, 8, 9 o 10 unidades de nucleótidos.
- 45 11. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que al menos uno de los enlaces entre las unidades de nucleótidos son enlaces de fosforotioato (-O-P(O,S)-O-).
- 50 12. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el oligonucleótido tiene el diseño mostrado en la figura 17.
13. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es de 11-15 nucleótidos de longitud.
- 55 14. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es de 12 nucleótidos de longitud.
15. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es de 14 nucleótidos de longitud.
- 60 16. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso como un producto terapéutico.

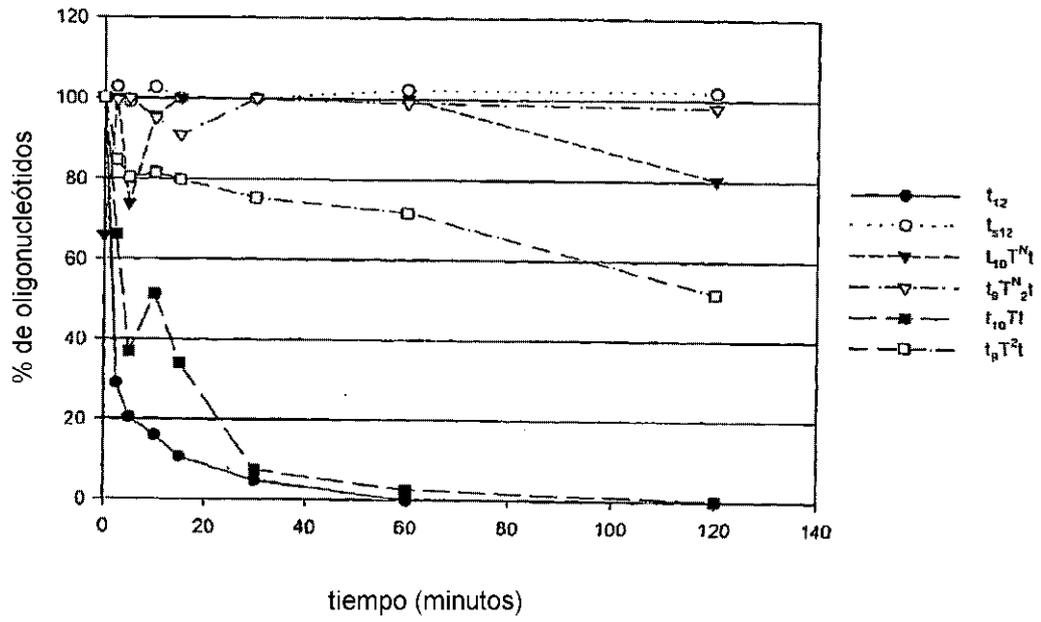


Fig. 1

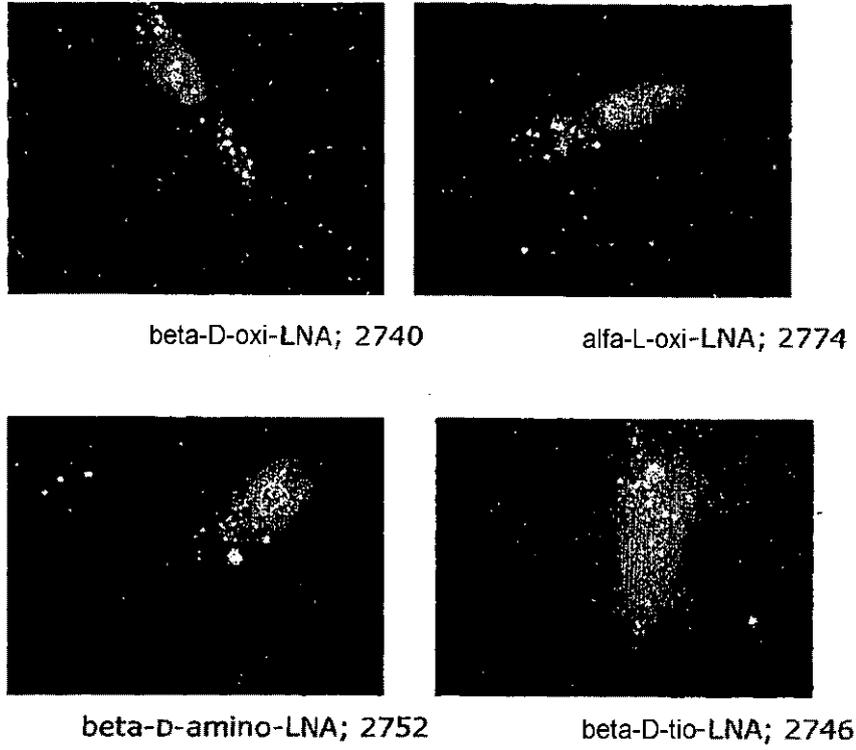


Fig 2

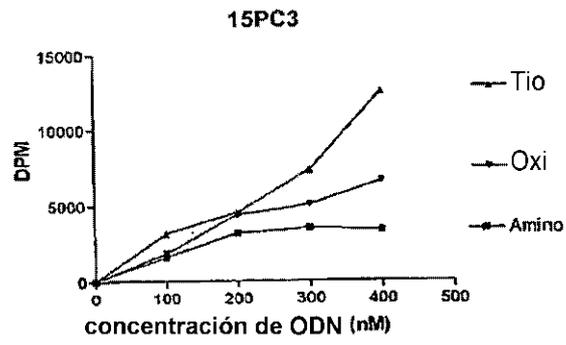
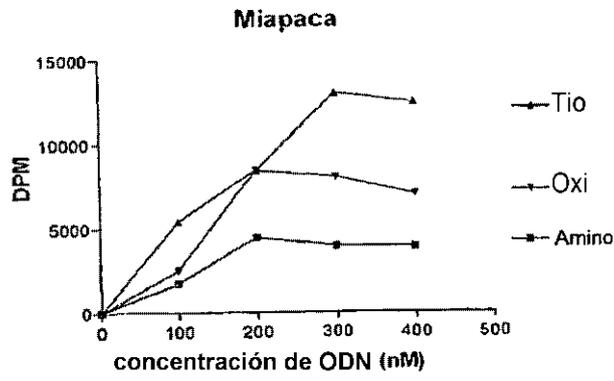


Fig. 3

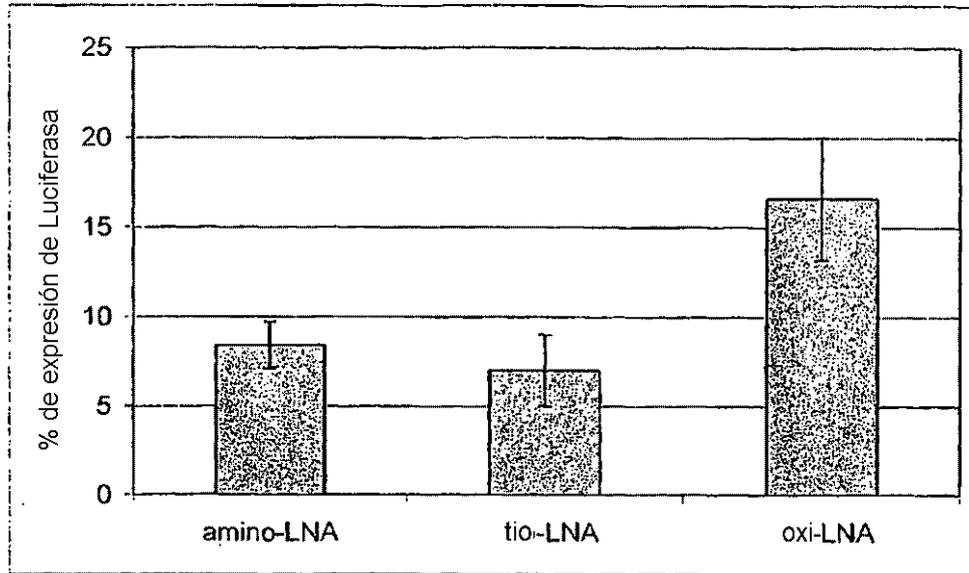
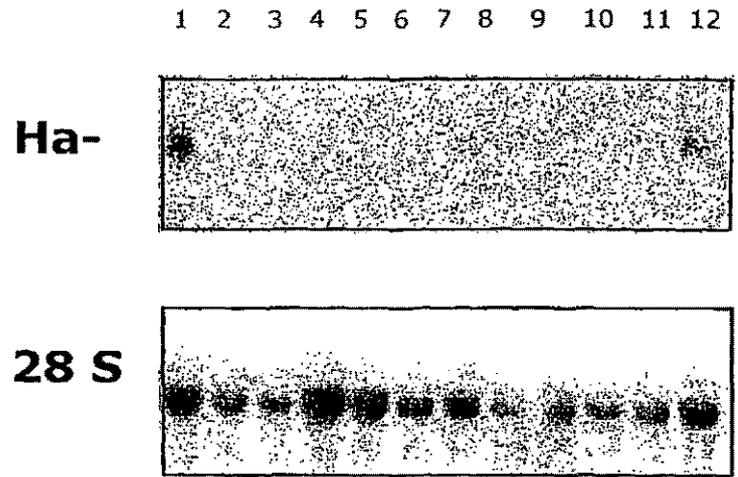


Fig. 4



1= transfección de control de simulación
2=400nM 2754
3=800nM 2754
4=400nM 2755
5=800nM 2755
6=400nM 2748
7=800nM 2748
8=400nM 2749
9=800nM 2749
10=400nM 2742
11=800nM 2742
12= transfección de control de simulación

Fig 5A

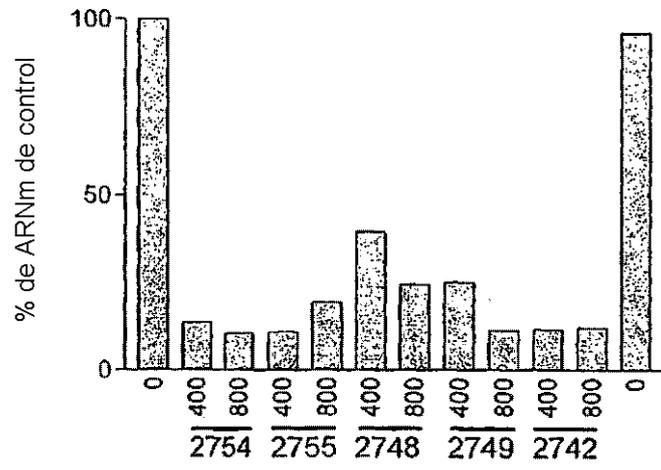


Fig 5B

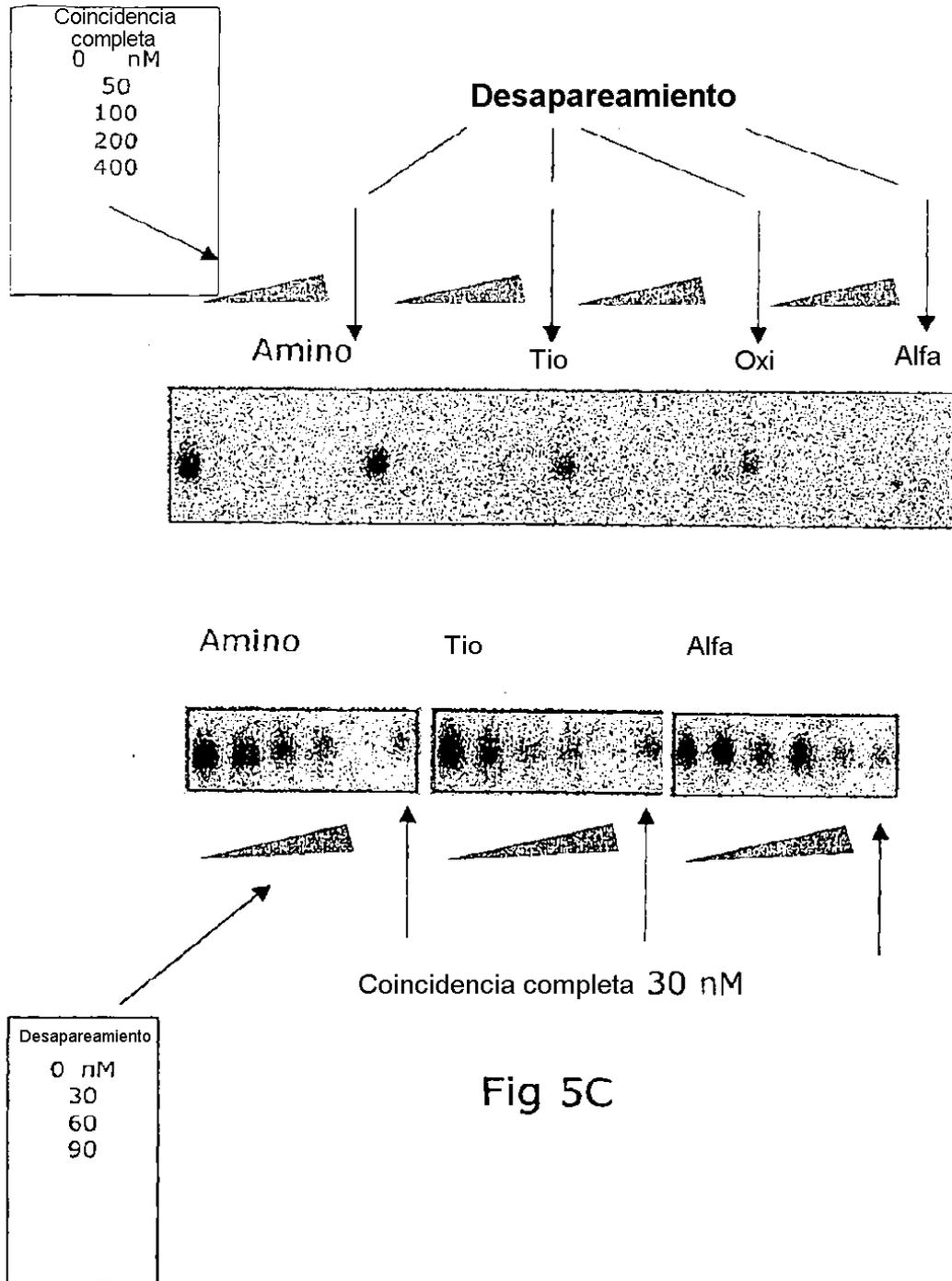


Fig 5C

carril	entrada	Ha-Ras	28S	%Ha-Ras
1	simulación	1295	341598 0,003791	100
2	5nm 2754	579	314264 0,001842	37,33333
3	10nm 2754	191	264155 0,000723	14,65168
4	20nm 2754	149	346839 0,00043	8,705048
5	40nm 2754	142	358302 0,000396	8,030673
6	20nm 2756	1082	389683 0,002777	56,26375
13	simulación	2038	331165 0,006154	100
14	5nm 2742	386	276874 0,001394	28,24997
15	10nm 2742	250	259534 0,000963	19,51905
16	20nm 2742	182	369254 0,000493	9,987551
17	40nm 2742	227	392719 0,000578	11,71269
18	20nm 2744	1069	480037 0,002227	45,12486
19	simulación	1534	466543 0,003288	100
20	5nm 2776	364	474676 0,000767	15,53878
21	10nm 2776	167	519707 0,000321	6,511346
22	20nm 2776	53	411881 0,000129	2,607456
23	40nm 2776	105	375591 0,00028	5,664831
24	20nm 2778	703	184089 0,003819	77,38207

Fig 6

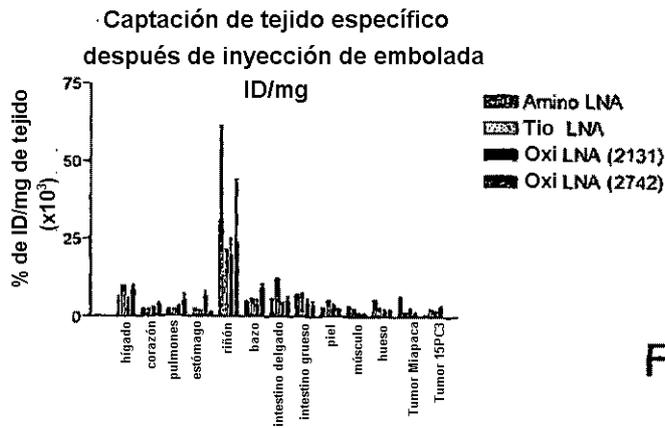
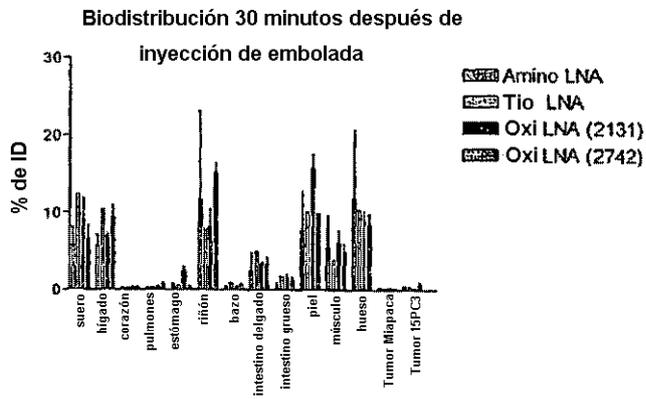
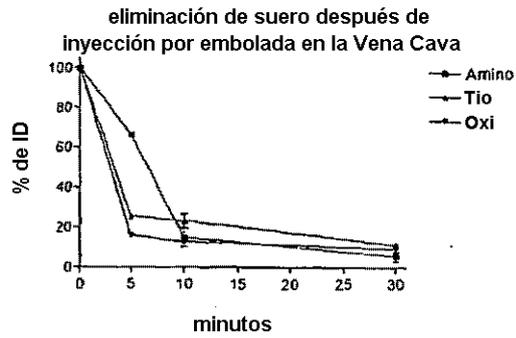


Fig 7

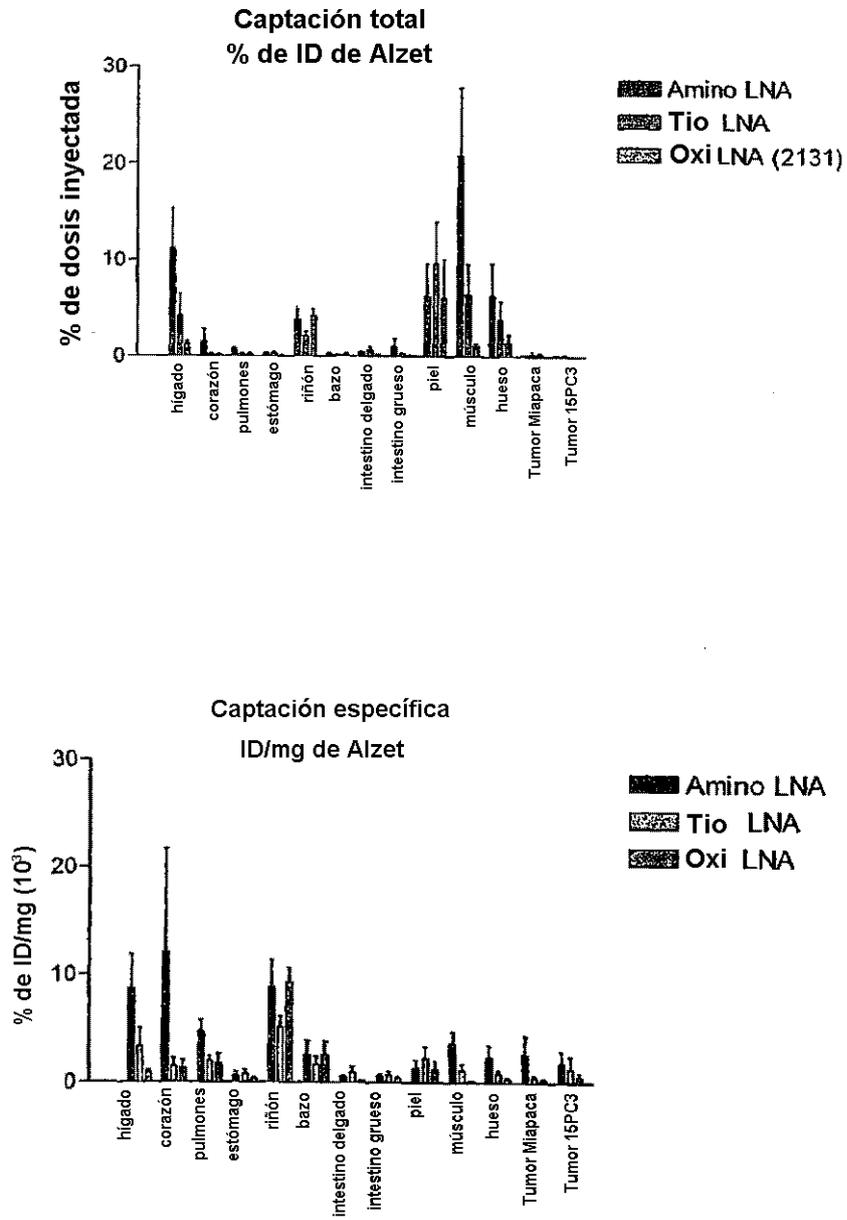


Fig 8

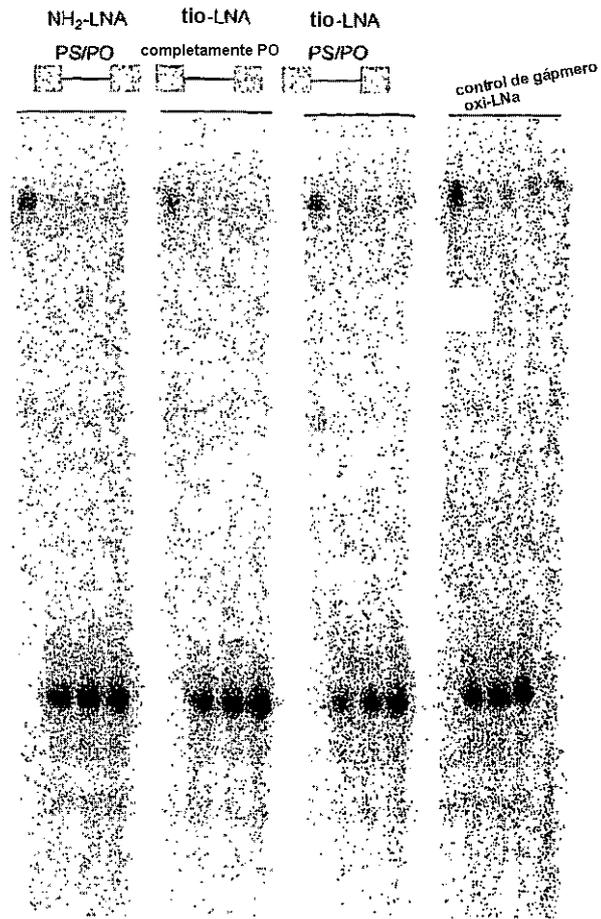


Fig 9

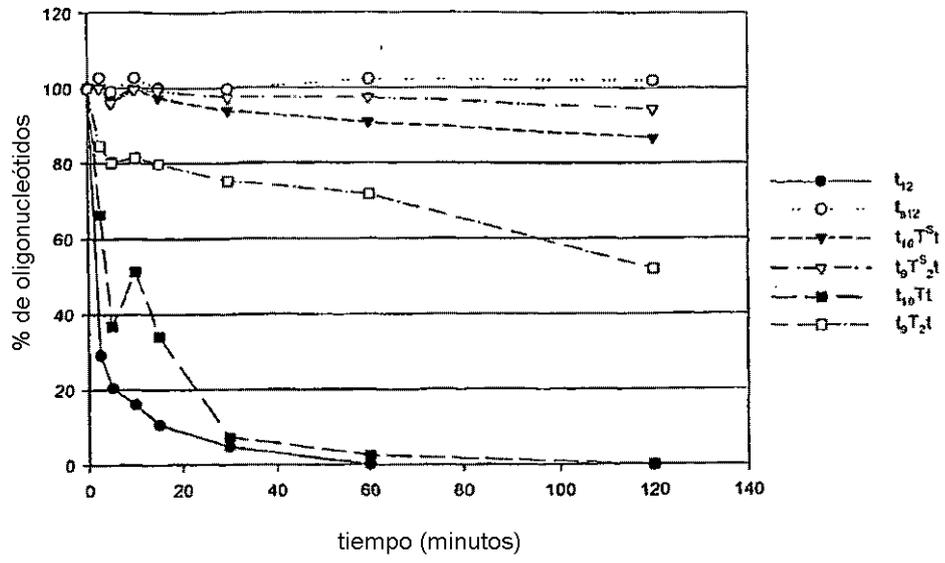
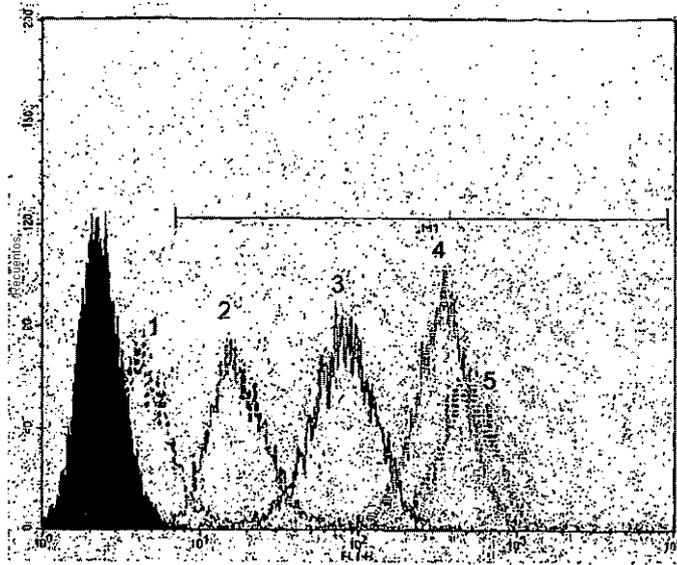


Fig. 10



- 1. ADN/PO
- 2. oxi-LNA
hueco-PS/flancos-PO
- 3. tio-LNA
todo-PO
- 4. tio-LNA
hueco-PS/flancos-PO
- 5. ADN/PS

Fig 11

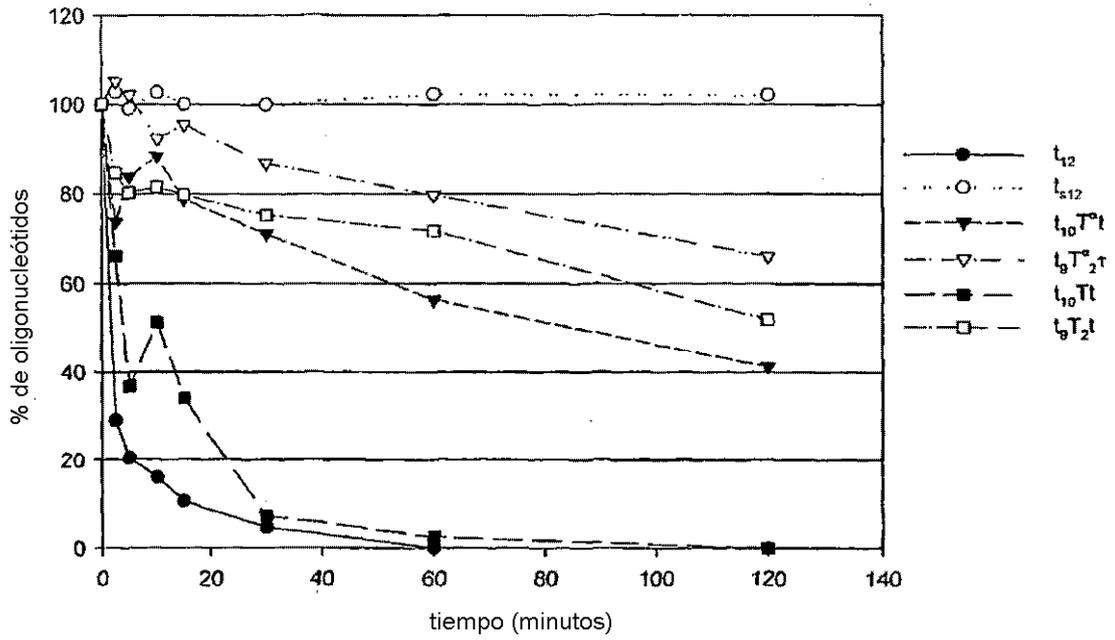


Fig 12

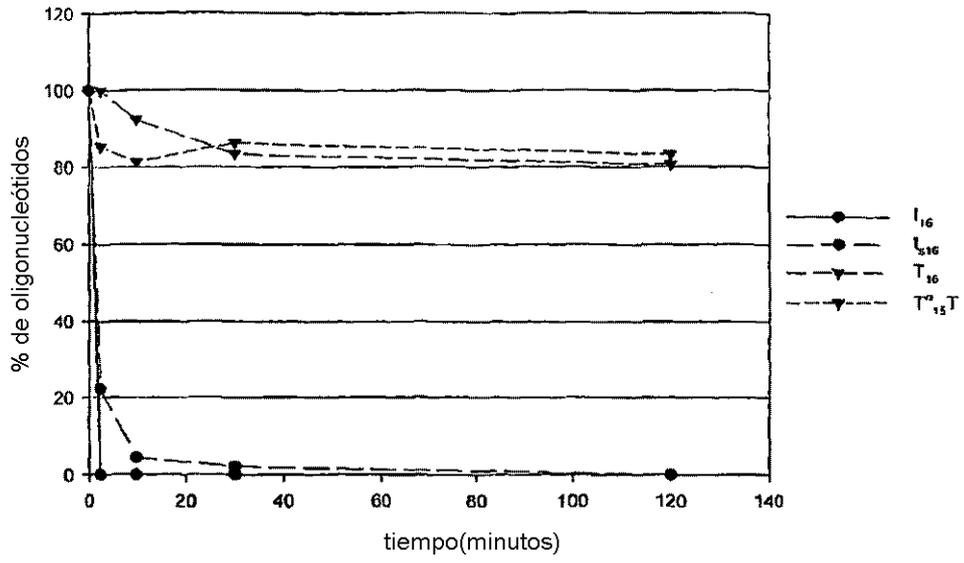
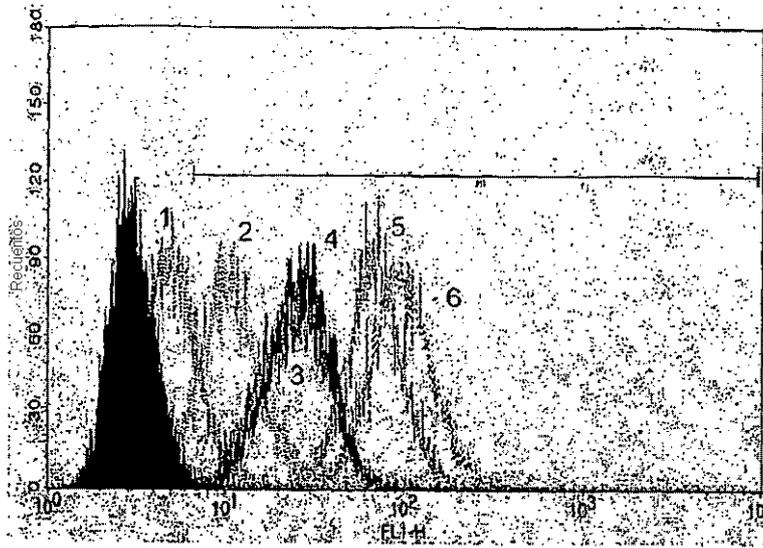


Fig 13



- 1. ADN/PO
- 2. oxi-LNA
hueco-PS/flancos-PO
- 3. α -L-LNA
todo-PO
- 4. α -L-LNA
hueco-PS/flancos-PO
- 5. α -L-LNA
todo-PS
- 6. ADN/PS

Fig 14



Fig 15

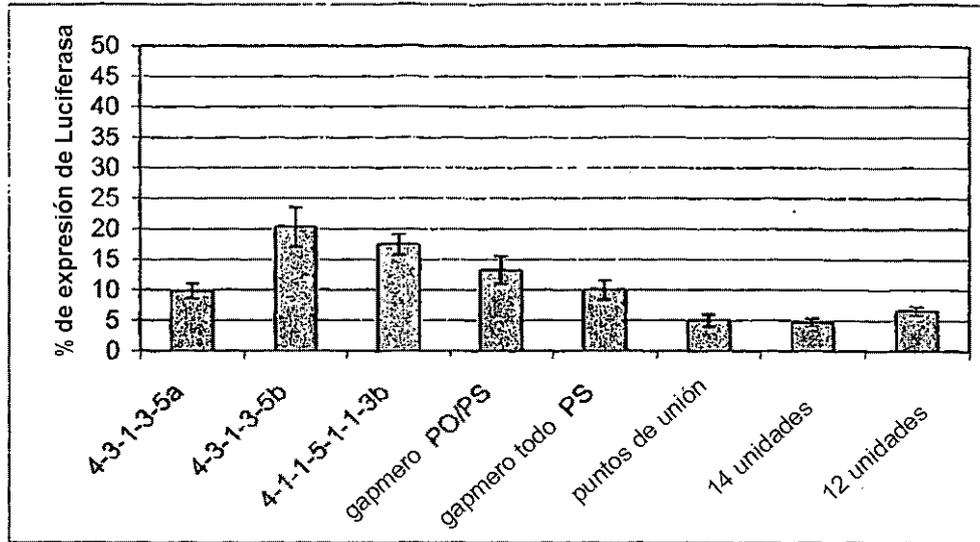


Fig. 16

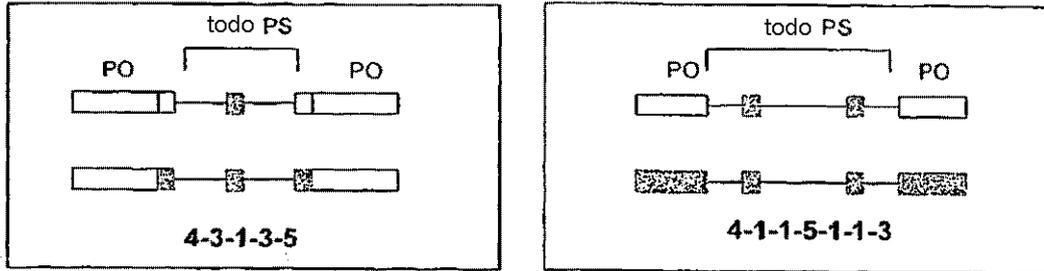


Fig 17

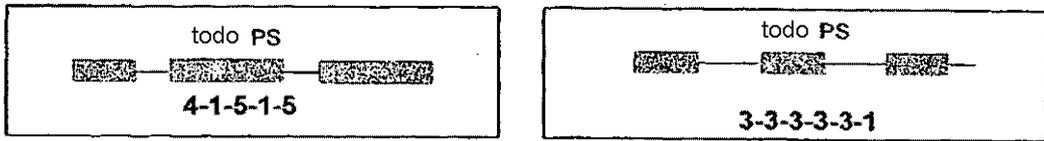


Fig 18

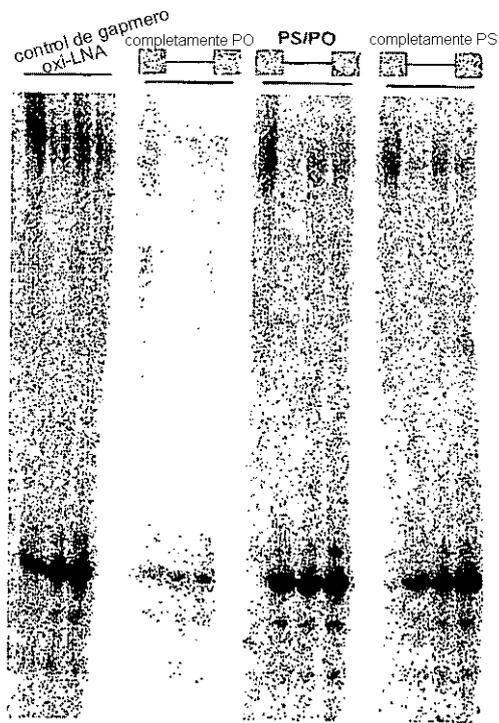


Fig 19A

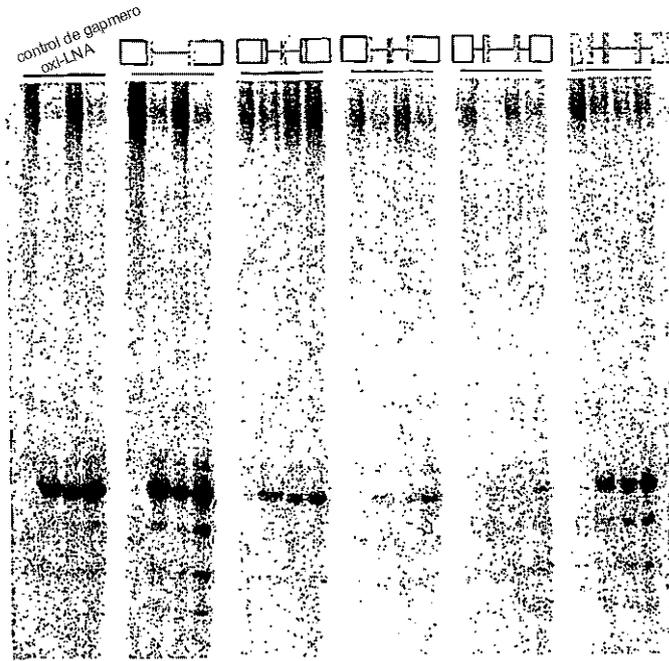


Fig. 19B

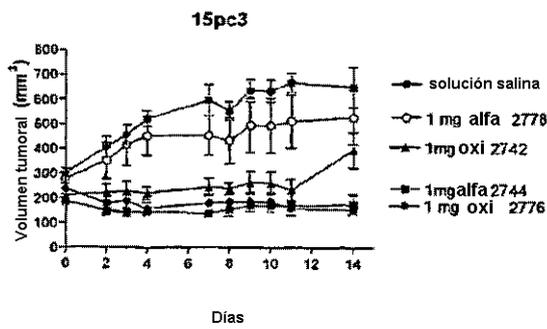
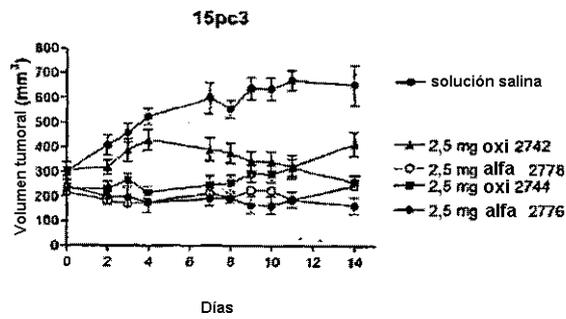
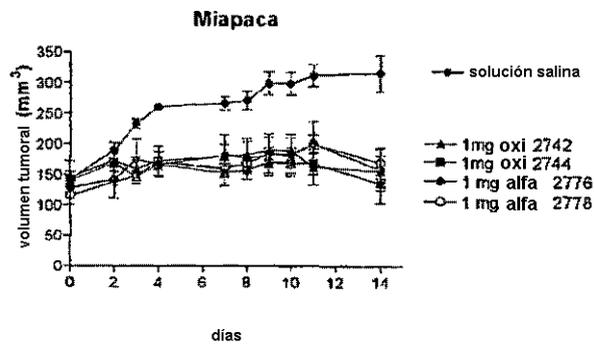
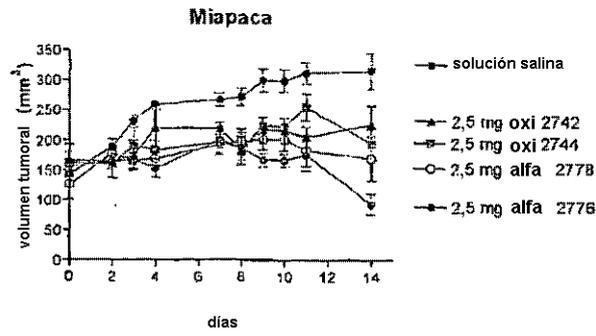


Fig 20

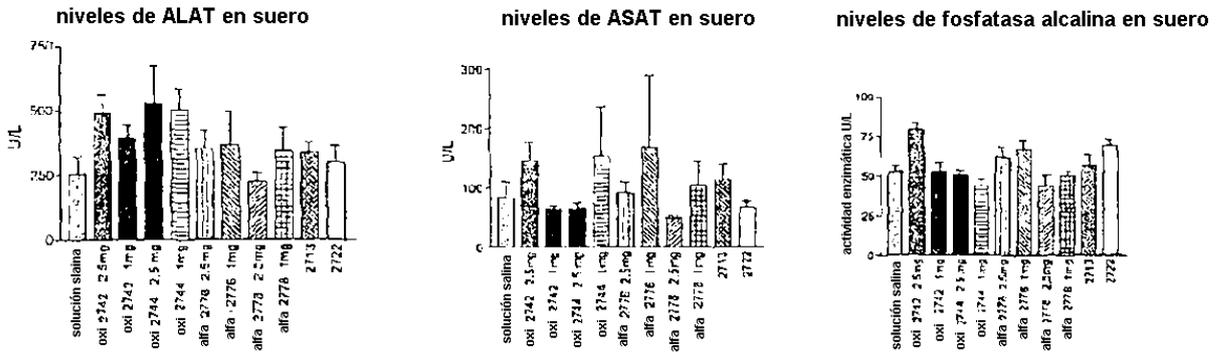


Fig 21

Grupo 1	solución salina
Grupo 2	2,5 mg 2742
Grupo 3	1 mg 2742
Grupo 4	2,5 mg 2744
Grupo 5	1 mg 2744
Grupo 6	2,5 mg 2776
Grupo 7	1 mg 2776
Grupo 8	2,5 mg 2778
Grupo 9	1 mg 2778
Grupo 10	5 mg 2713
Grupo 11	5 mg 2722

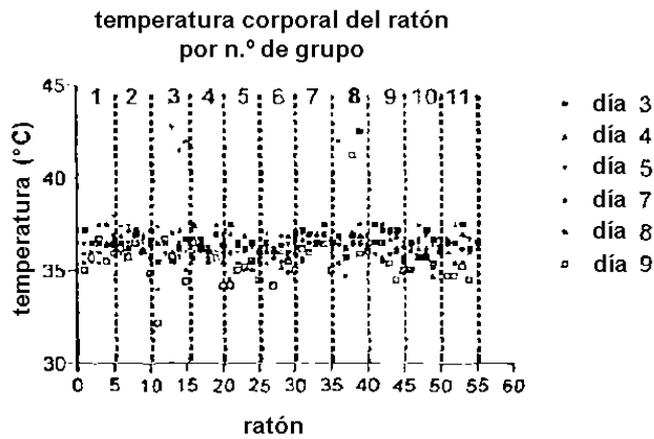


Fig 22

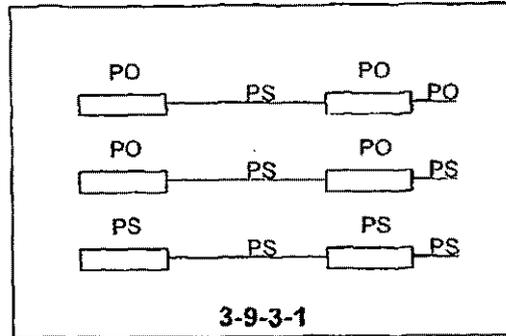


Fig 23

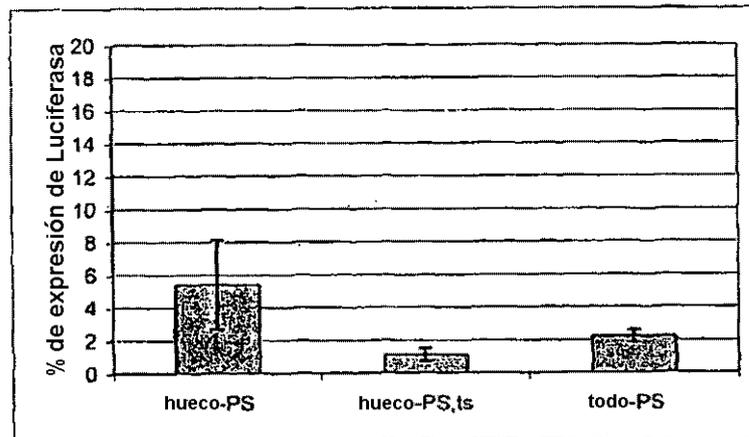


Fig 24