

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 472**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2007** **E 11186203 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017** **EP 2410054**

54 Título: **Compuestos antisentido**

30 Prioridad:

18.10.2006 US 852894 P

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

28.06.2017

73 Titular/es:

IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
2855 Gazelle Court
Carlsbad, CA 92010, US

72 Inventor/es:

SWAYZE, ERIC E.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 620 472 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).

Compuestos antisentido**Descripción****5 Antecedentes**

10 La dirección a secuencias génicas que provocan enfermedad se sugirió por primera vez hace casi 40 años (Belikova y col., Tet. Lett., 1967, 37, 3557-3562), y se demostró actividad antisentido en cultivo celular una década después (Zamecnik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1978, 75, 280-284). Una ventaja de la tecnología antisentido en el tratamiento de una enfermedad o afección que proviene de un gen que provoca enfermedad es que se trata de un enfoque genético directo que tiene la capacidad de modular la expresión de genes que provocan enfermedad específicos. Otra ventaja es que la validación de una diana usando compuestos antisentido da como resultado descubrimiento directo e inmediato del agente terapéutico.

15 En general, el principio detrás de la tecnología antisentido es que un compuesto antisentido hibrida con un ácido nucleico diana y efectúa modulación de la actividad o función de la expresión génica, tal como transcripción, traducción o corte y empalme. La modulación de la expresión génica puede conseguirse mediante, por ejemplo, degradación de diana o inhibición basada en ocupación. Un ejemplo de modulación de función diana de ARN por degradación es degradación basada en RNasa H del ARN diana tras hibridación con un compuesto antisentido de tipo ADN. Otro ejemplo de modulación de la expresión génica por degradación de diana es ARN de interferencia (ARNi). ARNi es una forma de silenciamiento génico mediada por antisentido que implica la introducción de ARNbc que conduce a la reducción específica de secuencia de niveles de ARNm endógenos diana. Esta especificidad de secuencia hace a los compuestos antisentido extremadamente atractivos como herramientas para validación de diana y funcionalización génica, así como agentes terapéuticos para modular de forma selectiva la expresión de genes implicados en la patogénesis de una cualquiera de una diversidad de enfermedades.

20 La tecnología antisentido es un medio eficaz para reducir la expresión de uno o más productos génicos específicos y puede por lo tanto demostrar ser excepcionalmente útil en varias aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. Se usan de forma rutinaria nucleósidos químicamente modificados para su incorporación en compuestos antisentido para potenciar una o más propiedades, tales como resistencia a nucleasa, farmacocinética o afinidad por un ARN diana.

25 A pesar de la expansión del conocimiento desde el descubrimiento de la tecnología antisentido, sigue habiendo una necesidad no satisfecha de compuestos antisentido con mayor eficacia, toxicidad reducida y menor coste. El resto de ácido nucleico bicíclico (BNA) metilenoxi (4'-CH₂-O-2') de alta afinidad, también conocido como resto de "Ácido Nucleico Bloqueado" (LNA), se ha usado para crear potentes oligonucleótidos antisentido gapmer. Se ha mostrado, sin embargo, que esta potencia está acompañada de un riesgo aumentado de hepatotoxicidad como se indica por la elevación de transaminasas del hígado en experimentos de roedores. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento compuestos antisentido gapmer para inhibición de ARN diana *in vivo* que comprenden modificaciones de nucleótidos bicíclicos de alta afinidad, pero que se diseñan para tener toxicidad mitigada por la incorporación de nucleótidos modificados de alta afinidad no bicíclicos. Tales compuestos antisentido gapmer son más eficaces que los compuestos antisentido BNA o LNA previamente descritos, como resultado de una reducción de la toxicidad.

30 Fluiter y col. (ChemBioChem 2005, 6, 1104-1109) desvela monómeros de ácido nucleico bloqueado y diversos oligonucleótidos que incluyen tales monómeros en gapmer simétricos.

Sumario

35 La presente invención proporciona nuevos oligonucleótidos como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

40 Se desvelan en el presente documento oligonucleótidos antisentido gapmer que muestran mejoras notables en seguridad en comparación con un gapmer de la misma longitud y configuración de ala-hueco-ala, en la que cada nucleótido ala es un ácido nucleótido bicíclico (BNA), por ejemplo un metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, en ocasiones también denominado LNA. Los oligonucleótidos antisentido gapmer de la presente invención comprenden una región de hueco desoxi, una región ala 5' situada en el extremo 5' del hueco desoxi y una región ala 3' situada en el extremo 3' del hueco desoxi, siendo al menos un nucleótido de al menos una de las regiones ala LNA y siendo al menos uno de los nucleósidos ala restantes un nucleótido modificado 2' no bicíclico. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido gapmer tienen al menos un nucleótido LNA (metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA) o etilenoxi (4'-CH₂-CH₂-O-2') BNA en al menos una de las alas y al menos nucleótido modificado de alta afinidad no bicíclico. Los nucleósidos 2' modificados no bicíclicos pueden sustituirse en la posición 2' con -O-alquilo sustituido o no sustituido o -O-(2-acetilamida) sustituido o no sustituido. Por ejemplo, los nucleósidos modificados 2' no bicíclicos podrían ser 2'-OCH₃, 2'-O(CH₂)₂OCH₃ o 2'-OCH₂C(O)-NR₁R₂, en la que R₁ y R₂ son de forma independiente hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido o, en la alternativa, se toman juntos para realizar un resto heterocíclico.

Además, se desvelan en el presente documento oligonucleótidos antisentido gapmer que tienen un hueco desoxi, una región ala 5' situada en el extremo 5' del hueco desoxi y una región ala 3' situada en el extremo 3' del hueco desoxi, teniendo la región ala 5' al menos un nucleótido modificado de alta afinidad no bicíclico y teniendo la región ala 3' al menos un nucleótido bicíclico 4' a 2', por ejemplo un nucleótido LNA (metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA) o un etilenoxi (4'-CH₂-CH₂-O-2') BNA. En un aspecto ejemplar de la divulgación los nucleótidos modificados de alta afinidad no bicíclicos son nucleósidos modificados 2' no bicíclicos. En una realización adicional de la presente invención son oligonucleótidos antisentido gapmer, en los que los nucleósidos modificados 2' no bicíclicos se sustituyen en la posición 2', por ejemplo, 2'-OCH₃, 2'-O (CH₂)₂OCH₃ o 2'-OCH₂C(O)-NR₁R₂, en las que R₁ y R₂ son de forma independiente hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido o, en la alternativa, se toman juntos para hacer un resto heterocíclico.

En una cierta realización, los oligonucleótidos antisentido gapmer no tienen BNA en la región ala 5', por ejemplo, no tienen nucleósidos LNA (metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA) o etilenoxi (4'-CH₂-CH₂-O-2') BNA. En una realización adicional, los oligonucleótidos antisentido gapmer desvelados en el presente documento tienen una región ala 5' que tiene solamente nucleótidos modificados 2'-O(CH₂)₂OCH₃ y solamente nucleósidos LNA (metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA) en el ala 3'.

En otra realización más, los oligonucleótidos antisentido gapmer en los que la región 5' tiene al menos un nucleótido bicíclico 4' a 2' y la región ala 3' tiene al menos un nucleótido modificado 2' no bicíclico. En una cierta realización, los oligonucleótidos antisentido gapmer no tienen nucleótidos LNA en la región ala 3', por ejemplo no tienen nucleótidos LNA (metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA) o etilenoxi (4'-CH₂-CH₂-O-2') BNA. En una realización adicional, los oligonucleótidos antisentido gapmer desvelados en el presente documento tienen una región ala 5' que tiene solamente nucleótidos LNA (metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA) y una región ala 3' que tiene solamente nucleósidos modificados 2', por ejemplo, los nucleósidos modificados 2' no bicíclicos pueden sustituirse en la posición 2' con -O-alquilo sustituido o no sustituido o -O-(2-acetilamida) sustituido o no sustituido. Por ejemplo, los nucleósidos modificados 2' no bicíclicos podrían ser 2'-OCH₃, 2'-O(CH₂)₂OCH₃ o 2'-OCH₂C(O)-NR₁R₂, en los que R₁ y R₂ son de forma independiente hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido o, en la alternativa, se toman juntos para hacer un resto heterocíclico.

Los oligonucleótidos antisentido gapmer de la presente invención pueden ser shortmer u oligonucleótidos antisentido de hueco ensanchado. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido gapmer son de 10 a 25, 10 a 14, 12 a 25, 15 a 25 ó 18 a 24 nucleótidos de longitud. La regiones 5' y 3' de los compuestos antisentido de la presente invención son independientemente de entre 1 y 7 nucleótidos de longitud, o de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 nucleótidos de longitud; entre 1 y 5 nucleótidos de longitud, o 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos de longitud; o entre 1 y 3 nucleótidos de longitud, o 1, 2 ó 3 nucleótidos de longitud. La región de hueco desoxi de los oligonucleótidos Antisentido de la presente invención es de entre 6 y 18 nucleótidos de longitud o 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 nucleótidos de longitud; entre 8 y 16 nucleótidos de longitud u 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 nucleótidos de longitud; entre aproximadamente 11 y 16 nucleótidos de longitud u 11, 12, 13, 14, 15 ó 16; o entre 7 y 10 nucleótidos de longitud o 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos de longitud. En un aspecto de la invención los oligonucleótidos antisentido gapmer tienen una configuración de ala-hueco-ala de 5-10-5, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1 ó 2-8-2.

Los oligonucleótidos antisentido gapmer delineados en el presente documento tienen al menos un engarce internucleosídico modificado. En una cierta realización este engarce internucleosídico modificado es un fosforotioato. En una realización adicional cada engarce internucleosídico es un engarce internucleosídico modificado de fosforotioato.

También se contemplan en el presente documento compuestos para su uso en procedimientos para reducir la expresión de un ARN diana en un animal comprendiendo dichos procedimientos administrar a dicho animal un oligonucleótido antisentido gapmer de la presente invención, siendo la secuencia de dicho oligonucleótido antisentido gapmer complementaria a dicho ARN diana.

En una realización, los nucleótidos modificados de alta afinidad son nucleótidos con azúcar modificado. En un aspecto, al menos uno de los nucleótidos con azúcar modificado comprende un puente entre la posición 4' y la 2' del azúcar. Cada uno de nucleótidos con azúcar modificado es, de forma independiente, β-D o α-L. En otro aspecto, cada uno de dichos nucleótidos modificados de alta afinidad confiere una ΔT_m de al menos 1 a 4 grados por nucleótido. En otro aspecto, cada uno de dichos nucleótidos con azúcar modificado comprende un grupo sustituyente 2' que es distinto de H u OH. Tales nucleótidos con azúcar modificado incluyen los que tienen un nucleótido bicíclico con enlace 4' a 2'. En otro aspecto, cada uno de los nucleótidos con azúcar modificado es un grupo sustituyente 2' no bicíclico, que es de forma independiente, alcoxi, alcoxi sustituido, -O-(2-acetilamida) sustituida o no sustituida o halógeno. En una realización, cada uno de los grupos sustituyentes 2' es OCH₂CH₂OCH₃.

En una realización, los compuestos antisentido gapmer tienen uno o más nucleótidos con azúcar modificado que comprenden un enlace entre la posición 4' y 2' del azúcar, comprendiendo cada uno de dichos enlaces de forma independiente 1 o de 2 a 4 grupos ligados seleccionados de forma independiente de -[C(R₁)(R₂)]_n-,

$-C(R_1)=C(R_2)-$, $-C(R_1)=N-$, $-C(=NR_1)-$, $-C(=O)-$, $-C(=S)-$, $-O-$, $-Si(R_1)_2-$, $-S(=O)_x$ y $-N(R_1)-$; en los que

x es 0, 1 ó 2;
n es 1, 2, 3 ó 4;

cada R_1 y R_2 es, de forma independiente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C_1-C_{12} ; alquilo C_1-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, alquino C_2-C_{12} , alquino C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20} , arilo C_5-C_{20} sustituido, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C_5-C_7 , radical alicíclico C_1-C_7 sustituido, halógeno, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $COOJ_1$, acilo ($C(=O)-H$), acilo sustituido, CN, sulfonilo ($S(=O)_2-J_1$), o sulfoxilo ($S(=O)-J_1$); y cada J_1 y J_2 es, de forma independiente, H, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_1-C_{12} sustituido, alquino C_2-C_{12} , alquino C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20} , arilo C_5-C_{20} sustituido, acilo ($C(=O)-H$), acilo sustituido, un radical heterocíclico, un radical heterocíclico sustituido, aminoalquilo C_1-C_{12} , aminoalquilo C_1-C_{12} sustituido o un grupo protector.

En un aspecto, cada uno de dichos enlaces es, de forma independiente, $-[C(R_1)(R_2)]_n-$, $-[C(R_1)(R_2)]_n-O-$, $-C(R_1R_2)-N(R_1)-O-$ o $-C(R_1R_2)-O-N(R_1)-$. En otro aspecto, cada uno de dichos enlaces es, de forma independiente, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-CH_2-O-2'$, $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R_1)-2'$ y $4'-CH_2-N(R_1)-O-2'$ en las que cada R_1 es, de forma independiente, H, un grupo protector o alquilo C_1-C_{12} .

En otro aspecto de la invención hay compuestos antisentido gapmer con uno o más nucleósidos 2'-modificados o 2'-sustituidos. La expresión "nucleósido 2'-modificado" o "nucleósido 2'-sustituido" como se usa en la presente invención pretende incluir todo tipo de nucleósidos que tengan un grupo sustituyente 2' que sea distinto de H y OH. Los grupos sustituyentes 2' adecuados para nucleósidos 2' modificados de la invención incluyen, pero sin limitación: halo, alilo, amino, azido, amino, SH, CN, OCN, CF_3 , OCF_3 , $O-$, $S-$, o $N(R_m)$ -alquilo: $O-$, $S-$, o $N(R_m)$ -alqueno; $O-$, $S-$ o $N(R_m)$ -alquino; O -alquenoil- O -alquilo, alquino, alcarilo, aralquilo, O -alcarilo, O -aralquilo, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ o $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, siendo cada R_m y R_n de forma independiente, H, un grupo protector de amino o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido. Esos grupos sustituyentes 2' pueden sustituirse adicionalmente con grupos sustituyentes seleccionados de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro (NO_2), tiol, tiolalcoxi (S -alquilo), halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino siendo cada R_m , de forma independiente, H, un grupo protector de amino o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido.

Una lista de grupos sustituyentes 2' incluye F, $-NH_2$, N_3 , OCF_3 , $O-CH_3$, $O(CH_2)_3NH_2$, $CH_2-CH=CH_2$, $-OCH_2-CH=CH_2$, $OCH_2CH_2OCH_3$, $2'-O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, $-O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$, y acetamida N-sustituida ($O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$) en la que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H, un grupo protector de amino o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido. Otra lista de grupos sustituyentes 2' incluye F, OCF_3 , $O-CH_3$, $OCH_2CH_2OCH_3$, $2'-O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, $-O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$, y acetamida N-sustituidas ($O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$) en la que R_m y R_n es, de forma independiente, H, un grupo protector de amino o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido.

Se proporcionan en el presente documento, compuestos antisentido gapmer para su uso en terapia. Se proporciona adicionalmente un compuesto antisentido gapmer de la presente invención para su uso en la inhibición de la expresión de un ARN diana en un animal.

Descripción detallada

Debe entenderse que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicatorios solamente y no son restrictivas de la invención, como se reivindica. En el presente documento, el uso del singular incluye el plural a no ser que se indique específicamente de otro modo. Como se usa en el presente documento, el uso de "o" incluye "y/o" a no ser que se indique de otro modo. Además, el uso del término "incluyendo" así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. También, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos y componentes que comprenden una unidad como elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a no ser que se indique específicamente de otro modo.

Los encabezamientos de sección usados en el presente documento son para fines organizativos solamente y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

A. Definiciones

A no ser que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descrita en el presente documento es la bien conocida y usada habitualmente en la materia. Pueden usarse técnicas convencionales para síntesis química y análisis químico. Ciertas de tales técnicas y procedimientos pueden hallarse

por ejemplo en "carbohydrate Modifications in Antisense Research" Editado por Sangvi y Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18ª edición, 1990; y "Antisense Drug Technology. Principles, Strategies, and Application Editado por Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida; y Sambrook y col., "Molecular Cloning, A laboratory Manual", 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

A no ser que se indique de otro modo, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

Como se usa en el presente documento, el término "nucleósido" significa una glucosilamina que comprende una base nitrogenada y un azúcar. Los nucleósidos incluyen, pero sin limitación, nucleósidos naturales, nucleósidos abásicos, nucleósidos modificados y nucleósidos que tienen bases miméticas y/o grupos de azúcares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "nucleósido natural" o "nucleósido no modificado" significa un nucleósido que comprende una base nitrogenada natural y un azúcar natural. Los nucleósidos naturales incluyen nucleósidos de ARN y ADN.

Como se usa en el presente documento, la expresión "azúcar natural" se refiere a un azúcar de un nucleósido que no está modificado de su forma de origen natural en ARN (2'-OH) o ADN (2'-H).

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un nucleósido que tiene un grupo fosfato ligado de forma covalente al azúcar. Los nucleótidos pueden modificarse con cualquiera de una diversidad de sustituyentes.

Como se usa en el presente documento, el término "base nitrogenada" se refiere a la parte base de un nucleósido o un nucleótido. Una base nitrogenada puede comprender cualquier átomo o grupo de átomos capaz de realizar un enlace de hidrógeno con una base de otro ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "base nitrogenada natural" se refiere a una base nitrogenada que no está modificada de su forma de origen natural en ARN o ADN.

Como se usa en el presente documento, la expresión "resto de base heterocíclico" se refiere a una base nitrogenada que comprende un heterociclo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "compuesto oligomérico" se refiere a una estructura polimérica que comprende dos o más subestructuras y capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleósidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden grupos conjugados. Los ejemplos no limitantes de compuestos oligoméricos incluyen, pero sin limitación, cebadores, sondas, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), compuestos de corte y empalme alternativo y ARNpi. Como tal, estos compuestos pueden introducirse en forma monocatenaria, bicatenaria, circular, ramificada o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Los compuestos bicatenarios oligoméricos pueden ser dos cadenas hibridadas para formar compuestos bicatenarios o una cadena sencilla con suficiente autocomplementariedad para permitir hibridación y formación de un compuesto completo o parcialmente bicatenario.

Como se usa en el presente documento "oligonucleósido" se refiere a un oligonucleótido en el que los engarces internucleosídicos no contienen un átomo de fósforo.

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a un compuesto oligomérico que comprende una pluralidad de nucleótidos o nucleósidos ligados. En cierta realización, se modifican uno o más nucleótidos de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos están compuestos de bases nitrogenadas naturales y/o modificadas, azúcares y engarces internucleosídicos covalentes y pueden incluir adicionalmente conjugados no de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, "engarce internucleosídico" se refiere a un engarce covalente entre nucleósidos adyacentes.

Como se usa en el presente documento "engarce internucleotídico natural" se refiere a un engarces fosfodiéster 3' a 5'.

Como se usa en el presente documento, la expresión "engarce internucleosídico modificado" se refiere a cualquier engarce entre nucleósidos o nucleótidos distinto de un engarce internucleosídico de origen natural.

Como se usa en el presente documento, la expresión “compuesto antisentido” se refiere a un compuesto oligomérico que es al menos parcialmente complementario a una molécula de ácido nucleico diana con la que hibrida. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido modula (aumenta o reduce) la expresión de un ácido nucleico diana. Los compuestos antisentido incluyen, pero sin limitación, compuestos que son oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, y combinaciones químicas de estos. En consecuencia, aunque todos los compuestos antisentido son compuestos oligoméricos, no todos los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido.

Como se usa en el presente documento, la expresión “oligonucleótido antisentido” se refiere a un compuesto antisentido que es un oligonucleótido.

Como se usa en el presente documento, la expresión “actividad antisentido” se refiere a cualquier actividad detectable y/o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico diana. Dicha detección y/o medición puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la actividad antisentido se evalúa detectando y/o midiendo la cantidad de proteína diana. En ciertas realizaciones, la actividad antisentido se evalúa detectando y/o midiendo la cantidad de ácidos nucleicos y/o ácidos nucleicos diana escindidos y/o ácidos nucleicos diana con corte y empalme alternativo.

Como se usa en el presente documento, la expresión “detectar actividad antisentido” o “medir actividad antisentido” significa que se realiza un ensayo para detectar o medir la actividad antisentido en una muestra y se compara con la de una muestra de control. Dicha detección y/o medición puede incluir valores de cero. Por lo tanto, si un ensayo para la detección de actividad antisentido no da como resultado el hallazgo de actividad antisentido (actividad antisentido de cero), no obstante se ha realizado la etapa de “detectar actividad antisentido”.

Como se usa en el presente documento la expresión “muestra de control” se refiere a una muestra que no se ha puesto en contacto con un compuesto de ensayo. En ciertas realizaciones, una muestra de control se obtiene antes de la administración de un compuesto oligomérico a un animal. En ciertas realizaciones, se obtiene una muestra de control de un animal al que no se ha administrado compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, se usa un patrón de referencia como un sustituto para una muestra de control.

Como se usa en el presente documento la expresión “compuesto antisentido químico” se refiere a un compuesto antisentido, que tiene al menos un azúcar, base nitrogenada y/o engarce internucleosídico que se modifica de forma diferencial en comparación con los otros azúcares, bases nitrogenadas y engarces internucleosídicos dentro del mismo compuesto oligomérico. El resto de los azúcares, bases nitrogenadas y engarces internucleosídicos pueden modificarse de forma independiente o no modificarse. En general, un compuesto oligomérico químico tendrá nucleósidos modificados que pueden estar en posiciones aisladas o agrupados juntos en regiones que definirán un motivo particular. Cualquier combinación de modificaciones y/o grupos miméticos pueden comprender un compuesto oligomérico químico como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “motivo” se refiere a un patrón de nucleótidos modificados y no modificados o engarces en un compuesto oligomérico.

Como se usa en el presente documento, la expresión “oligonucleótido antisentido de cadena principal mixta” se refiere a un oligonucleótido antisentido en el que al menos un engarce internucleosídico del oligonucleótido antisentido es diferente de al menos otro engarce internucleosídico del oligonucleótido antisentido.

Como se usa en el presente documento, la expresión “proteína diana” se refiere a una proteína, de la que se desea la modulación.

Como se usa en el presente documento, la expresión “gen diana” se refiere a un gen que codifica una diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión “ácido nucleico diana” se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico, cuya cantidad o función puede modularse por un compuesto antisentido. Los ácidos nucleicos diana incluyen, pero sin limitación, ARN (incluyendo, pero sin limitación pre-ARNm y ARNm o partes de los mismos), ADNc derivado de dicho ARN, así como ARN no traducido, tal como ARNmi. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico diana puede ser un gen celular (o ARNm transcrito de tal gen) cuya expresión se asocia con un trastorno o patología particular o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso.

Como se usa el presente documento, la expresión “región diana” se refiere a una parte de un ácido nucleico diana que es capaz de hibridar con uno o más compuestos antisentido y dicha hibridación da como resultado actividad antisentido.

Como se usa en el presente documento, la expresión “segmento diana” se refiere a una subparte más corta

de una región diana.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “sitio diana” se refiere a una parte de un ácido nucleico diana que es capaz de hibridar con un compuesto antisentido, dando como resultado actividad antisentido.

Como se usa en el presente documento, la expresión “que se dirige a” o “dirigido” se refiere a la asociación de un compuesto antisentido con una molécula de ácido nucleico diana particular o una región particular de nucleótidos dentro de una molécula de ácido nucleico diana.

10 Como se usa en el presente documento, “diseñar” o “diseñado para” se refiere al procedimiento de diseñar un compuesto oligomérico que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico diana seleccionada.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “complementariedad de bases nitrogenadas” se refiere a una base nitrogenada que es capaz de formar par de bases con otra base nitrogenada. Por ejemplo, en ADN, la adenina (A) es complementaria de la timina (T). Por ejemplo, en ARN, la adenina (A) es complementaria del uracilo (U). En ciertas realizaciones, base nitrogenada complementaria se refiere a una base nitrogenada de un compuesto antisentido que es capaz de formar par de bases con una base nitrogenada de su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una base nitrogenada en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar enlace de hidrógeno con una base nitrogenada en una cierta posición de un ácido nucleico diana, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera complementaria en ese par de bases nitrogenadas.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión “base nitrogenada no complementaria” se refiere a un par de bases nitrogenadas que no forman enlaces de hidrógeno entre sí o soportan de otro modo la hibridación.

25 Como se usa en el presente documento, el término “complementario” se refiere a la capacidad de un compuesto oligomérico para hibridar con otro compuesto oligomérico o ácido nucleico a través de complementariedad de bases nitrogenadas. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido y su diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula está ocupado por bases nitrogenadas que pueden enlazarse entre sí para permitir la asociación estable entre el compuesto antisentido y la diana. Un experto en la materia reconoce que la inclusión de emparejamientos erróneos es posible sin eliminar la capacidad de los compuestos oligoméricos para permanecer en asociación. Por lo tanto, se describen en el presente documento compuestos antisentido que pueden comprender hasta aproximadamente 20 % de nucleótidos que están emparejados de forma errónea (es decir, no son bases nitrogenadas complementarias de los nucleótidos correspondientes de la diana). Preferentemente, los compuestos antisentido no contienen más de aproximadamente 15 %, más preferentemente no más de aproximadamente 10 %, más preferentemente no más de 5 % o ningún emparejamiento erróneo. Los nucleótidos restantes son complementarios en bases nitrogenadas o no interrumpen de otro modo la hibridación (por ejemplo, bases universales). Un experto habitual en la materia reconocerá que los compuestos proporcionados en el presente documento son al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % complementarios en bases nitrogenadas con un ácido nucleico diana.

30 Como se usa en el presente documento “hibridación” significa el emparejamiento de compuestos oligoméricos complementarios (por ejemplo, un compuesto antisentido y su ácido nucleico diana). Sin limitarse a un mecanismo particular, el mecanismo más habitual de emparejamiento implica formación de enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre bases nucleosídicas o nucleotídicas complementarias (bases nitrogenadas). Por ejemplo, la base natural adenina es complementaria en base nitrogenada de las bases nitrogenadas naturales timidina y uracilo que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La base natural guanina es complementaria en base nitrogenada de las bases naturales citosina y 5-metil citosina. Puede producirse hibridación en diversas circunstancias.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “hibrida específicamente” se refiere a la capacidad de un compuesto oligomérico para hibridar con un sitio de ácido nucleico con mayor afinidad que hibrida con otro sitio de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con más de un sitio diana. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico hibrida específicamente con su diana en condiciones de hibridación rigurosas.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones de hibridación rigurosas” o “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones en las que un compuesto antisentido hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y las “condiciones rigurosas” en las que hibridan los compuestos antisentido con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y composición de los compuestos antisentido y los ensayos en los que se investigan.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión “porcentaje de complementariedad” se refiere al

número de bases nitrogenadas de un compuesto oligomérico que tienen complementariedad de bases nitrogenadas con una base nitrogenada correspondiente de otro compuesto oligomérico o ácido nucleico dividido por la longitud total (número de bases nitrogenadas) del compuesto oligomérico.

5 Como se usa en el presente documento la expresión “región de porcentaje de complementariedad” se refiere al número de bases nitrogenadas de una región de un compuesto oligomérico que tiene complementariedad de bases nitrogenadas con una base nitrogenada correspondiente de otro compuesto oligomérico o ácido nucleico dividido por la longitud total (número de bases nitrogenadas) de la región.

10 Como se usa en el presente documento, el término “modulación” se refiere a una perturbación de la función o actividad en comparación con el nivel de la función o actividad antes de la modulación. Por ejemplo, la modulación incluye el cambio, un aumento (estimulación o inducción) o una disminución (inhibición o reducción) de la expresión génica. Como ejemplo adicional, la modulación de la expresión puede incluir perturbar la selección del sitio de corte y empalme del procesamiento de pre-ARNm.

15 Como se usa en el presente documento, el término “expresión” se refiere a todas las funciones y etapas por las que la información codificada en un gen se convierte en estructuras presentes y operativas en una célula. Tales estructuras incluyen, pero sin limitación los productos de transcripción y traducción.

20 Como se usa en el presente documento “variante” se refiere a un transcrito de ARN alternativo que puede producirse a partir de la misma región genómica de ADN. Las variantes incluyen, pero sin limitación “variantes de pre-ARNm” que son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o parada y contienen secuencias tanto intrónicas como exónicas. Las variantes también incluyen, pero sin limitación, las que tienen puntos de unión de corte y empalme alternativo o codones de inicio y terminación alternativos.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión “2'-modificado” o “2'-sustituido” significa un sustituyente que comprende azúcar en la posición 2' distinto de H u OH. Los monómeros 2'-modificados incluyen, pero sin limitación, BNA y monómeros (por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos) con sustituyentes 2', tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C₁-C₁₀ alquilo, OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) o O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en los que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término “MOE” se refiere a un sustituyente de 2'-O-metoxietilo.

35 Como se usa en el presente documento, el término “gapmer” se refiere a un compuesto oligomérico químico que comprende una región central (un “hueco”) y una región a cada lado de cada región central (las “alas”), en el que el hueco comprende al menos una diferencia de modificación en comparación con cada ala. Tales modificaciones incluyen bases nitrogenadas, engarce monomérico y modificaciones de azúcar así como ausencia de modificación (ARN o ADN no modificados). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los engarces nucleotídicos en cada una de las alas son diferentes de los engarces nucleotídicos en el hueco. En ciertas realizaciones, cada ala comprende nucleótidos con modificaciones de alta afinidad y el hueco comprende nucleótidos que no comprenden esa modificación. En ciertas realizaciones los nucleótidos en el hueco y los nucleótidos en las alas comprenden todas modificaciones de alta afinidad, pero las modificaciones de alta afinidad en el hueco son diferentes de las modificaciones de alta afinidad en cada una de las alas. En ciertas realizaciones, las modificaciones en las alas son las mismas entre sí. En ciertas realizaciones, las modificaciones en las alas son diferentes entre sí. En ciertas realizaciones, los nucleótidos en el hueco no están modificados y los nucleótidos en las alas están modificados. En ciertas realizaciones, la modificación o modificaciones dentro de cada ala son las mismas. En ciertas realizaciones, la modificación o modificaciones en un ala son diferentes de la modificación o modificaciones en la otra ala.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “compuesto antisentido corto” u “oligonucleótido shortmer” se refiere a un compuesto antisentido gapmer u oligonucleótido antisentido de 10, 11, 12, 13 ó 14 nucleótidos de longitud que tiene un hueco desoxi de 6 a 12 nucleótidos de longitud que tiene regiones ala que tienen de forma independiente de 1 a 4 nucleótidos modificados de alta afinidad de longitud. Son configuraciones de ala-hueco desoxi-ala ejemplares 4-6-4, 3-6-3, 2-6-2, 4-7-4, 3-7-3, 2-7-2, 4-8-4, 3-8-3, 2-8-2, 1-8-1, 2-9-2, 1-9-1, 2-10-2, 1-10-1, 1-12-1 y similares.

60 Como se usa en el presente documento, un “oligonucleótido antisentido de hueco ensanchado” se refiere a un oligonucleótido antisentido químico con una región hueco desoxi que es mayor de 10 nucleótidos de longitud que tiene regiones ala que tienen de forma independiente de uno a ocho nucleótidos modificados de alta afinidad de longitud. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos antisentido de hueco ensanchado son de 18 a 24 nucleótidos de longitud capaces de tener, por ejemplo, diversos motivos ala-hueco-ala seleccionados de: 1-16-1, 2-15-1, 1-15-2, 1-14-3, 3-14-1, 2-14-2, 1-13-4, 4-13-1, 2-13-3, 3-13-2, 1-12-5, 5-12-1, 2-12-4, 4-12-2, 3-12-3, 1-11-6, 6-11-1, 2-11-5, 5-11-2, 3-11-4, 4-11-3, 1-17-1, 2-16-1, 1-16-2, 1-15-3, 3-15-1, 2-15-2, 1-14-4, 4-14-1, 2-14-3, 3-14-2, 1-13-5, 5-13-1, 2-13-4, 4-13-2, 3-13-3, 1-12-6, 6-12-1, 2-12-5, 5-12-2, 3-12-4, 4-12-3, 1-11-7, 7-11-1, 2-11-6, 6-11-2, 3-11-5, 5-11-3, 4-11-4, 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 1-16-3, 1-16-3, 2-16-2, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-3, 3-15-2, 1-14-5, 5-14-1, 2-

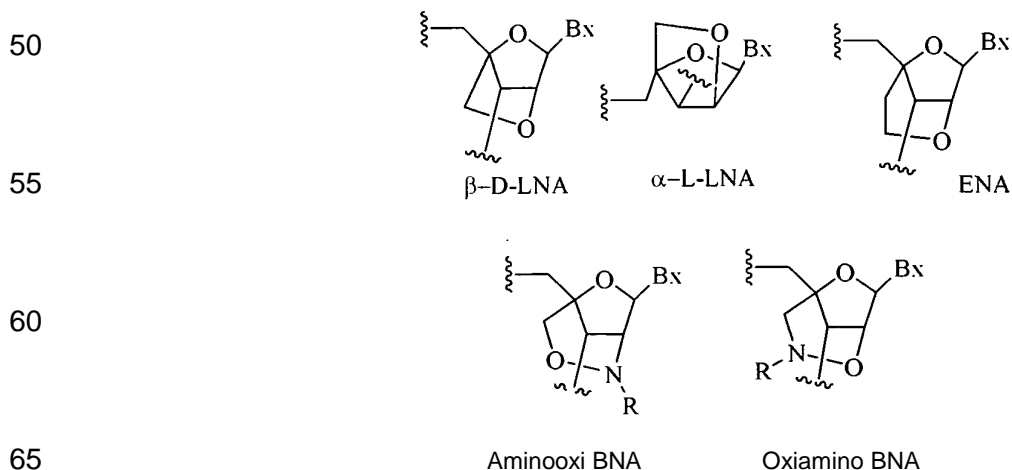
14-4, 4-14-2, 3-14-3, 1-13-6, 6-13-1, 2-13-5, 5-13-2, 3-13-4, 4-13-3, 1-12-7, 7-12-1, 2-12-6, 6-12-2, 3-12-5, 5-12-3, 4-12-4, 1-11-8, 8-11-1, 2-11-7, 7-11-2, 3-11-6, 6-11-3, 4-11-5, 5-11-4, 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 1-16-3, 3-16-1, 2-16-2, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-3, 3-15-2, 1-14-5, 2-14-4, 4-14-2, 3-14-3, 1-13-6, 6-13-1, 2-13-5, 5-13-2, 3-13-4, 4-13-3, 1-12-7, 7-12-1, 2-12-6, 6-12-2, 3-12-5, 5-12-3, 4-12-4, 1-11-8, 8-11-1, 2-11-7, 7-11-2, 3-11-6, 6-11-3, 4-11-5, 5-11-4, 1-19-1, 1-18-2, 2-18-1, 1-17-3, 3-17-1, 2-17-2, 1-16-4, 4-16-1, 2-16-3, 3-16-2, 1-15-5, 2-15-4, 4-15-2, 3-15-3, 1-14-6, 6-14-1, 2-14-5, 5-14-2, 3-14-4, 4-14-3, 1-13-7, 7-13-1, 2-13-6, 6-13-2, 3-13-5, 5-13-3, 4-13-4, 1-12-8, 8-12-1, 2-12-7, 7-12-2, 3-12-6, 6-12-3, 4-12-5, 5-12-4, 2-11-8, 8-11-2, 3-11-7, 7-11-3, 4-11-6, 6-11-4, 5-11-5, 1-20-1, 1-19-2, 2-19-1, 1-18-3, 3-18-1, 2-18-2, 1-17-4, 4-17-1, 2-17-3, 3-17-2, 1-16-5, 2-16-4, 4-16-2, 3-16-3, 1-15-6, 6-15-1, 2-15-5, 5-15-2, 3-15-4, 4-15-3, 1-14-7, 7-14-1, 2-14-6, 6-14-2, 3-14-5, 5-14-3, 4-14-4, 1-13-8, 8-13-1, 2-13-7, 7-13-2, 3-13-6, 6-13-3, 4-13-5, 5-13-4, 2-12-8, 8-12-2, 3-12-7, 7-12-3, 4-12-6, 6-12-4, 5-12-5, 3-11-8, 8-11-3, 4-11-7, 7-11-4, 5-11-6, 6-11-5, 1-21-1, 1-20-2, 2-20-1, 1-20-3, 3-19-1, 2-19-2, 1-18-4, 4-18-1, 2-18-3, 3-18-2, 1-17-5, 2-17-4, 4-17-2, 3-17-3, 1-16-6, 6-16-1, 2-16-5, 5-16-2, 3-16-4, 4-16-3, 1-15-7, 7-15-1, 2-15-6, 6-15-2, 3-15-5, 5-15-3, 4-15-4, 1-14-8, 8-14-1, 2-14-7, 7-14-2, 3-14-6, 6-14-3, 4-14-5, 5-14-4, 2-13-8, 8-13-2, 3-13-7, 7-13-3, 4-13-6, 6-13-4, 5-13-5, 1-12-10, 10-12-1, 2-12-9, 9-12-2, 3-12-8, 8-12-3, 4-12-7, 7-12-4, 5-12-6, 6-12-5, 4-11-8, 8-11-4, 5-11-7, 7-11-5, 6-11-6, 1-22-1, 1-21-2, 2-21-1, 1-21-3, 3-20-1, 2-20-2, 1-19-4, 4-19-1, 2-19-3, 3-19-2, 1-18-5, 2-18-4, 4-18-2, 3-18-3, 1-17-6, 6-17-1, 2-17-5, 5-17-2, 3-17-4, 4-17-3, 1-16-7, 7-16-1, 2-16-6, 6-16-2, 3-16-5, 5-16-3, 4-16-4, 1-15-8, 8-15-1, 2-15-7, 7-15-2, 3-15-6, 6-15-3, 4-15-5, 5-15-4, 2-14-8, 8-14-2, 3-14-7, 7-14-3, 4-14-6, 6-14-4, 5-14-5, 3-13-8, 8-13-3, 4-13-7, 7-13-4, 5-13-6, 6-13-5, 4-12-8, 8-12-4, 5-12-7, 7-12-5, 6-12-6, 5-11-8, 8-11-5, 6-11-7 ó 7-11-6. En una realización particular, los oligonucleótidos antisentido de hueco ensanchado de la presente invención tienen un motivo de ala-hueco-ala 2-16-2, 3-14-3 ó 4-12-4.

Como se usa en el presente documento, la expresión “nucleótido modificado de alta afinidad” se refiere a un nucleótido que tiene al menos una base nitrogenada, engarce internucleosídico o resto de azúcar modificado, de modo que la modificación aumenta la afinidad de un compuesto antisentido que comprende el nucleótido modificado por un ácido nucleico diana. Las modificaciones de alta afinidad incluyen, pero sin limitación, BNA, LNA y 2'-MOE.

Como se usa en el presente documento el término “mimético” se refiere a grupos que sustituyen a un azúcar, una base nitrogenada y/o engarce internucleosídico. En general, se usa un mimético en lugar del azúcar o combinación azúcar-engarce internucleosídico, y la base nitrogenada se mantiene para hibridación con una diana seleccionada. Los ejemplos representativos de un mimético de azúcar incluyen, pero sin limitación, ciclohexenilo o morfolino. Los ejemplos representativos de un mimético para una combinación de azúcar-engarce internucleosídico, incluyen, pero sin limitación, ácidos péptido nucleicos (PNA) y grupos morfolino ligados por engarces aquirales no cargados. En algunos casos se usa un mimético en lugar de la base nitrogenada. Los miméticos de base nitrogenada representativos se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, análogos de fenoxazina tricíclica y bases universales (Berger y col., Nuc Acid Res. 2000, 28: 2911-14, incorporado en el presente documento por referencia). Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos de síntesis de miméticos de azúcar, nucleósidos y bases nitrogenadas.

Como se usa en el presente documento, la expresión “nucleósido bicíclico” o “BNA” se refiere a un nucleósido en el que la parte de furanosa del nucleósido incluye un enlace que conecta dos átomos en el anillo de furanosa, formando de este modo un sistema de anillo bicíclico. Los BNA incluyen, pero sin limitación, α -L-LNA, β -D-LNA, ENA, Oxiamino BNA (2'-O-N(CH₃)-CH₂-4') y Aminooxi BNA (2'-N(CH₃)-O-CH₂-4').

Como se usa en el presente documento, la expresión “nucleósido bicíclico 4' a 2'” se refiere a un BNA en el que el enlace que conecta dos átomos del anillo de furanosa enlaza el átomo de carbono 4' y átomo de carbono 2' del anillo de furanosa, formando de este modo un sistema de anillo bicíclico. Las estructuras representativas de BNA incluyen pero sin limitación:



5 Como se usa en el presente documento, un “ácido nucleico bloqueado” o “LNA” se refiere a un nucleótido modificado de modo que el grupo 2'-hidroxilo del anillo de azúcar ribosilo se enlaza con el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar mediante un grupo metileno, formando de este modo un engarce 2'-C,4'-C-oximetileno. Los LNA incluyen, pero sin limitación, α -L-LNA y β -D-LNA.

10 Como se usa en el presente documento, el término “profármaco” se refiere a un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte a una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otros agentes químicos y/o condiciones.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales de compuestos activos que conservan la actividad biológica deseada del compuesto activo y no transmiten efectos toxicológicos no deseados al mismo.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión “estructura de protección” o “resto de protección terminal” se refiere a modificaciones químicas, que se han incorporado en cualquiera de los extremos terminales de un compuesto antisentido.

25 Como se usa en el presente documento, el término “prevención” se refiere a retardar o prevenir la aparición o desarrollo de una afección o enfermedad durante un periodo de tiempo de horas a días, preferentemente de semanas a meses.

30 Como se usa en el presente documento, el término “alivio” se refiere a la reducción de al menos un indicador de la gravedad de una afección o enfermedad. La gravedad de los indicadores puede determinarse por medidas subjetivas u objetivas que se conocen por los expertos en la materia.

35 Como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” se refiere a administrar una composición de la invención para efectuar una alteración o mejora de la afección o enfermedad. La prevención, alivio y/o tratamiento pueden requerir administración de múltiples dosis a intervalos regulares, o antes de la aparición de la enfermedad o afección para alterar el transcurso de la enfermedad o afección. Además, puede usarse un agente sencillo en un individuo sencillo para cada prevención, alivio y tratamiento de una afección o enfermedad de forma secuencial, o simultánea.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente farmacéutico” se refiere a una sustancia que proporciona un beneficio terapéutico cuando se administra a un sujeto.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un animal.

50 Como se usa en el presente documento, “administrar” significa proporcionar un agente farmacéutico a un animal, e incluye, pero sin limitación, administrar por un profesional médico y autoadministrar.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de sustancias adecuada para su administración a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender un oligonucleótido antisentido y una solución acuosa estéril.

60 Como se usa en el presente documento, el término “animal” se refiere a un animal humano o no humano, incluyendo, pero sin limitación, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluyendo, pero sin limitación, monos y chimpancés.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión “administración parenteral” se refiere a administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye, pero sin limitación, administración subcutánea, administración intravenosa o administración intramuscular.

70 Como se usa en el presente documento, la expresión “administración subcutánea” se refiere a administración justo por debajo de la piel. “Administración intravenosa” significa administración en una vena.

75 Como se usa en el presente documento, el término “dosis” se refiere a una cantidad específica de un agente farmacéutico proporcionada en una administración sencilla. En ciertas realizaciones, una dosis puede administrarse en dos o más emboladas, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cuando se desea administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen no fácilmente alojado en una inyección sencilla. En tales realizaciones, puede usarse dos o más inyecciones para conseguir la dosis deseada. En ciertas realizaciones, puede administrarse una dosis en dos o más inyecciones para minimizar la reacción en el sitio de inyección en un individuo.

80 Como se usa en el presente documento, la expresión “unidad de dosificación” se refiere a una forma en la

que se proporciona un agente farmacéutico. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación es un frasco que comprende oligonucleótido antisentido liofilizado. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación es un frasco que comprende oligonucleótido antisentido reconstituido.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “principio activo farmacéutico” se refiere a la sustancia en una composición farmacéutica que proporciona un efecto deseado.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión “efectos secundarios” se refiere a respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento distinto de los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen, sin limitación, reacciones en el sitio de inyección, anomalías de ensayo de función hepática, anomalías de función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central y miopatías. Por ejemplo, niveles de aminotransferasa aumentados en suero pueden indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática. Por ejemplo, la bilirrubina aumentada puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “índice terapéutico” se refiere a alguna medida de actividad o potencia dividida por alguna medida de toxicidad.

20 Como se usa en el presente documento, el término “alquilo”, se refiere a un radical de hidrocarburo lineal o ramificado saturado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Los grupos alquilo típicamente incluyen de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono (alquilo C₁-C₁₂) prefiriéndose más de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La expresión “alquilo inferior” como se usa en el presente documento incluye de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

30 Como se usa en el presente documento, el término “alquenilo”, se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero sin limitación, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alquenilo típicamente incluyen de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono prefiriéndose más de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

35 Como se usa en el presente documento, el término “alquinilo” se refiere a un radical de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero sin limitación, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo y similares. Los grupos alquinilo típicamente incluyen de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono prefiriéndose más de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquinilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

40 Como se usa en el presente documento, el término “aminoalquilo” como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de alquilo amino sustituido. Este término pretende incluir grupos alquilo C₁-C₁₂ que tienen un sustituyente de amino en cualquier posición y en el que el grupo alquilo une el grupo aminoalquilo a la molécula precursora. Las partes de alquilo y/o amino del grupo aminoalquilo puede sustituirse adicionalmente con grupos sustituyentes.

50 Como se usa en el presente documento, el término “alifático” se refiere a un radical hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono en el que la saturación entre dos átomos de carbono cualesquiera es un enlace sencillo, doble o triple. Un grupo alifático contiene preferentemente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono prefiriéndose más de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático puede interrumpirse con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Tales grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen sin limitación polialcoxis, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y poliiminas. Los grupos alifáticos como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

60 Como se usa en el presente documento, el término “alícíclico” o “alíciclilo” se refiere a un sistema de anillo cíclico en el que el anillo es alifático. El sistema de anillo puede comprender uno o más anillos en los que al menos un anillo es alifático. Los alícíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo. Alícíclico como se usa en el presente documento puede incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

65

5 Como se usa en el presente documento, el término “alcoxi” se refiere a un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno en el que el átomo de oxígeno se usa para unir el grupo alcoxi con una molécula precursora. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, pero sin limitación, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, *n*-pentoxi, neopentoxi, *n*-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

10 Como se usa en el presente documento, los términos “halo” y “halógeno”, como se usa en el presente documento, se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

15 Como se usa en el presente documento, los términos “arilo” y “aromático” se refieren a radicales de sistema de anillo carbocíclico mono o policíclico que tienen uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares. Los sistemas de anillo arílico preferidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

20 Como se usa en el presente documento, los términos “aralquilo” y “arilalquilo” se refieren a un radical formado entre un grupo alquilo y un grupo arilo en el que el grupo alquilo se usa para unir el grupo aralquilo con una molécula precursora. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, benzilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales unidos al alquilo, el arilo o ambos grupos que forman el grupo radical.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión “radical heterocíclico” se refiere a un sistema de anillo radical mono- o poli-cíclico que incluye al menos un heteroátomo y está insaturado, parcialmente saturado o completamente saturado, incluyendo de este modo grupos heteroarilo. También se pretende que heterocíclico incluya sistemas de anillos fusionados en los que uno o más de los anillos fusionados contienen al menos un heteroátomo y los otros anillos pueden contener uno o más heteroátomos u opcionalmente no contener heteroátomos. Un grupo heterocíclico típicamente incluye al menos un átomo seleccionado de azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y similares. Los grupos heterocíclicos como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

35 Como se usan en el presente documento, los términos “heteroarilo” y “heteroaromático”, se refieren a un radical que comprende un anillo aromático monocíclico o policíclico, sistema de anillos o sistema de anillos fusionados en el que al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. También se pretende que heteroarilo incluya sistemas de anillos fusionados incluyendo sistemas en los que uno o más de los anillos fusionados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo típicamente incluyen un átomo de anillo seleccionado de azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero sin limitación, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo y similares. Pueden unirse radicales de heteroarilo a una molécula precursora directamente o a través de un resto de enlace tal como un grupo alifático o heteroátomo. Los grupos heteroarilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

45 Como se usa en el presente documento, el término “heteroarilalquilo”, se refiere a un grupo heteroarilo como se ha definido previamente que tiene un radical alqui que puede unir el grupo heteroarilalquilo con una molécula precursora. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, piridinilmetilo, pirimidinilmetilo, naftiridinilpropilo y similares. Los grupos heteroarilalquilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales en una o ambas de las partes de heteroarilo o alquilo.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “estructura mono o policíclica” incluye todos los sistemas de anillo que son sencillos o policíclicos que tienen anillos que están fusionados o ligados y pretende incluir sistemas de anillo sencillos y mixtos seleccionados individualmente de alifático, alicíclico, arilo, heteroarilo, aralquilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroaromático, heteroarilalquilo. Tales estructuras mono y poli cíclicas pueden contener anillos que son uniformes o tienen diversos grados de saturación incluyendo completamente saturados, parcialmente saturados o completamente insaturados. Cada anillo puede comprender átomos de anillos seleccionados de C, N, O y S para dar lugar a anillos heterocíclicos así como anillos que comprenden solamente átomos de anillo C que pueden estar presentes en un motivo mixto tal como por ejemplo bencimidazol en el que un anillo tiene solamente átomos de anillo de carbono y el anillo fusionado tiene dos átomos de nitrógeno. Las estructuras mono o poli cíclicas pueden sustituirse adicionalmente con grupos sustituyentes tales como por ejemplo ftalimida que tiene dos grupos =O unidos a uno de los anillos. En otro aspecto, pueden unirse estructuras mono o poli cíclicas a una molécula parenteral directamente a través de un átomo de anillo, a través de un grupo sustituyente o un resto de enlace bifuncional.

65 Como se usa en el presente documento, el término “acilo”, como se usa en el presente documento, se

refiere a un radical formado por la retirada de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general $C(O)-X$ en la que X es típicamente alifático, alicíclico o aromático. Los ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfínulos aromáticos, sulfínulos alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Los grupos acilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

Como se usa en el presente documento, el término "hidrocarbilo" incluye grupos que comprenden C, O y H. Se incluyen grupos lineales, ramificados y cíclicos que tienen cualquier grado de saturación. Tales grupos hidrocarbilo pueden incluir uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S y pueden mono o poli sustituirse adicionalmente con uno o más grupos sustituyentes.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "sustituyente" y "grupo sustituyente", incluyen grupos que típicamente se añaden a otros grupos o compuestos precursores para potenciar las propiedades deseadas o proporcionar efectos deseados. Los grupos sustituyentes pueden estar protegidos o desprotegidos y pueden añadirse a un sitio disponible o a muchos sitios disponibles en un compuesto precursor. Los grupos sustituyentes también pueden sustituirse adicionalmente con otros grupos sustituyentes y pueden unirse directamente o mediante un grupo de enlace tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo a un compuesto precursor. Tales grupos incluyen sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, acil ($-C(O)R_{aa}$), carboxil ($-C(O)O-R_{aa}$), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxo ($-O-R_{aa}$) sustituido, arilo, aralquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroarilarilo, amino ($-NR_{bb}R_{cc}$), imino ($=NR_{bb}$), amido ($-C(O)NR_{bb}R_{cc}$ o $-N(R_{bb})C(O)R_{aa}$), azido ($-N_3$), nitro ($-NO_2$), ciano ($-CN$), carbamido ($-OC(O)NR_{bb}R_{cc}$ o $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$), ureido ($-N(R_{bb})C(O)NR_{bb}R_{cc}$), tioureido ($-N(R_{bb})C(S)R_{bb}R_{cc}$), guanidinilo ($-N(R_{bb})C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}$), amidinilo ($-C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}$ o $-N(R_{bb})C(NR_{bb})R_{aa}$), tiol ($-SR_{bb}$), sulfínulo ($-S(O)R_{bb}$), sulfonilo ($-S(O)_2R_{bb}$), sulfonamidilo ($-S(O)_2NR_{bb}R_{cc}$ o $-N(R_{bb})S(O)_2R_{bb}$) y grupos conjugados. En los que cada R_{aa} , R_{bb} y R_{cc} es, de forma independiente, H, un grupo funcional químico opcionalmente ligado o un grupo sustituyente adicional incluyendo la lista preferida sin limitación H, alquilo, alqueno, alquino, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilaralquilo.

Visión de conjunto

En ciertas realizaciones, las modificaciones químicas mejoran la potencia y/o eficacia de compuestos antisentido, mejorando el potencial para suministro oral así como potenciando la administración subcutánea, reduciendo el potencial para efectos secundarios y conduciendo a mejoras en la comodidad del paciente. En ciertas realizaciones tales, las modificaciones químicas que aumentan la potencia de compuestos antisentido permiten la administración de dosis inferiores, lo que reduce el potencial de toxicidad, así como la reducción del coste global de la terapia. En ciertas realizaciones, modificaciones que aumentan la resistencia a degradación dan como resultado eliminación más lenta del cuerpo que, en ciertas realizaciones, permite una dosificación menos frecuente.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos que comprenden ciertas modificaciones químicas o motivos son menos tóxicos que otros compuestos oligoméricos que comprenden diferentes modificaciones y/o motivos. En ciertas realizaciones, la administración de tales compuestos oligoméricos da como resultado menor hepatotoxicidad. Con frecuencia es preferible incluir modificaciones químicas en oligonucleótidos para alterar su actividad. Las modificaciones químicas pueden alterar la actividad oligonucleotídica, por ejemplo: aumentando la afinidad de un oligonucleótido antisentido por su ARN diana, aumentando la resistencia a nucleasa y/o alterando la farmacocinética del oligonucleótido. El uso de químicas que aumentan la afinidad de un oligonucleótido por su diana puede permitir el uso de compuestos oligonucleotídicos más cortos. En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que tienen características favorables para administración *in vivo*.

Para abordar la necesidad de compuestos antisentido más potentes con actividad aumentada *in vivo* y menor riesgo de hepatotoxicidad, se han diseñado ciertos compuestos antisentido gapmer de la presente invención. Ciertos oligonucleótidos antisentido gapmer de la presente invención comprenden una región de hueco desoxi, una región ala 5' situada en el extremo 5' del hueco desoxi y una región ala 3' situada en el extremo 3' del hueco desoxi, en las que al menos un nucleósido de al menos una de las regiones ala es LNA (un nucleósido bicíclico 4' a 2') y al menos uno de los nucleósidos de ala restantes es un nucleótido 2'-modificado de alta afinidad no bicíclico. Los nucleótidos modificados de alta afinidad incluyen, pero sin limitación, nucleótidos con modificaciones BNA, LNA o 2'-MOE. Los nucleótidos modificados de alta afinidad no bicíclicos, incluyen, pero sin limitación, nucleótidos 2' modificados. Ciertos compuestos antisentido gapmer tales opcionalmente pueden comprender adicionalmente un grupo conjugado. Ciertos compuestos antisentido gapmer de la presente invención son shortmer y/u oligonucleótidos antisentido de hueco ensanchado.

Ciertos compuestos

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos oligoméricos que comprenden oligonucleótidos. Ciertos oligonucleótidos comprenden nucleósidos ligados de 8 a 30. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden nucleósidos modificados, engarces internucleosídicos modificados y/o grupos conjugados.

Los compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y dan lugar de este modo a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisoméricas que pueden definirse, por lo que respecta a estereoquímica absoluta, como (R) o (S), α o β o como (D) o (L) tal como para aminoácidos y otros. Se incluyen en los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento todos los isómeros posibles tales, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

Ciertos Nucleósidos

En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que comprenden nucleósidos ligados. En ciertas realizaciones, algunos o todos los nucleósidos son nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, uno o más nucleósidos comprenden una base nitrogenada modificada. En ciertas realizaciones, uno o más nucleósidos comprenden un azúcar modificado.

En general, una base nitrogenada es cualquier grupo que contenga uno o más átomos o grupos de átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno con una base de otro ácido nucleico. Además de bases nitrogenadas "no modificadas" o "naturales" tales como las bases nitrogenadas purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases nitrogenadas pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U), son aptas muchas bases nitrogenadas modificadas o miméticos de bases nitrogenadas conocidos por los expertos en la materia con los compuestos descritos en el presente documento. Las expresiones base nitrogenada modificada y mimético de base nitrogenada pueden solapar pero generalmente una base nitrogenada modificada se refiere a una base nitrogenada que es bastante similar en estructura a la base nitrogenada parental, tal como por ejemplo, una 7-deaza purina, una 5-metil-citosina, o una pinza G, mientras que un mimético de base nitrogenada incluiría estructuras más complicadas, tal como por ejemplo, un mimético de base nitrogenada de fenoxazina tricíclica. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos para la preparación de las bases nitrogenadas modificadas anteriormente indicadas.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento comprenden uno o más nucleósidos que tienen un resto de azúcar modificado. En ciertas realizaciones, el anillo de azúcar de furanosilo de un nucleósido natural puede modificarse de varias formas incluyendo, pero sin limitación, adición de un grupo sustituyente, enlace de dos átomos de anillo no germinales para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA) y sustitución con un átomo o grupo tal como -S-, -N(R)- o -C(R₁)(R₂) del oxígeno del anillo en la posición 4'. Se conocen bien restos de azúcar modificados y pueden usarse para alterar, típicamente aumentar, la afinidad del compuesto antisentido por su diana y/o aumentar la resistencia a nucleasa. Una lista representativa de azúcares modificados incluye pero sin limitación azúcares sustituidos no bicíclicos, especialmente azúcares 2' sustituidos no bicíclicos que tienen un grupo sustituyente 2'-F-2'-OCH₃ o 2'-O(CH₂)₂-OCH₃; y azúcares 4'-tio modificados. Los azúcares también pueden reemplazarse con grupos miméticos de azúcar entre otros. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos para las preparaciones de azúcares modificados. Algunas patentes y publicaciones representativas que enseñan la preparación de tales azúcares modificados incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos N^o 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; 5.700.920; y 6.600.032; y el documento WO 2005/121371.

En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden azúcares modificados bicíclicos (BNA), incluyendo LNA (enlace 4'-(CH₂-O-2'), 2'-tio-LNA (enlace 4'-(CH₂-S-2'), 2'-amino-LNA (enlace 4'-(CH₂-NR-2'), ENA (enlace 4'-(CH₂)₂-O-2'), BNA enlazado por 4'-(CH₂)₃-2', BNA enlazado por 4'-(CH₂CH(CH₃))-2', cEt (enlace 4'-(CH(CH₃))-O-2'), y BNA de cMOE (enlace 4'-(CH(CH₂OCH₃))-O-2'). Se han preparado ciertos BNA tales y se han desvelado en la bibliografía de patentes así como en la bibliografía científica (véase por ejemplo, Srivastava, y col. J. Am. Chem. Soc. 2007, publicación online avanzada ACS, 10.1021/ja071106y, Albaek y col. J. Org. Chem., 2006, 71, 7731 - 7740, Fluiter, y col. Chembiochem 2005, 6, 1104-1109, Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y col., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; documento WO 94/14226; documento WO 2005/021570; Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039, documento WO 2007/090071. Los ejemplos de patentes de Estados Unidos expedidas y solicitudes publicadas que desvelan BNA incluyen, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N^o 7.053.207; 6.268.490; 6.770.748; 6.794.499; 7.034.133; y 6.525.191; y Publicaciones Pre-Concesión de Estados Unidos N^o 2004-0171570; 2004-0219565; 2004-0014959; 2003-0207841; 2004-0143114; y 20030082807.

También se proporcionan en el presente documento "Ácidos Nucleicos Bloqueados" (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo del anillo de azúcar de ribosilo se liga con el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar formando de este modo un engarce 2'-C,4'-C-oximetileno para formar el resto de azúcar bicíclico (revisado en Elayadi y col., Curr. Opin. Opin. Drugs. 2001, 2, 558-561; Braasch y col., Chem. Biol., 2001, 8 1-7; y Orum y col., Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; véase también Patentes de Estados Unidos: 6.268.490 y 6.670.461). El engarce puede ser un grupo metileno (-CH₂-) que enlaza el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', para lo que se usa el término LNA para el resto bicíclico; en el caso de un grupo etileno en esta posición, se usa el término ENA[™] (Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; ENA[™]; Morita y col., Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2226). LNA y otros análogos de azúcares bicíclicos presentan estabilidades térmicas de doble cadena muy altas con ADN y

ARN complementarios ($T_m = +3$ a $+10$ °C), estabilidad frente a degradación 3'-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. Se han descrito oligonucleótidos antisentido potentes y no tóxicos que contienen LNA (Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638).

5 Un isómero de LNA que también se ha estudiado es alfa-L-LNA que se ha mostrado que tiene estabilidad superior frente a una 3'-exonucleasa. Los alfa-L-LNA se incorporaron a gapmer antisentido y quimeras que mostraban actividad antisentido potente (Frieden y col., Nucleic Acids Research. 2003, 21, 6365-6372).

10 Se ha descrito la síntesis y preparación de los monómeros de LNA adenina, citosina, guanina, 5-metilcitosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización y propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos (Koshkin y col., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). También se han descrito LNA y preparación de los mismos en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

15 También se han preparado análogos de LNA, fosforotioato-LNA y 2'-tio-LNA (Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito La preparación de análogos de nucleósido bloqueados que contienen dobles cadenas de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para polimerasas de ácido nucleico (Wengel y col., documento WO 99/14226). Además, se ha descrito en la técnica la síntesis de 2'-amino-LNA, un nuevo análogo de oligonucleótido de alta afinidad conformacionalmente restringido (Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-Amino- y 2'-metilamino-LNA y la estabilidad térmica de sus
20 dobles cadenas con hebras de ARN y ADN complementarias se ha indicado previamente.

Ciertos engarces internucleosídicos

25 Se describen en el presente documento grupos de enlace internucleosídicos que enlazan los nucleósidos o unidades monoméricas modificadas de otro modo entre sí formando de este modo un compuesto antisentido. Las dos clases principales de grupos de enlace internucleosídicos se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los engarces internucleosídicos que contienen fósforo representativos incluyen, pero sin limitación, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Los grupos de enlace
30 internucleosídicos que no contienen fósforo representativos incluyen, pero sin limitación, metilmetilimino (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)₂-O-); y N,N'-dimetilhidrazina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). Los compuestos antisentido que tienen grupos de enlace internucleosídicos sin fósforo se denominan oligonucleósidos. Los engarces internucleosídicos modificados, en comparación con engarces fosfodiéster naturales, pueden usarse para alterar, típicamente aumentar, la resistencia a nucleasa del
35 compuesto antisentido. Los engarces internucleosídicos que tienen un átomo quiral pueden prepararse de forma racémica, quiral o como una mezcla. Los engarces internucleosídicos quirales representativos incluyen, pero sin limitación, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los procedimientos de preparación de engarces que contienen fósforo y que no contienen fósforo se conocen bien por los expertos en la materia.

40 En ciertas realizaciones, un grupo fosfato puede ligarse al resto 2', 3' ó 5' hidroxilo del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato se ligan covalentemente a nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Dentro de los oligonucleótidos, se hace referencia habitualmente a los grupos fosfato como formadores de la cadena principal internucleosídica del oligonucleótido. El engarce normal o cadena principal de ARN y ADN es un engarce fosfodiéster 3' a 5'.

45 Ciertos motivos

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son gapmer. En tales realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden una región de hueco central flanqueada por una región ala 3' y una región ala 5'.

50 Ciertas alas

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden un ala 5' y/o un ala 3'. En tales realizaciones, las características del ala 3' y las características del ala 5' se seleccionan de forma independiente. Por lo tanto, en tales realizaciones, el número de nucleósidos en el ala 5' y el número de nucleósidos (longitud) en el ala
55 3' pueden ser los mismos o pueden ser diferentes; las modificaciones, si las hubiera, en el ala 5' pueden ser las mismas que las modificaciones, si las hubiera, en el ala 3' o tales modificaciones, si las hubiera, pueden ser diferentes; y los engarces internucleosídicos en el ala 5' y los engarces internucleosídicos en el ala 3' pueden ser los mismos o pueden ser diferentes.

60 En ciertas realizaciones un ala comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco nucleósidos (es decir, tiene una longitud de 1, 2, 3, 4 ó 5). En ciertas realizaciones, los nucleósidos de un ala están modificados. En ciertas realizaciones tales, los nucleósidos del ala se modifican para aumentar la afinidad del compuesto antisentido por su ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de un ala son nucleósidos o nucleótidos. En ciertas realizaciones tales, los nucleósidos o nucleótidos del ala comprenden una modificación 2'. En ciertas realizaciones
65 tales, los nucleósidos (nucleósidos o nucleótidos) del ala son BNA. En ciertas realizaciones tales, los nucleósidos del

5 ala se seleccionan de α -L-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, β -D-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, Etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, Aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA y Oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de un ala comprenden un sustituyente en la posición 2' seleccionado de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C₁-C₁₀ alquilo, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en las que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones los nucleósidos de un ala son nucleótidos 2'MOE.

10 En ciertas realizaciones, los engarces internucleosídicos en un ala son engarces internucleosídicos de origen natural. En ciertas realizaciones, los engarces internucleosídicos en un ala son engarces internucleosídicos o internucleosídicos de origen no natural. En ciertas realizaciones tales, los engarces internucleosídicos en el ala son más resistentes a una o más nucleasas que los engarces internucleosídicos de origen natural. En ciertas realizaciones tales, los engarces internucleosídicos en el ala son engarces fosforotioato (P=S). En ciertas realizaciones en las que un ala tiene más de un engarce internucleosídico, los engarces internucleosídicos son iguales entre sí. En ciertas realizaciones en las que un ala tiene más de un engarce internucleosídico, los engarces internucleosídicos son diferentes entre sí.

20 Un experto en la materia reconocerá que las características y modificaciones analizadas anteriormente pueden usarse en cualquier combinación para preparar un ala. La tabla a continuación proporciona ejemplos no limitantes que muestran cómo se podría preparar un ala seleccionando un cierto número de nucleósidos, modificaciones de nucleósidos (si las hubiera) y engarces internucleosídicos ambos dentro del ala.

Longitud	Tipo de nucleósido/modificaciones	engarces internucleosídicos dentro del ala
1	2 MOE	Ninguno
1	BNA	Ninguno
1	ENA	Ninguno
1	ENA	Ninguno
2	2' MOE	P=S
2	BNA	P=S
2	ENA	P=S
2	ENA	P=S
2	2' MOE	P=O
2	BNA	P=O
2	ENA	P=O
2	ENA	P=O
3	2' MOE	P=S
3	BNA	P=S
3	ENA	P=S
3	ENA	P=S

45 En ciertas realizaciones en las que un ala comprende dos, tres, cuatro o cinco nucleósidos, esos dos, tres, cuatro o cinco nucleósidos se seleccionan cada uno de forma independiente. Por lo tanto, en ciertas realizaciones en las que un ala comprende dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos, esos dos, tres, cuatro o cinco nucleósidos comprenden todos las mismas modificaciones, si las hubiera. En ciertas realizaciones en las que un ala comprende dos, tres, cuatro o cinco nucleósidos, una o más de esas dos, tres, cuatro o cinco bases nitrogenadas comprende una o más modificaciones que son diferentes de una o más de las modificaciones de uno o más de los nucleósidos restantes.

50 En ciertas realizaciones, uno o más nucleósidos de un ala 5' son diferentes de al menos otro nucleósido del ala 5'.

55 En ciertas realizaciones, uno o más nucleósidos de un ala 3' son diferentes de al menos otro nucleósido del ala 3'.

En ciertas realizaciones, uno o más nucleósidos de un ala 5' son diferentes de al menos un nucleósido de un ala 3'.

60 En ciertas realizaciones, todos los nucleósidos de un ala 5' son diferentes de todos los nucleósidos de un ala 3'.

En ciertas realizaciones, uno o más engarces internucleosídicos de un ala 5' son diferentes de al menos otro engarce internucleosídico del ala 5'.

65 En ciertas realizaciones, uno o más engarces internucleosídicos de un ala 3' son diferentes de al menos

otro engarce internucleosídico del ala 3'.

En ciertas realizaciones, uno o más engarces internucleosídicos de un ala 5' son diferentes de al menos un engarce internucleosídico del ala 3'.

En ciertas realizaciones, todos los engarces internucleosídicos de un ala 5' son diferentes de todos los engarces internucleosídicos del ala 3'.

Ciertas alas mixtas

En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos gapmer en los que al menos un nucleósido de un ala se modifica de forma diferente en comparación con al menos otro nucleósido del mismo ala. Tales compuestos oligoméricos se denominan compuestos oligoméricos de ala mixta. En ciertas realizaciones, las modificaciones (o no modificaciones) de uno o más nucleósidos del ala 3' son diferentes de las de uno o más nucleósidos distintos del ala 3'. Tales compuestos oligoméricos pueden denominarse gapmer de ala mixta 3'. En ciertas realizaciones, las modificaciones (o no modificación) de uno o más nucleósidos del ala 5' son diferentes de las de uno o más nucleósidos diferentes del ala 5'. Tales compuestos oligoméricos pueden denominarse gapmer de ala mixta 5'. En ciertas realizaciones, las modificaciones (o no modificación) de uno o más nucleósidos del ala 3' son diferentes de las de uno o más nucleósidos distintos del ala 3' y las modificaciones (o no modificación) de uno o más nucleósidos del ala 5' son diferentes de las de uno o más nucleósidos distintos del ala 5'. Tales compuestos oligoméricos pueden denominarse gapmer de ala mixta 3', 5'. En tal realización, las modificaciones y combinación de modificaciones en el ala 3' y en el extremo 5' puede ser la misma o pueden ser diferentes.

En ciertas realizaciones, los compuestos de ala mixta tienen propiedades deseables. Ciertas modificaciones de nucleósidos confieren al compuesto oligomérico una propiedad deseable, por ejemplo afinidad aumentada por una diana o resistencia a nucleasa, pero también confieren una propiedad indeseable, por ejemplo toxicidad aumentada. La incorporación de ciertas otras modificaciones de nucleósidos da como resultado compuestos oligoméricos con diferentes perfiles de propiedades. En ciertas realizaciones, se pueden combinar modificaciones en una o ambas alas para optimizar las características deseables y/o minimizar características no deseables. En ciertas realizaciones, las alas de un compuesto oligomérico de ala mixta comprenden uno o más nucleósidos que comprenden una primera modificación que aumenta la afinidad del compuesto oligomérico por un ácido nucleico diana en comparación con un compuesto oligomérico que comprende nucleósidos no modificados; y uno o más nucleósidos que comprenden una segunda modificación que da como resultado toxicidad reducida en comparación con un compuesto oligomérico con alas que comprenden nucleósidos que comprenden todos la primera modificación.

En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico comprende al menos un ala que comprende al menos un nucleósido MOE sustituido y al menos un LNA. En ciertas realizaciones tales, el al menos un nucleósido MOE sustituido y el al menos un LNA están en el ala 3'. En ciertas realizaciones tales, el al menos un nucleósido MOE sustituido y el al menos un LNA están en el ala 5'.

Un experto habitual en la materia reconocerá que las características y modificaciones analizadas anteriormente pueden usarse en cualquier combinación para preparar alas mixtas. La tabla a continuación proporciona ejemplos no limitantes que muestran cómo podrían prepararse oligonucleótidos de ala mixta seleccionando un cierto número de nucleósidos, modificaciones de nucleósidos (si las hubiera) y engarces internucleosídicos dentro de cada ala y entre alas.

ala 5'			ala 3'			
Posición de nucleósido (5' a 3')	Tipo de nucleósido/modificaciones	engarce dentro del ala	Posición de nucleósido (5' a 3')	Tipo de nucleósido/modificaciones	engarce dentro del ala	
5	1 2	MOE BNA	P=S	1 2	LNA LNA	P=S
	1	LNA	Ninguno	1 2	ENA DNA	P=S
10	1 2	ENA MOE	P=O	1	MOE	Ninguno
	1	ENA	Ninguno	1 2	MOE LNA	P=S
15	1 2	MOE LNA	P=S	1 2	MOE LNA	P=S
	1 2	MOE LNA	P=S	1 2	LNA MOE	P=O
	1 2	2'-F Oxiamino BNA	P=S	1	Oxiamino BNA	Ninguno
20	1 2	ENA ENA	P=S	1 2 3	ENA ENA MOE	P=S; P=O
	1 2 3	LNA MOE LNA	P=S; P=S	1 2 3	LNA MOE LNA	P=S; P=S
25	1 2	MOE LNA	P=S	1 2	LNA MOE	P=S

30 Ciertas alas asimétricas

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden alas asimétricas. En tales realizaciones, cada uno de los nucleósidos del ala 3' comprende la misma modificación (o no modificación) y cada uno de los nucleósidos del ala 5' comprende la misma modificación (o no modificación), pero las modificaciones del ala 5' y el ala 3' son diferentes entre sí.

35 Ciertos huecos

40 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden un hueco entre el ala 5' y el ala 3'. En ciertas realizaciones el hueco comprende cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce nucleósidos. En ciertas realizaciones, los nucleósidos del hueco son desoxirribonucleótidos no modificados. En ciertas realizaciones, los nucleósidos del hueco son ribonucleótidos no modificados. En ciertas realizaciones, las modificaciones del hueco (si las hubiera) dan como resultado un compuesto antisentido que, cuando se une a su ácido nucleico diana, soporta la escisión por una RNasa, incluyendo, pero sin limitación, RNasa H.

45 En ciertas realizaciones, los engarces internucleosídicos en el hueco son engarces internucleosídicos de origen natural. En ciertas realizaciones, los engarces internucleosídicos en el hueco son engarces de origen no natural. En ciertas realizaciones tales, los engarces internucleosídicos en el hueco son más resistentes a una o más nucleasas que los engarces internucleosídicos de origen natural. En ciertas realizaciones tales, los engarces internucleosídicos en el hueco son engarces de fosforotioato (P=S). En ciertas realizaciones, los engarces internucleosídicos en el hueco son todos iguales entre sí. En ciertas realizaciones, los engarces internucleosídicos dentro de hueco no son todos iguales.

50 En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 2 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 3 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 4 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 5 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 6 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 7 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 8 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 9 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 10 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 11 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 12 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 13 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 14 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 15 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 16 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 17 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 18 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 19 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos

20 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 22 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 23 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 24 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 25 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el hueco comprende al menos 26 nucleósidos.

5 Un experto habitual en la materia reconocerá las características y modificaciones analizadas anteriormente pueden usarse en cualquier combinación para preparar un hueco. La tabla a continuación proporciona ejemplos no limitantes que muestran cómo podría prepararse un hueco seleccionando un cierto número de nucleósidos, modificaciones de nucleósidos (si las hubiera) y engarces internucleosídicos dentro de la región del hueco.

Longitud	Tipo de nucleósido/modificaciones	engarces internucleosídicos dentro del hueco
5	ADN	P=S
6	ADN	P=S
7	ADN	P=S
8	ADN	P=S
9	ADN	P=S
10	ADN	P=S
11	ADN	P=S
12	ADN	P=S
13	ADN	P=S
14	ADN	P=S
9	ADN	P=O
10	ADN	P=O
11	ADN	P=O
12	ADN	P=O
13	ADN	P=O
16	ADN	P=O
8	ARN	P=S
9	ARN	P=S
10	ARN	P=S
11	ARN	P=S
12	ARN	P=S

Ciertos compuestos oligoméricos con hueco

40 Un experto habitual en la materia reconocerá que en las alas y los huecos analizados anteriormente pueden seleccionarse y después combinarse en una diversidad de combinaciones para generar compuestos oligoméricos con huecos, incluyendo, pero sin limitación, compuestos oligoméricos antisentido con hueco y oligonucleótidos antisentido con hueco. Las características (longitud, modificaciones, engarces) del ala 5' y el ala 3' pueden seleccionarse de forma independiente entre sí. Las características del hueco incluyen al menos una diferencia de modificación en comparación con las características del ala 5' y al menos una diferencia en comparación con las características del ala 3' (es decir, debe haber al menos una diferencia en la modificación entre regiones cercanas para distinguir estas regiones cercanas entre sí). Las características del hueco pueden seleccionarse de otro modo de forma independiente.

50 En ciertas realizaciones, los engarces dentro de un ala y los engarces internucleosídicos dentro del hueco son los mismos. En ciertas realizaciones, los engarces internucleosídicos dentro de un ala y los engarces internucleosídicos dentro del hueco son diferentes. En ciertas realizaciones tales, el engarce internucleosídico que enlaza el ala y el hueco es el mismo que en los engarces monoméricos en el ala. En ciertas realizaciones, el engarce internucleosídico que enlaza el ala y el hueco es el mismo que los engarces internucleosídicos en el hueco. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos tienen engarces uniformes por todo el compuesto. En ciertas realizaciones tales, todos los engarces son engarces fosforotioato (P=S).

60 Un experto en la materia reconocerá que las alas 3', alas 5', huecos y engarces analizados anteriormente pueden usarse en cualquier combinación para preparar un gapmer. La tabla a continuación proporciona ejemplos no limitantes que muestran cómo podría prepararse un gapmer seleccionando de forma independiente características para un ala 5', un hueco, un ala 3' y engarces que enlazan el hueco y cada ala.

	Ala 5'			Hueco				Ala 3'		
	Longitud	Nucleósid	Engarce	Longitud	Nucleósid	Engarce	Engarce	Longitud	Nucleósid	Engarce
5	2	MOE	P=S	6	ADN	P=S	P=S	2	MOE	P=S
	2	BNA	P=S	8	ADN	P=0	P=S	3	BNA	P=S
	1	MOE	Ninguno	10	ADN	P=S	P=S	1	MOE	P=S
	2	MOE	P=S	8	ARN	P=S	P=S	2	MOE	P=S
10	3	ENA	P=S	8	ARN	P=S	P=S	3	MOE	P=S
	3	ADN	P=O	10	ARN	P=S	P=O	3	2'OH	P=O
	2	2-F	P=S	5	ARN	P=S	P=S	2	2'-F	P=S
	1	MOE	P=0	16	ADN	P=O	P=S	4	MOE	P=S

15 En ciertas realizaciones, pueden diseñarse compuestos oligoméricos combinando, por ejemplo, la tabla anterior que ejemplifica ciertos conjuntos de alas mixtas con cualquier hueco.

20 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos oligoméricos de 10 a 25 nucleósidos de longitud. En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que comprenden oligonucleótidos que consisten en nucleósidos ligados X a Y, en los que X e Y se seleccionan cada uno de forma independiente de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, y 50; siempre que X≤Y. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que comprenden oligonucleótidos que consisten en 8 a 9, 8 a 10, 8 a 11, 8 a 12, 8 a 13, 8 a 14, 8 a 15, 8 a 16, 8 a 17, 8 a 18, 8 a 19, 8 a 20, 8 a 21, 8 a 22, 8 a 23, 8 a 24, 8 a 25, 8 a 26, 8 a 27, 8 a 28, 8 a 29, 8 a 30, 9 a 10, 9 a 11, 9 a 12, 9 a 13, 9 a 14, 9 a 15, 9 a 16, 9 a 17, 9 a 18, 9 a 19, 9 a 20, 9 a 21, 9 a 22, 9 a 23, 9 a 24, 9 a 25, 9 a 26, 9 a 27, 9 a 28, 9 a 29, 9 a 30, 10 a 11, 10 a 12, 10 a 13, 10 a 14, 10 a 15, 10 a 16, 10 a 17, 10 a 18, 10 a 19, 10 a 20, 10 a 21, 10 a 22, 10 a 23, 10 a 24, 10 a 25, 10 a 26, 10 a 27, 10 a 28, 10 a 29, 10 a 30, 11 a 12, 11 a 13, 11 a 14, 11 a 15, 11 a 16, 11 a 17, 11 a 18, 11 a 19, 11 a 20, 11 a 21, 11 a 22, 11 a 23, 11 a 24, 11 a 25, 11 a 26, 11 a 27, 11 a 28, 11 a 29, 11 a 30, 12 a 13, 12 a 14, 12 a 15, 12 a 16, 12 a 17, 12 a 18, 12 a 19, 12 a 20, 12 a 21, 12 a 22, 12 a 23, 12 a 24, 12 a 25, 12 a 26, 12 a 27, 12 a 28, 12 a 29, 12 a 30, 13 a 14, 13 a 15, 13 a 16, 13 a 17, 13 a 18, 13 a 19, 13 a 20, 13 a 21, 13 a 22, 13 a 23, 13 a 24, 13 a 25, 13 a 26, 13 a 27, 13 a 28, 13 a 29, 13 a 30, 14 a 15, 14 a 16, 14 a 17, 14 a 18, 14 a 19, 14 a 20, 14 a 21, 14 a 22, 14 a 23, 14 a 24, 14 a 25, 14 a 26, 14 a 27, 14 a 28, 14 a 29, 14 a 30, 15 a 16, 15 a 17, 15 a 18, 15 a 19, 15 a 20, 15 a 21, 15 a 22, 15 a 23, 15 a 24, 15 a 25, 15 a 26, 15 a 27, 15 a 28, 15 a 29, 15 a 30, 16 a 17, 16 a 18, 16 a 19, 16 a 20, 16 a 21, 16 a 22, 16 a 23, 16 a 24, 16 a 25, 16 a 26, 16 a 27, 16 a 28, 16 a 29, 16 a 30, 17 a 18, 17 a 19, 17 a 20, 17 a 21, 17 a 22, 17 a 23, 17 a 24, 17 a 25, 17 a 26, 17 a 27, 17 a 28, 17 a 29, 17 a 30, 18 a 19, 18 a 20, 18 a 21, 18 a 22, 18 a 23, 18 a 24, 18 a 25, 18 a 26, 18 a 27, 18 a 28, 18 a 29, 18 a 30, 19 a 20, 19 a 21, 19 a 22, 19 a 23, 19 a 24, 19 a 25, 19 a 26, 19 a 27, 19 a 28, 19 a 29, 19 a 30, 20 a 21, 20 a 22, 20 a 23, 20 a 24, 20 a 25, 20 a 26, 20 a 27, 20 a 28, 20 a 29, 20 a 30, 21 a 22, 21 a 23, 21 a 24, 21 a 25, 21 a 26, 21 a 27, 21 a 28, 21 a 29, 21 a 30, 22 a 23, 22 a 24, 22 a 25, 22 a 26, 22 a 27, 22 a 28, 22 a 29, 22 a 30, 23 a 24, 23 a 25, 23 a 26, 23 a 27, 23 a 28, 23 a 29, 23 a 30, 24 a 25, 24 a 26, 24 a 27, 24 a 28, 24 a 29, 24 a 30, 25 a 26, 25 a 27, 25 a 28, 25 a 29, 25 a 30, 26 a 27, 26 a 28, 26 a 29, 26 a 30, 27 a 28, 27 a 29, 27 a 30, 28 a 29, 28 a 30, o 29 a 30, nucleósidos ligados.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son gapmer de alas mixtas. En ciertas realizaciones tales, una o ambas alas de compuestos oligoméricos comprenden uno o más nucleósidos 2' sustituidos no bicíclicos y uno o más nucleósidos BNA. Tales motivos incluyen, pero sin limitación:

- 50 2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-BNA;
- 2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-2'mod;
- BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-BNA;
- BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-2'mod;
- BNA-(ADN)₄₋₂₀-2'mod -BNA;
- BNA -(ADN)₄₋₂₀-BNA-2'-mod;
- 2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-BNA-2'mod;
- 2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-2'mod -BNA;
- 2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-BNA-BNA;
- 2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-2'mod -2'mod;
- 55 BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-BNA-2'mod;
- BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-2'mod -BNA;
- 60 BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-BNA-BNA;
- BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-2'mod -2'mod;
- 2'mod -2'mod -(ADN)₄₋₂₀-2'mod -BNA;
- 2'mod -2'mod -(ADN)₄₋₂₀-BNA-2'mod;
- 2'mod -2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-BNA-2'mod;
- 65 2'mod -2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-2'mod -BNA;

2'mod -2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-BNA-BNA;
 2'mod -2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-2'mod -2'mod;
 2'mod -BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-BNA-2'mod;
 2'mod -BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-2'mod -BNA:
 5 2'mod -BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-BNA-BNA;
 2'mod -BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀-2'mod -2'mod;
 2'mod -2'mod -2'mod -(ADN)₄₋₂₀-2'mod -BNA;
 2'mod -2'mod -2'mod -(ADN)₄₋₂₀-BNA-2'mod;
 10 2'mold -2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀-2'mod -BNA-2'mod;
 2'mold -2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -2'mod -BNA;
 2'mod -2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -BNA-BNA;
 2'mod -2'mod -BNA-(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -2'mod -2'mod;
 2'mod -BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -BNA-2'mod;
 15 2'mod -BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -2'mod -BNA:
 2'mod -BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -BNA-BNA:
 2'mod -BNA-2'mod -(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -2'mod -2'mod;
 2'mod -2'mod -2'mod -(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -2'mod -BNA; y
 2'mod -2'mod -2'mod -(ADN)₄₋₂₀- 2'mod -BNA-2'mod;

20 en los que "2'mod" es cualquier nucleósido modificado no bicíclico que comprende un sustituyente en la posición 2' y
 "BNA" es cualquier ácido nucleico bicíclico. En ciertas realizaciones, el 2'mod se selecciona de MOE, 2'-F, 2'-alquilo
 y 2'-O-alquilo y el BNA se selecciona de α -L-LNA, β -D-LNA, ENA, Oxiamino BNA (2'-O-N(CH₃)-CH₂-4') y Aminooxi
 BNA (2'-N(CH₃)-O-CH₂-4'). En realizaciones que comprenden dos o más nucleósidos 2'mod cada uno de esos dos o
 25 más nucleósidos 2'mod se selecciona de forma independiente y por lo tanto pueden ser los mismos o diferentes
 entre sí. En realizaciones que comprenden dos o más nucleósidos BNA cada uno de esos dos o más nucleósidos
 BNA se selecciona de forma independiente y por lo tanto pueden ser los mismos o diferentes entre sí. En ciertas
 realizaciones, cada "2'mod" en la lista anterior representa un MOE y cada "BNA" en la lista anterior representa un
 LNA.

30 Ciertos nucleósidos, tales como ciertos nucleósidos BNA, confieren potencia y/o actividad aumentada en un
 compuesto oligomérico en relación con otros nucleósidos, tales como MOE, pero también confieren toxicidad
 aumentada. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos que comprenden alas mixtas tienen mejor
 potencia que los compuestos oligoméricos con alas MOE uniformes y menos toxicidad que compuestos de BNA
 35 uniformes. En ciertas de tales realizaciones, los compuestos oligoméricos de ala mixta tienen índices terapéuticos
 mayores que los compuestos oligoméricos que comprenden alas BNA uniformes o compuestos oligoméricos que
 comprenden alas MOE uniformes. En ciertas realizaciones tales, el BNA se selecciona de α -L-LNA, β -D-LNA, ENA,
 Oxiamino BNA (2'-ON(CH₃)-CH₂-4') y Aminooxi BNA (2'-N(CH₃)-O-CH₂-4'). En ciertas realizaciones, tales
 compuestos oligoméricos comprenden cadenas principales mixtas. En ciertas realizaciones, tales compuestos
 40 oligoméricos comprenden cadenas principales uniformes. En ciertas realizaciones al menos un engarce
 internucleosídico es un fosforotioato. En ciertas realizaciones cada engarce internucleosídico es un fosforotioato.

Grupos conjugados

45 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos se modifican por enlace covalente de uno o más
 grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico
 unido incluyendo, pero sin limitación farmacodinámica, farmacocinética, unión, absorción, distribución celular,
 captación celular, carga y eliminación. Los grupos conjugados se usan rutinariamente en la técnica química y se
 50 ligan directamente o mediante un resto de enlace opcional o grupo de enlace con un compuesto precursor tal como
 un compuesto oligomérico. Una lista preferida de grupos conjugados incluye, sin limitación, intercaladores,
 moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolesteroles,
 restos de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano,
 acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y colorantes.

55 Ciertos grupos conjugados aptos para la presente invención incluyen restos lipídicos tales como un resto de
 colesterol (Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553); ácido cólico (Manoharan y col., Bioorg. Med.
 Chem. Lett., 1994, 4, 1053); un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan y col., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992,
 660, 306; Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765); un tiocolesterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids
 Res., 1992, 20, 533); una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o restos de undecilo (Saison-Behmoaras y col.
 EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanov y col., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk y col., Biochimie, 1993, 75, 49): un
 60 fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio-1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato
 (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea y col., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777); una poliamina
 o una cadena de polietilenglicol (Manoharan y col., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969); ácido adamantano
 acético (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651); un resto de palmitilo (Mishra y col., Biochim. Biophys.
 Acta, 1995, 1264, 229); o un resto de octadecilamino o hexilaminocarbonil-oxicolesterol (Crooke y col., J. Pharmacol.
 65 Exp. Ther., 1996, 277, 923).

Los grupos de enlace o restos de enlace bifuncionales tales como los conocidos en la técnica son aptos para los compuestos proporcionados en el presente documento. Los grupos de enlace son útiles para unión de grupos funcionales químicos, grupos conjugados, grupos indicadores y otros grupos con sitios selectivos en un compuesto precursor tal como por ejemplo un compuesto oligomérico. En general, un resto de enlace bifuncional comprende un resto de hidrocarbilo que tiene dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona para unir con una molécula precursora o compuesto de interés y el otro se selecciona para unir esencialmente cualquier grupo seleccionado tal como grupo funcional químico o un grupo conjugado. En algunas realizaciones, el engarce comprende una estructura de cadena o un oligómero de unidades repetidas tales como unidades de etilenglicol o aminoácidos. Los ejemplos de grupos funcionales que se usan rutinariamente en un resto de enlace bifuncional incluyen, pero sin limitación, electrófilos para reaccionar con grupos nucleófilos, y nucleófilos para reaccionar con grupos electrófilos. En algunas realizaciones, los restos de enlace bifuncionales incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, dobles o triples enlaces) y similares. Algunos ejemplos no limitaciones de restos de enlace bifuncionales incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxato (SMCC) y ácido 6-aminohexanoico (AHX o AHA). Otros grupos de enlace incluyen, pero sin limitación, alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, en los que una lista no limitante de grupos sustituyentes preferidos incluye hidroxil, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

20 Mecanismos antisentido

En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que son compuestos antisentido. Los mecanismos antisentido son todos los que implican la hibridación de un compuesto con ácido nucleico diana, en los que el efecto o resultado de la hibridación es degradación u ocupación de diana con parada conjunta de la maquinaria celular e implica por ejemplo, transcripción o corte y empalme.

En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención ejercen un efecto biológico a través de RNasa H, que es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de una doble cadena ARN:ADN. Se sabe en la técnica que los compuestos antisentido monocatenarios que son "de tipo ADN" inducen RNasa H. La activación de RNasa H, por lo tanto, da como resultado escisión de la diana de ARN, potenciando en gran medida de este modo la eficacia de la inhibición mediada por oligonucleótido de tipo ADN de la expresión génica. Se sabe que los gapmer son capaces de inducir escisión por RNasa H siempre que el hueco sea del tipo ADN y de al menos 4 nucleótidos de longitud.

Los mecanismos antisentido se basan en la hibridación del compuesto oligomérico antisentido con el ácido nucleico diana. En consecuencia, en ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que son complementarios de un ácido nucleico diana.

Como se usa en el presente documento "dirección" o "dirigido a" se refiere al procedimiento de diseñar un compuesto oligomérico de modo que el compuesto hibride específicamente con una molécula de ácido nucleico seleccionada.

"Dirigir" un compuesto oligomérico a una molécula de ácido nucleico diana particular puede ser un procedimiento multietapa. El procedimiento habitualmente comienza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya expresión debe modularse. Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico diana" y "ácido nucleico que codifica un gen diana" abarcan ADN que codifica un gen diana seleccionado, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm) transcrito de dicho ADN y también ADNc derivado de dicho ARN. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión se asocia con un trastorno o patología particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso.

Un experto en la materia será capaz de diseñar, sintetizar y explorar compuestos oligoméricos de diferentes secuencias de bases nitrogenadas para identificar una secuencia que dé como resultado actividad antisentido. Por ejemplo, puede diseñarse un compuesto oligomérico que inhibe la expresión de una proteína diana. Pueden encontrarse procedimientos para diseñar, sintetizar y explorar compuestos oligoméricos con respecto a actividad antisentido contra un ácido nucleico diana preseleccionado, por ejemplo en "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" editado por Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida, que se incorpora por referencia en su totalidad para cualquier fin.

60 **Complementariedad**

Un experto en la materia reconoce que la inclusión de emparejamientos erróneos es posible sin eliminar la actividad del compuesto antisentido. Por lo tanto, se describen en el presente documento compuestos antisentido que pueden contener hasta aproximadamente 20 % de nucleótidos que interrumpen la formación de pares de bases del compuesto antisentido con la diana. Preferentemente los compuestos no contienen más de aproximadamente 15 %, más preferentemente no más de aproximadamente 10 %, más preferentemente no más del 5 % o ningún

emparejamiento erróneo. Los nucleótidos restantes no interrumpen la hibridación (por ejemplo, bases universales). Un experto en la materia reconocería que los compuestos proporcionados en el presente documento son al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % complementarios de un ácido nucleico diana. El porcentaje de complementariedad de un oligonucleótido se calcula dividiendo el número de bases nitrogenadas complementarias por el número total de bases nitrogenadas del oligonucleótido. El porcentaje de complementariedad de una región de un oligonucleótido se calcula dividiendo el número de bases nitrogenadas complementarias en la región por el número total de bases nitrogenadas en la región.

Se entiende en la técnica que la incorporación de modificaciones de afinidad de nucleótidos puede permitir un mayor número de emparejamientos erróneos en comparación con un compuesto no modificado. De forma similar, ciertas secuencias oligonucleotídicas pueden ser más tolerantes a emparejamientos erróneos que otras secuencias oligonucleotídicas. Un experto en la materia es capaz de determinar un número apropiado de emparejamientos erróneos entre oligonucleótidos, o entre un oligonucleótido y un ácido nucleico diana, tal como determinando la temperatura de fusión (T_m). T_m o ΔT_m puede calcularse por técnicas que son familiares para un experto habitual en la materia. Por ejemplo, las técnicas descritas en Freier y col. (Nucleic Acids Research, 1997, 25, 22: 4429-4443) permiten que el experto en la materia evalúe modificaciones de nucleótidos con respecto a su capacidad para aumentar la temperatura de fusión de una doble cadena ARN: ADN.

Identidad

Los compuestos antisentido, o una parte de los mismos, pueden tener un porcentaje de identidad definido con una SEC ID N^o, o un compuesto que tenga un número de Isis específico. Como se usa en el presente documento, una secuencia es idéntica a la secuencia desvelada en el presente documento si tiene la misma capacidad de formación de pares de bases nitrogenadas. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en las secuencias desveladas de los compuestos descritos en el presente documento se consideraría idéntico puesto que ambos se emparejan con adenina. Esta identidad puede ser a lo largo de la longitud completa del compuesto oligomérico o en una parte del compuesto antisentido (por ejemplo bases nitrogenadas 1-20 de un 27-mer puede compararse con un 20-mer para determinar el porcentaje de identidad del compuesto oligomérico con la SEC ID N^o). Se entiende por los expertos en la materia que un compuesto antisentido no necesita tener una secuencia idéntica a las descritas en el presente documento para actuar de forma similar al compuesto antisentido descrito en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento versiones acortadas de compuestos antisentido enseñados en el presente documento o versiones no idénticas de los compuestos antisentido enseñados en el presente documento. Las versiones no idénticas son en las que cada base no tiene la misma actividad de formación de pares que los compuestos antisentido desvelados en el presente documento. Las bases no tienen la misma actividad de formación de pares por ser más cortas o tener al menos un sitio abásico. Como alternativa, una versión idéntica puede incluir al menos una base remplazada con una base diferente con diferente actividad de formación de pares (por ejemplo, G puede remplazarse por C, A o T). El porcentaje de identidad se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen formación de pares de bases idéntica correspondiente a la SEC ID N^o o el compuesto antisentido con el que se compara. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes entre sí, dispersadas a lo largo del oligonucleótido, o ambas.

Por ejemplo, un 16-mer que tiene la misma secuencia que las bases nitrogenadas 2-17 de un 20-mer es 80 % idéntico al 20-mer. Como alternativa, un 20-mer que contiene cuatro bases nitrogenadas no idénticas al 20-mer también es 80 % idéntico al 20-mer. Un 14-mer que tiene la misma secuencia que las bases nitrogenadas 1-14 de un 18-mer es 78 % idéntica al 18-mer. Tales cálculos están dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

El porcentaje de identidad se basa en el porcentaje de bases nitrogenadas en la secuencia original presentes en una parte de la secuencia modificada. Por lo tanto, un compuesto antisentido de 30 bases nitrogenadas que comprende la secuencia completa del complemento de un segmento diana activo de 20 bases nitrogenadas tendría una parte de 100 % de identidad con el complemento de un segmento diana activo de 20 bases nitrogenadas, comprendiendo aún además una parte de 10 bases nitrogenadas adicional. En el contexto de la presente descripción, el complemento de un segmento diana activo puede constituir una parte sencilla. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos proporcionados en el presente documento son al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idénticos a al menos una parte del complemento de los segmentos diana activos presentados en el presente documento. El porcentaje de identidad de un oligonucleótido se calcula dividiendo el número de bases nitrogenadas idénticas por el número total de bases nitrogenadas del oligonucleótido. El porcentaje de identidad de una región de un oligonucleótido se calcula dividiendo el número de bases nitrogenadas con identidad en la región por el número total de bases nitrogenadas de la región.

Síntesis de oligómero

En ciertas realizaciones, se proporcionan en el presente documento compuestos que tienen grupos de fósforo reactivos útiles para formar engarces internucleosídicos incluyendo por ejemplo enlaces internucleosídicos fosfodiéster y fosforotioato. Los procedimientos de preparación y/o purificación de precursores o compuestos

antisentido no son una limitación de las composiciones o procedimientos proporcionados en el presente documento. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos para síntesis y purificación de ADN, ARN y los compuestos antisentido.

5 La oligomerización de nucleósidos modificados y no modificados puede realizarse de forma rutinaria de acuerdo con procedimientos de la bibliografía para ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait y col., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo y col., Tetrahedron (2001), 57, 5707-577133).

10 Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento pueden prepararse de forma conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis de fase sólida. El equipamiento para dicha síntesis se vende por varios distribuidores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Puede emplearse adicionalmente o como alternativa cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la materia. Se conoce bien el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Purificación y análisis de oligómeros

20 Se conocen procedimientos de purificación y análisis de oligonucleótidos por los expertos en la materia. Los procedimientos de análisis incluyen electroforesis capilar (CE) y espectroscopía de masas por electronebulización. Dichos procedimientos de síntesis y análisis pueden realizarse en placas de multipocillos.

Sales, profármacos y bioequivalentes

25 Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento comprenden cualquier sal, éster o sal de dicho éster farmacéuticamente aceptable o cualquier otro equivalente químico funcional que, tras su administración a un animal incluyendo un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o resto del mismo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación también se refiere a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes.

30 El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva o menos activa que se convierte a una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o células del mismo por la acción de enzimas, agentes químicos y/o condiciones endógenas. En particular, las versiones de profármaco de los oligonucleótidos se preparan como derivados de SATE ((S-acetil-2-tioetil)fosfato) de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento WO 93/24510 o documento WO 94/26764. Los profármacos también pueden incluir compuestos antisentido en los que uno o ambos extremos comprenden bases nitrogenadas que se escinden (por ejemplo, incorporando engarces de cadena principal fosfodiéster en los extremos) para producir el compuesto activo.

40 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento; es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no transmiten efectos toxicológicos no deseados al mismo. Las sales de sodio de oligonucleótidos antisentido son útiles y están bien aceptadas para administración terapéutica a seres humanos. En otra realización, también se proporcionan sales de sodio de compuestos de ARNbc.

Formulaciones

50 Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos.

55 También se describen en el presente documento composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a tratar. En una realización preferida, la administración es tópica en la superficie del tracto respiratorio, particularmente pulmonar, por ejemplo, por nebulización, inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, por la boca y/o la nariz.

60 Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, que pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el vehículo o vehículos farmacéuticos o excipiente o excipientes. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de forma uniforme e íntima los principios activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, modelando el producto (por ejemplo, a un tamaño de partícula específico para suministro). En una realización preferida, las formulaciones farmacéuticas se preparan para

65

5 administración pulmonar en un disolvente apropiado, por ejemplo, agua o solución salina normal, posiblemente en una formulación estéril con vehículos u otros agentes para permitir la formación de gotas del diámetro deseado para suministro usando inhaladores, dispositivos de suministro nasal, nebulizadores y otros dispositivos para suministro pulmonar. Como alternativa, las formulaciones farmacéuticas pueden formularse como polvos secos para su uso en inhaladores de polvo seco.

10 Un “vehículo farmacéutico” o “excipiente” puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal y se conocen en la técnica. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta la manera planeada de administración, para proporcionar el volumen, consistencia deseados, etc., cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada.

Combinaciones

15 Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener dos o más compuestos antisentido. En otra realización relacionada, las composiciones 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. Como alternativa, las composiciones pueden contener 20 dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente. Las composiciones también pueden combinarse con otros agentes terapéuticos de compuesto no antisentido.

Kits, reactivos de investigación y diagnóstico

25 Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento pueden utilizarse para diagnóstico, y como reactivos y kits de investigación. Además, los compuestos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica o modular la expresión génica con especificidad, con frecuencia se usan por los expertos en la materia para dilucidar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una ruta biológica.

30 Para su uso en kits y diagnóstico, los compuestos antisentido descritos en el presente documento, solos o en combinación con otros compuestos o agentes terapéuticos, pueden usarse como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para dilucidar los patrones de expresión de una parte o el complemento completo de genes expresados dentro de células y tejidos. Los procedimientos de análisis de expresión génica se conocen bien por los expertos en la materia.

Agentes terapéuticos

40 Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento pueden usarse para modular la expresión de un gen diana en un animal, tal como un ser humano. Los compuestos proporcionados también pueden usarse para tratar trastornos metabólicos o modular uno o más indicios de enfermedad. En una realización no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar a dicho animal que necesite terapia para una enfermedad o afección asociada con un gen diana una cantidad eficaz de un compuesto antisentido que module la expresión del gen diana. Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento que modulan de 45 forma eficaz la expresión de un ARN diana o productos proteicos de expresión se consideran compuestos antisentido activos. Los compuestos antisentido activos también incluyen compuestos que modulan de forma eficaz uno o más de varios indicios de enfermedad, incluyendo indicios de enfermedad metabólicos y cardiovasculares, de los que se describen ejemplos posteriormente.

50 La modulación de la expresión de un gen diana puede medirse en un fluido corporal, que puede o no contener células, tejido u órgano del animal. Los procedimientos para obtener muestras para análisis, tales como fluidos corporales (por ejemplo, esputo, suero, orina), tejidos (por ejemplo, biopsia), u órganos, y procedimientos para la preparación de las muestras para posibilitar el análisis se conocen bien por los expertos en la materia. Se han analizado anteriormente procedimientos para análisis de niveles de ARN y proteínas y se conocen bien por los 55 expertos en la materia. Los efectos del tratamiento pueden evaluarse midiendo biomarcadores, o indicios de enfermedad, asociados con la expresión del gen diana en los fluidos, tejidos u órganos anteriormente mencionados, recogidos de un animal puesto en contacto con uno o más compuestos descritos en el presente documento, por procedimientos clínicos rutinarios conocidos en la materia. Estos biomarcadores incluyen pero sin limitación: transaminasas de hígado, bilirrubina, albúmina, nitrógeno de la urea en sangre, creatina y otros marcadores de 60 función renal y hepática: interleucinas, factores de necrosis tumoral, moléculas de adhesión intracelular, proteína sensible a C, quimiocinas, citocinas y otros marcadores de inflamación.

65 Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos para obtener muestras de suero o plasma para análisis y procedimientos de preparación de las muestras de suero para posibilitar el análisis. Con respecto a mediciones de lipoproteínas, colesterol, triglicéridos y colesterol ésteres, los términos “suero” y “plasma” se usan en

el presente documento de forma intercambiable.

Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes aceptables se conocen bien por los expertos en la materia. La selección de un diluyente o vehículo se basa en varios factores, incluyendo, pero sin limitación, la solubilidad del compuesto y la vía de administración. Tales consideraciones se entienden bien por los expertos en la materia. En un aspecto, los compuestos antisentido descritos en el presente documento inhiben la expresión de un gen diana. Los compuestos también pueden usarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con un gen diana.

También se contemplan procedimientos por los que los fluidos corporales, órganos o tejidos se ponen en contacto con una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos antisentido o composiciones proporcionadas en el presente documento. Los fluidos corporales, órganos o tejidos pueden ponerse en contacto con uno o más de los compuestos dando como resultado modulación de la expresión del gen diana en las células de fluidos corporales, órganos o tejidos. Puede determinarse una cantidad eficaz controlando el efecto modulador del compuesto o compuestos antisentido o composiciones en ácidos nucleicos diana o sus productos por procedimientos rutinarios para el experto en la materia.

Divulgación no limitante e incorporación por referencia

Aunque ciertos compuestos, composiciones y procedimientos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos descritos en el presente documento y no se pretende que limiten los mismos.

Ejemplos

General

Se ha anotado que las secuencias enumeradas en los ejemplos indican la localización y tipo de modificaciones de nucleósidos y grupos conjugados. Todos los nucleósidos que no se anotan son β -D-desoxirribonucleósidos. Cada nucleósido modificado está precedido de una letra en subíndice o una letra seguida de un número indicando la letra el tipo de modificación e indicando el número una modificación adicional en una posición particular. En particular, el subíndice "m" indica un grupo 2'-O-metilo; subíndice "l" indica un nucleósido bicíclico que tiene un enlace 4'-CH₂-O-2', también denominado LNA; el subíndice "g" indica un nucleósido bicíclico que tiene un enlace 4'-(CH₂)₂-O-2', también denominado ENA; el subíndice "#1" (# es 5 ó 6) indica un nucleósido bicíclico que tiene un enlace 4'-CH-O-2' (LNA) que tiene un grupo sustituyente adicional localizado en la posición 5' o 6' del nucleósido bicíclico que también puede ser (*R*) o (*S*) quiral; el subíndice "e" indica grupo 2'-O-metoxietilo (MEO); el subíndice "a" indica un grupo 2'-O-*N*-metilacetamido (2'-O-CH₂C(=O)NHCH₃); el superíndice "me" que precede a un resto de citosina indica una 5-metil citosina; y C₁₆ indica un grupo conjugado C₁₆ unido al extremo 5' terminal del compuesto oligomérico mediante un engarce de diamida (5'-OCH₂C(=O)N(H)(CH₂)₄N(H)C(=O)-(CH₂)₁₄CH₃). Por ejemplo U_e es una uridina modificada que tiene un grupo 2'-O-metoxietilo y U₅₁ es una uridina modificada con LNA que tiene un sustituyente adicional en la posición 5'. La lista de secuencias que acompaña al presente documento proporciona ciertas secuencias de ácido nucleico independientes de modificación química. Aunque esa lista identifica cada secuencia como "ARN" o "ADN" según se requiera, esas secuencias pueden modificarse con cualquier combinación de modificaciones y/o motivos químicos.

Ejemplo 1

Cultivo celular y tratamiento con compuestos oligoméricos

El efecto de los compuestos oligoméricos en la expresión de ácido nucleico diana puede ensayarse en una cualquiera de varias líneas celulares primarias o cultivadas. Las líneas celulares pueden obtenerse de fuentes disponibles públicamente, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Las células se cultivan de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia.

Cuando las células alcanzaron la confluencia apropiada, se trataron con oligonucleótido usando Lipofectin™ como se describe. Cuando las células alcanzaron 65-75 % de confluencia, se trataron con oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcló con LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio de suero reducido Opti-MEM™-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para conseguir la concentración deseada de oligonucleótido y una concentración de LIPOFECTIN™ de 2,5 ó 3 μ g/ml por oligonucleótido 100 nM. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 0,5 horas. Para células cultivadas en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavaron una vez con 100 μ l de OPTI-MEM™-1 y se trataron después con 130 μ l de la mezcla de transfección. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos u otras placas de cultivo tisular convencionales se trataron de forma similar, usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido. Las células

se trataron y los datos se obtuvieron por duplicado o triplicado. Después de aproximadamente 4-7 horas de tratamiento a 37 °C, el medio que contenía la mezcla de transfección se reemplazó con medio de cultivo nuevo. Las células se recogieron 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótido.

5 Se usaron oligonucleótidos control para determinar la concentración de compuesto oligomérico óptima para una línea celular particular. Además, cuando se ensayaron compuestos oligoméricos en experimentos de exploración de compuesto oligomérico o ensayos fenotípicos, se ensayaron oligonucleótidos de control en paralelo.

10 La concentración de oligonucleótido usado varía entre líneas celulares. Para determinar la concentración de oligonucleótidos óptima para una línea celular particular, las células se tratan con un oligonucleótido de control positivo a un intervalo de concentraciones. La concentración de oligonucleótido de control positivo que da como resultado 80 % de inhibición del ARNm diana se utiliza después como la concentración de exploración para nuevos oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se consigue 80 % de inhibición, se utiliza después la concentración menor de oligonucleótido de control positivo que da como resultado 60 % de inhibición del ARNm diana como la concentración de exploración de oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se consigue 60 % de inhibición, esa línea celular particular se considera inadecuada para experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de oligonucleótidos antisentido usadas en el presente documento son de 50 nM a 300 nM cuando el oligonucleótido antisentido se transfecta usando un reactivo de liposomas 1 µM a 40 µM cuando el oligonucleótido antisentido se transfecta por electroporación.

20

Ejemplo 2

Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de ARNm diana

25 Se consiguió cuantificación de los niveles de ARNm diana por PCR cuantitativa en tiempo real usando el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM™ 7600, 7700 ó 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 Antes del análisis por PCR cuantitativa, se evaluaron conjuntos de cebador-sonda específicos para el gen diana que se mide con respecto a su capacidad para “combinarse” con una reacción de amplificación de GAPDH. Después del aislamiento el ARN se somete a la acción de transcriptasa inversa secuencial (RT) y PCR a tiempo real, ambas de las cuales se realizan en el mismo pocillo. Se obtuvieron reactivos de RT y PCR de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). Se llevó a cabo RT, PCR en tiempo real en el mismo añadiendo 20 µl de cóctel de PCR (tampón de PCR 2,5 x menos MgCl₂, MgCl₂ 6,6 mM, 375 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, 375 nM de cada uno de cebador directo y cebador inverso, sonda 125 nM, 4 Unidades de inhibidor de RNasa, 1,25 Unidades de PLATINUM® Taq, 5 Unidades de transcriptasa inversa MuLV y colorante ROX 2,5x) a placas de 96 pocillos que contenían 30 µl de solución de ARN total (20-200 ng). La reacción de RT se llevó a cabo por incubación durante 30 minutos a 48 °C. Después de una incubación de 10 minutos a 95 °C para activar la PLATINUM® Taq, se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido de 60 °C durante 1,5 minutos (hibridación/extensión).

40

45 Las cantidades diana del gen obtenidas por RT PCR a tiempo real se normalizaron usando el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o cuantificando ARN total usando RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH se cuantificó por RT PCR en tiempo real, procesándola simultáneamente con la diana, combinando o de forma separada. El ARN total se cuantificó usando reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR).

50 Se pipetearon 170 µl de reactivo de trabajo RiboGreen™ (reactivo RiboGreen™ diluido 1:350 en Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) en una placa de 96 pocillos que contenían 30 µl de ARN celular purificado. La placa se leyó en un CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm.

55 Las sondas de PCR de GAPDH tienen JOE ligado covalentemente con el extremo 5' y TAMRA o MGB ligado covalentemente con el extremo 3', siendo JOE el colorante indicador fluorescente y siendo TAMRA o MGB el colorante interruptor. En algunos tipos celulares, se usan cebadores y sonda diseñados para una secuencia de GAPDH de una especie diferente para medir la expresión de GAPDH. Por ejemplo, se usa un conjunto de sonda y cebador de GAPDH humana para medir expresión de GAPDH en células y líneas celulares derivadas de mono.

60 Se diseñaron sondas y cebadores para su uso en PCR en tiempo real para hibridar con secuencias específicas de diana. Las secuencias de cebador y sonda y los genes diana con los que hibridan se presentan en la Tabla 1. Las sondas de PCR específicas de diana tienen FAM ligado covalentemente con el extremo 5' y TAMRA o MGB ligado covalentemente con el extremo 3', siendo FAM el colorante fluorescente y siendo TAMRA o MGB el colorante interruptor.

65

Tabla 1

Cebadores y sondas específicos de diana para su uso en PCR en tiempo real					
Nombre de diana	Especie	Descripción de la secuencia	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	
PTEN	Ratón	Cebador directo	GCCACAGGCTCCCAGACAT	1	
PTEN	Ratón	Cebador inverso	TCCATCCTCTTGATATCTCCTTTTG	2	
PTEN	Ratón	Sonda	ACAGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAA	3	
PTEN	Ratón	Cebador directo	ATGACAATCATGTTGCAGCAATTC	4	
PTEN	Ratón	Cebador inverso	CGATGCAATAAATATGCACAAATCA	5	
PTEN	Ratón	Sonda	CTGTAAAGCTGGAAAGGGACGGACTGGT	6	

Ejemplo 3

Compuestos antisentido Gapmer 2-10-2 modificados con LNA corto con diversos números de modificaciones de Ala 2'-MOE que se dirigen a PTEN.

Los estudios descritos en el presente documento se realizaron usando varios oligonucleótidos antisentido cortos modificados para determinar si la modificación de nucleótidos podría mitigar la hepatotoxicidad asociada con el resto de ácido nucleico bloqueado (LNA). Las secuencias y motivos de compuestos antisentido usados en estos estudios se muestran en la Tabla 2. Cada compuesto se dirige a secuencias de PTEN publicadas incluyendo N° de Acceso de Genbank U92437.1 (SEC ID N°: 7), (sitio 140). Cada compuesto es un gapmer 2-10-2 (shortmer), que es de 14 nucleótidos de longitud que tiene una región "hueco" central que consiste en diez 2'-desoxinucleótidos que está flanqueada por una región "ala" 5' y una 3', cada una de 2 nucleótidos de longitud. Como se muestra en la Tabla 2, los nucleótidos ala de los compuestos ASO individuales portan modificaciones de azúcares distintas.

Tabla 2

Compuestos Antisentido LNA Cortos con Modificaciones de MOE		
N° de ISIS	Secuencia	SEC ID N°
394424	T _e ^{me} C _e ATGGCTGCAG ^{me} C _e T _e	8
392056	T ₁ ^{me} C ₁ ATGGCTGCAG ^{me} C ₁ T ₁	8
396570	T _e ^{me} C ₁ ATGGCTGCAG ^{me} C ₁ T ₁	8
396571	T ₁ ^{me} C _e ATGGCTGCAG ^{me} C ₁ T ₁	8
396574	T _e ^{me} C _e ATGGCTGCAG ^{me} C ₁ T ₁	8
396572	T ₁ ^{me} C ₁ ATGGCTGCAG ^{me} C _e T ₁	8
396573	T ₁ ^{me} C ₁ ATGGCTGCAG ^{me} C ₁ T _e	8
396575	T ₁ ^{me} C ₁ ATGGCTGCAG ^{me} C _e T _e	8

Se proporcionó a ratones macho Balb/c de 6 semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una inyección intraperitoneal sencilla de 8 µmol/kg de un oligonucleótido antisentido PTEN (ASO) de la Tabla 3. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la inyección de ASO o control (solución salina) y las concentraciones en suero de transaminasas de hígado (alanina aminotransferasa [ALT] y aspartato aminotransferasa [AST]) se midieron en unidades internacionales (UI)/l como indicadores de daño hepático, usando procedimientos bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Se determinaron los niveles de ARNm diana (PTEN) en el hígado por procedimientos bien conocidos por los expertos habituales en la materia y se enumeró la reducción de ARNm diana como porcentaje de control no tratado (% de UTC).

Los resultados de un estudio tal, usando gapmer 2-10-2 modificados por LNA que tienen diversos números de modificaciones de ala 2'-MOE se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Reducción de ARNm Diana y Transaminasas de Hígado después de la Administración de Oligonucleótidos Antisentido Modificados por 2'-MOE y Modificados por LNA				
Nº de ISIS	ALT	AST	ARNm de PTEN (% de UTC)	Química del Ala
Solución salina	39	68	100,0	N/D
394424	38	75	89,7	Alas 2'-MOE
392056	1249	770	32,4	Alas LNA
396570	51	84	57,8	Alas LNA con un MOE 2' en la posición 5' 1
396571	42	79	63,8	Alas LNA con un MOE 2' en la posición 5' 2
396574	36	67	71,0	2'-MOE en el ala 5' LNA en el ala 3'
396572	497	327	48,8	Alas LNA con un 2'-MOE en la posición 3' 13
396573	531	316	46,7	Alas LNA con un 2'-MOE en la posición 3' 14
396575	473	341	41,8	LNA en el ala 5' 2'-MOE en el ala 3'

La administración de oligonucleótidos antisentido gapmer 2-10-2 con alas de nucleótidos 2'-MOE (ISIS 394424) tenían niveles de ALT/AST que son adecuados con los niveles descritos en la técnica asociados con otros oligonucleótidos antisentido gapmer 2'MOE. Por el contrario, el oligonucleótido antisentido gapmer con alas modificadas con LNA (ISIS 392056) redujo el ARNm diana (PTEN), pero dio como resultado niveles gravemente elevados de transaminasas de hígado en suero de ratones tratados, lo que indica hepatotoxicidad. Los oligonucleótidos antisentido gapmer que tienen nucleótidos 2'-MOE añadidos a las regiones ala 3' y 5' dieron como resultado una mitigación de las transaminasas en suero elevadas causadas por el gapmer de LNA, ISIS 392056. Los gapmer con modificación 2'-MOE de solamente las alas 5' (uno o ambos nucleótidos) de oligonucleótidos antisentido modificados con LNA (ISIS 396570, ISIS 396571 y ISIS 396574) dieron como resultado concentraciones de transaminasa en suero cercanas a las del oligonucleótido antisentido gapmer 2'MOE (ISIS 394424) después de administración a ratones, lo que indica que la sustitución de nucleósido o nucleósidos LNA específicos con nucleósido o nucleósidos 2' modificados proporcionó un compuesto con un perfil de hepatotoxicidad mejorado. Estos compuestos también redujeron el ARNm de PTEN diana en relación con el UTC. La modificación 2'-MOE de los nucleótidos del ala 3' (ISIS 396572, ISIS 396573, ISIS 396575) dio como resultado la mitigación de la elevación de transaminasas causada por el oligonucleótido antisentido gapmer LNA. Juntos, estos datos indican que la modificación 2'-MOE de los nucleótidos de ala pueden mitigar la hepatotoxicidad de gapmer de LNA 2-10-2 a niveles que son proporcionados para otros gapmer 2'-MOE, mientras que mantienen la reducción del ARNm diana.

Ejemplo 4

Compuestos Antisentido Gapmer 2-10-2 Cortos con Conjugados C16 en Nucleótido 5' Terminal que se Dirigen a ApoB.

Los estudios descritos en el presente documento se realizaron usando dos oligonucleótidos antisentido gapmer 2-10-2 modificados para determinar si la modificación de nucleótidos podría mitigar la hepatotoxicidad asociada con el resto de ácido nucleico bloqueado (LNA). Las secuencias y motivos de compuestos antisentido se muestran en la Tabla 4. Cada compuesto se dirige a secuencias de ApoB publicadas incluyendo Nº de Acceso de Genbank U92437.1 (SEC ID Nº: 7), (sitio 140). Cada compuesto es un gapmer 2-10-2 (shortmer), que es de 14 nucleótidos de longitud que tiene una región "hueco" central que consiste en diez 2'-desoxinucleótidos que están flanqueados por una región "ala" 5' y una 3', cada una de 2 nucleótidos de longitud. Como se muestra en la Tabla 4, los nucleótidos ala de los compuestos ASO individuales portan modificaciones de azúcares distintas. Cada

compuesto incluía un C16-G 5' terminal que tenía la siguiente estructura:

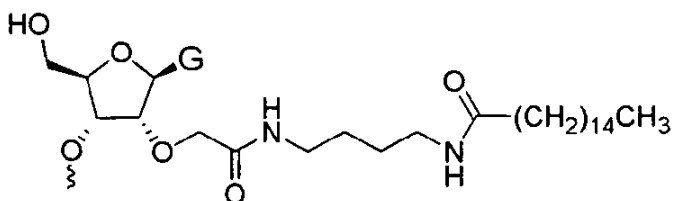


Tabla 4

Compuestos Antisentido Cortos con modificaciones en las alas		
Nº de ISIS	Secuencia	SEC ID Nº
391871	C ₁₆ -GG _e TACATGGAAGT _e C _e	9
391872	C ₁₆ -GG _i TACATGGAAGT _i C _i	9

Se administró a ratones macho Balb/c de 6 semanas de edad (Jackson Laboratory. Bar Harbor, ME) dos veces por semana durante tres semanas una dosis sencilla de un oligonucleótido antisentido ApoB (ASO) de la Tabla 5 por inyección intraperitoneal a una concentración de 2,5, 1,0, 0,4 ó 0,16 µmoles/kg. Los ratones se sacrificaron 48 horas después de la última administración de inyección de ASO o control (solución salina) y se midieron las concentraciones en suero de transaminasas de hígado (alanina aminotransferasa [ALT] y aspartato aminotransferasa [AST]) en unidades internacionales (UI)/l y bilirrubina, colesterol libre, triglicéridos, HDL y LDL, se midieron en unidades internacionales mg/l. Estos criterios de valoración se midieron usando procedimientos bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Los niveles de ARNm diana (ApoB) en el hígado se determinaron por procedimientos bien conocidos por los expertos habituales en la materia y la reducción del ARNm diana se enumeró como porcentaje del control no tratado (% de UTC). Como se ilustra en la Tabla 5, los niveles de ARNm de ApoB se redujeron de una manera dependiente de dosis.

Tabla 5

Reducción de ARNm Diana después de la Administración de Oligonucleótidos Antisentido Modificados por LNA y Modificados por 2'-MOE			
Nº de ISIS	Dosis (µmol/kg)	ARNm de ApoB (% de UTC)	Química del Ala
Solución salina		100,0	N/D
391871	0,16	105	Alas 2'-MOE con C ₁₆ en la posición 5' 1
	0,4	95	
	1,0	82	
	2,5	51	
391872	0,16	98	Alas de LNA con C ₁₆ en la posición 5' 1
	0,4	50	
	1,0	8	
	2,5	0,8	

Las concentraciones en plasma de colesterol total, colesterol libre, triglicéridos, transaminasas, bilirrubina, LDL y HDL se midieron de acuerdo con procedimientos experimentales rutinarios. Los resultados se resumen en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Transaminasas de Hígado, niveles de Bilirrubina, niveles de Colesterol, niveles de Triglicéridos, niveles de HDL y LDL después de la administración de Oligonucleótidos Antisentido Modificados con LNA y Modificados con 2'-MOE								
Nº de ISIS	Dosis	ALT	AST	Bilirrubina	Colesterol	HDL	Triglicéridos	LDL
391871	0,16	38	95	0,175	106	78	253	8,0
	0,4	40	98	0,150	109	79	256	8,0
	1	32	44	0,175	108	82	219	6,8
	2,5	38	133	0,150	90	65	236	5,5
391872	0,16	31	55	0,175	101	78	212	6,8
	0,4	30	78	0,150	77	58	220	4,3
	1	38	100	0,175	28	19	109	2,0
	2,5	38	59	0,200	14	6	76	0,0

Al final del estudio, se recogieron hígado, riñón y bazo de los animales tratados con los compuestos oligoméricos y se pesaron para evaluar alteraciones globales de los órganos. Los pesos medios aproximados de los tejidos para cada compuesto antisentido corto se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7

Efectos de los Oligonucleótidos Antisentido Modificados por LNA y Modificados por 2'-MOE Dirigidos a ApoB en el Peso del Tejido en ratones Balb/c.			
Nº de ISIS	Dosis ($\mu\text{mol/kg}$)	Peso del hígado	Peso del bazo
Solución salina	N/D	1,00	1,00
391871	0,16	0,92 (-8%)	0,97 (-3%)
	0,4	0,98 (-2%)	1,02 (+2%)
	1,0	0,97 (-3%)	0,99 (-1%)
	2,5	1,08 (+8%)	1,12 (+12%)
391872	0,16	0,92 (-8%)	1,04 (+3%)
	0,4	0,98 (-2%)	1,18 (+18%)
	1,0	1,10 (+10%)	1,01 (+1%)
	2,5	1,10 (+10%)	1,11 (+11%)

Ejemplo 5

Compuestos Antisentido Gapmer 2-14-2 Cortos con diversas sustituciones en la posición 2'-O que se dirigen a PTEN.

Los estudios descritos en el presente documento se realizaron usando oligonucleótidos antisentido modificados para determinar si la modificación de nucleótidos podría mitigar la hepatotoxicidad asociada con el resto de ácido nucleico bloqueado (LNA). Las secuencias y motivos de compuestos antisentido usados en estos estudios se muestran en la Tabla 8. La estereoquímica para ciertos compuestos se describe en la Tabla 9. Por ejemplo, 5'-(S)-Me-LNA indica una configuración S en el átomo de carbono 5 para 5-CH₃-LNA. Cada compuesto se dirige a secuencias de PTEN publicadas incluyendo Nº de Acceso de Genbank U92437.1 (SEC ID Nº: 7), (sitio 140). Cada compuesto es un gapmer 2-14-2, que es de 18 nucleótidos de longitud que tiene una región "hueco" central que consiste en catorce 2'-desoxinucleótidos que está flanqueada por una región "ala" 5' y una 3', cada una de 2 nucleótidos de longitud. Como se muestra en la Tabla 8, los nucleótidos ala de los compuestos ASO individuales portan modificaciones de azúcares distintas.

Tabla 8

Compuestos Antisentido LNA Cortos con Modificaciones MOE		
Nº de ISIS	Secuencia	SEC ID Nº
394420	^{me} C _e T _e GCTAGCCTCTGGATT _e T _e	10
394425	^{me} C _i T _i GCTAGCCTCTGGATT _i T _i	10
399700	^{me} C _e T _i GCTAGCCTCTGGATT _i T _i	10
399701	^{me} C _i T _e GCTAGCCTCTGGATT _i T _i	10
399702	^{me} C _e T _e GCTAGCCTCTGGATT _i T _i	10
399703	^{me} C _i T _i GCTAGCCTCTGGATT _e T _e	10
400521	C _{5i} U _{5i} GCTAGCCTCTGGATU _{5i} U _{5i}	10
400522	C _{6i} U _{6i} GCTAGCCTCTGGATU _{6i} U _{6i}	10
400523	C _{6i} U _{6i} GCTAGCCTCTGGATU _{6i} U _{6i}	10
400524	C _{6i} U _{6i} GCTAGCCTCTGGATU _{6i} U _{6i}	10
400525	C _{6i} U _{6i} GCTAGCCTCTGGATU _{6i} U _{6i}	10

Se proporcionó a ratones macho Balb/c de 6 semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una inyección intraperitoneal sencilla de 10 ó 2 µmol/kg de un oligonucleótido antisentido PTEN (ASO) de la Tabla 9. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la inyección de ASO o control (solución salina) y las concentraciones en suero de transaminasas de hígado (alanina aminotransferasa) [ALT] y aspartato aminotransferasa [AST] se midieron en unidades internacionales (UI)/l como indicadores de daño del hígado, usando procedimientos bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Los niveles de ARNm diana (PTEN) en el hígado se determinaron por procedimientos bien conocidos por los expertos habituales en la materia y la reducción del ARNm diana se enumeró como porcentaje de control no tratado (% de UTC). Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9

Reducción de ARNm Diana y Transaminasas de Hígado Después de la Administración de Oligonucleótidos Antisentido Modificados por LNA y Modificados por 2'-MOE					
Nº de ISIS	Dosis (µmol/kg)	ALT	AST	ARNm de PTEN (% de UTC)	Química de ala
Solución salina		39	66	100	N/D
394420	2	30	78	79	Alas 2'-MOE
	10	49	91	26	
394425	2	41	78	11	Alas LNA
	10	2453	2240	2	
399700	2	45	148	36	Alas LNA con un 2'-MOE en la pos. 5' 1
	10	71	245	6	
399701	2	42	140	48	Alas LNA con un 2'-MOE en la pos. 5' 2
	10	40	109	10	
399702	2	36	78	69	2'-MOE en ala 5' LNA en ala 3'
	10	41	99	19	
399703	2	33	99	17	LNA en ala 5' 2'-MOE en ala 3'
	10	807	731	2	
400521	2	37	81	21	5i = alas 5'-(S)-Me-BNA
	10	152	182	4	
	2	44	113	18	
	10	794	696	4	
	2	43	153	17	
	10	1374	818	4	
	2	31	59	23	
	10	269	263	4	
	2	43	110	21	
	10	765	636	3	

*pos. = posición en secuencia de nucleótidos

La administración de oligonucleótidos antisentido gapmer 2-14-2 con alas de nucleótidos 2'-MOE (ISIS 394420) tuvo niveles de ALT/AST que eran proporcionados para los niveles descritos en la técnica asociados con otros oligonucleótidos antisentido gapmer 2'MOE. Por el contrario, el oligonucleótido antisentido gapmer con alas modificadas con LNA (ISIS 394425) redujo el ARNm diana (PTEN), pero dio como resultado niveles elevados de transaminasas de hígado en suero de ratones tratados, lo que indica hepatotoxicidad. Los oligonucleótidos antisentido gapmer que tienen nucleótidos 2'-MOE añadidos a una de las regiones ala 3' y 5' dieron como resultado una mitigación de las transaminasas en suero elevadas provocadas por el gapmer LNA, ISIS 394425. Los gapmer con modificación 2'-MOE de solamente las alas 5' (uno o ambos nucleótidos) de oligonucleótidos antisentido modificados con LNA (ISIS 399700, ISIS 399701 y ISIS 399702) dieron como resultado concentraciones de transaminasa en suero cercanas a las del oligonucleótido antisentido gapmer 2'MOE (ISIS 394420) después de administración a los ratones, lo que indica que la sustitución de nucleósido o nucleósidos de LNA específicos con nucleósido o nucleósidos 2' modificados proporcionó un compuesto con un perfil de hepatotoxicidad mejorado. Estos compuestos también redujeron ARNm de PTEN diana en relación con el UTC. Los gapmer con modificación 2'-MOE del ala 3' (ambos nucleótidos) (ISIS 399703) dieron como resultado una mitigación de la elevación de transaminasa causada por el oligonucleótido antisentido gapmer LNA. Juntos, estos datos indican que la modificación 2'-MOE de los nucleótidos ala pueden mitigar la hepatotoxicidad de los gapmer de LNA 2-14-2 a niveles que son proporcionados para otros gapmer 2'-MOE, manteniendo a la vez la reducción del ARNm diana.

2Ejemplo 6

Ejemplo 6

Compuestos Antisentido Cortos Gapmer 1-9-2 cortos con diversas sustituciones en la posición 2'-O que se dirigen a PTEN.

Los estudios descritos en el presente documento se realizaron usando varios oligonucleótidos gapmer 1-9-2 modificados para determinar si la modificación de nucleótidos podría mitigar la hepatotoxicidad asociada con el resto de ácido nucleico bloqueado (LNA). Las secuencias y motivos de compuestos antisentido usados en estos estudios se muestran en la Tabla 11. Cada compuesto se dirige a secuencias de PTEN publicadas incluyendo el N° de acceso de Genbank U92437.1 (SEC ID N°: 7), (sitio 140). Cada compuesto es un gapmer 1-9-2 (shortmer), que es de 12 nucleótidos de longitud que tiene una región "hueco" central que consiste en nueve 2'-desoxinucleótidos que está flanqueada por una región "ala" 5' y una 3'. La región ala 5' contiene un nucleótido de longitud y la región ala 3' contiene dos nucleótidos de longitud. Como se muestra en la Tabla 11, los nucleótidos del ala de los compuestos ASO individuales portan modificaciones de azúcar distintas.

Tabla 11

Compuestos Antisentido de LNA cortos con modificaciones de MOE		
N° de ISIS	Secuencia	SEC ID N°
396151	T _e GGTCCAGAG ^{me} C _e ^{me} C _e	11
396153	T _i GGTCCAGAG ^{me} C _i ^{me} C _i	11
401350	T _e GGTCCAGAG ^{me} C _i ^{me} C _i	11
401349	T _i GGTCCAGAG ^{me} C _e ^{me} C _e	11
401351	T _a GGTCCAGAG ^{me} C _i ^{me} C _i	11
401352	C ₁₆ -TGGTCCAGAG ^{me} C _i C _i	11

Se proporcionó a ratones macho Balb/c de 6 semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una inyección intraperitoneal sencilla de 10 ó 3,2, 1 ó 0,32 µmol/kg de un oligonucleótido antisentido PTEN (ASO) de la Tabla 11. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la inyección de ASO o control (solución salina) y se midieron las concentraciones en suero de transaminasas de hígado (alanina aminotransferasa [ALT] y aspartato aminotransferasa [AST]) en unidades internacionales (UI)/l como indicadores de daño hepáticos, usando procedimientos bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Los niveles de ARNm diana (PTEN) en el hígado se determinaron por procedimientos bien conocidos por los expertos habituales en la materia y la reducción del ARNm diana se enumeró como porcentaje de control no tratado (% de UTC). Los resultados se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12

Reducción de ARNm Diana y Transaminasas de Hígado Después de la Administración de Oligonucleótidos Antisentido Modificados por 2'-MOE y Modificados por LNA					
Nº de ISIS	Dosis (µmol/kg)	ALT	AST	ARNm de PTEN (% de UTC)	Química del ala
Solución salina	N/D	39	66	100	N/D
396151	0,32	53	69	97	Alas 2'-MOE
	1	53	98	82	
	3,2	64	97	71	
	10	89	101	23	
396153	0,32	52	120	63	Alas LNA
	1	71	110	24	
	3,2	750	467	8	
	10	9681	4233	11	
401350	0,32	55	105	80	2'-MOE en ala 5' LNA en ala 3'
	1	61	125	49	
	3,2	69	107	15	
	10	2183	1033	6	
401349	0,32	67	188	74	LNA en ala 5' 2'- MOE en ala 3'
	1	69	125	48	
	3,2	118	357	12	
	10	1323	645	6	
401351	0,32	39	52	91	2'-NMA en ala 5' LNA en ala 3'
	1	51	53	50	
	3,2	79	165	16	
	10	4446	2025	6	
401352	0,32	39	53	55	C ₁₆ en la posición 5' 1 LNA en el ala 3'
	1	64	112	14	
	3,2	3571	1385	6	
	10	7831	4687	2	

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

<120> COMPUESTOS ANTISENTIDO

40

<130> P057391EP

<140> EP07844422.1

<141> 18-10-2007

45

<150> US60/852894

<151> 18-10-2006

<160> 11

50

<170> Fast SEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 19

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

60

<400> 1

gccacaggct cccagacat 19

<210> 2

<211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador de PCR

 <400> 2
 tccatcctct tgatatctcc ttttg 25

 10 <210> 3
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Sonda de PCR

 <400> 3
 acagccatca tcaaagagat cgtagcaga a 31
 20
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 4
 30 atgacaatca tgttgacgca attc 24

 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 5
 40 cgatgcaata aatatgcaca aatca 25

 <210> 6
 <211> 28
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda de PCR
 50
 <400> 6

 ctgtaaagct ggaaaggac ggactggt 28
 <210> 7
 55 <211> 2160
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 7
 60

 65

5 ggcgccctgc tctcccggcg gggcggcgga gggggcgggc tggccggcgc acggtgatgt 60
 ggcgggactc tttgtgcact gcggcaggat acgcgcttgg gcgtcgggac gcggtgcgc 120
 tcagctctct cctctcggaa gctgcagcca tgatggaagt ttgagagttg agccgctgtg 180
 aggccaggcc cggcgcaagg gagggagatg agagacggcg gcggccacgg cccagagccc 240
 ctctcagcgc ctgtgagcag ccgcgggggc agcgcctcgg gggagccggc cgggcggcgg 300
 cggcggcagc ggcggcgggc ctgcctcct cgtcgtctgt tctaaccggg cagcttctga 360
 gcagcttcgg agagagacgg tggagaagc cgtgggctcg agcgggagcc ggcgcaggct 420
 10 cggcggtcgc acctcccgt cctggagcgg gggggagaag cggcggcggc ggccgcggct 480
 ccggggaggg ggtcggagtc gcctgtcacc attgccaggg ctgggaacgc cggagagttg 540
 ctctctcccc ttctcctgcc tccaacacgg cggcggcggc ggcggcacgt ccagggacc 600
 gggccggtgt taagcctccc gtccgccgcc gccgcacccc ccctggcccg ggctccggag 660
 gccgccggag gaggcagccg ctgcgaggat tatccgtctt ctcccattc cgtgcctcg 720
 15 gctgccaggc ctctggctgc tgaggagaag caggcccagt ctctgcaacc atccagcagc 780
 cgccgcagca gccattacc ggctgcggtc cagggccaaag cggcagcaga gcgaggggca 840
 tcagccaccg ccaagtccag agccatttcc atcctgcaga agaagcctcg ccaccagcag 900
 cttctgccat ctctctcctc ctttttcttc agccacagc tcccagacat gacagccatc 960
 20 atcaaagaga tcgttagcag aaacaaaagg agatatcaag aggatggatt cgacttagac 1020
 ttgacctata tttatccaaa tattattgct atgggatttc ctgcagaaag acttgaagg 1080
 gtatacagga acaatattga tgatgtagta aggtttttgg attcaaagca taaaaacct 1140
 tacaagatat acaatctatg tgctgagaga cattatgaca ccgccaatt taactgcaga 1200
 25 gttgcacagt atccttttga agaccataac ccaccacgc tagaacttat caacccttc 1260
 tgtgaagatc ttgaccaatg gctaagtga gatgacaatc atgttgcagc aattcactgt 1320
 aaagctggaa agggacggac tgggtgtaatg atttgtgcat atttattgca tcgggggcaa 1380
 tttttaaagg cacaagaggc cctagatttt tatggggaag taaggaccag agacaaaaag 1440
 30 ggagtcacaa ttcccagtc gaggcgctat gtatattatt atagctacct gctaaaaaat 1500
 cacctggatt acagaccctg ggcactgctg tttcacaaga tgatgtttga aactattcca 1560
 atgttcagtg gcggaacttg caatcctcag tttgtggtct gccagctaaa ggtgaagata 1620
 tattcctcca attcaggacc cacgcggcgg gaggacaagt tcatgtactt tgagttccct 1680
 cagccattgc ctgtgtgtgg tgatatcaaa gtagagttct tccacaaaca gaacaagatg 1740
 35 ctcaaaaagg acaaaatgt tcacttttgg gtaaatcgt tcttcatacc aggaccagag 1800
 gaaacctcag aaaaagtgga aaatggaagt ctttgtgatc aggaaatcga tagcatttgc 1860
 agtatagagc gtgcagataa tgacaaggag tatcttgtac tcaccctaac aaaaaacgat 1920
 cttgacaaag caaacaaga caaggccaac cgatacttct ctccaaattt taaggtgaaa 1980
 40 ctatacttta caaaaacagt agaggagcca tcaaatccag aggctagcag ttcaacttct 2040
 gtgactccag atgttagtga caatgaacct gatcattata gatattctga caccactgac 2100
 tctgatccag agaatgaacc ttttgatgaa gatcagcatt cacaattac aaaagtctga 2160

45 <210> 8
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Compuesto Antisentido

 <400> 8
 tcatggctgc agct 14

 55 <210> 9
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Compuesto Antisentido

 <400> 9
 cggtacatgg aagtc 15
 65

ES 2 620 472 T3

<210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Compuesto Antisentido

<400> 10
10 ctgctagcct ctggattt 18

<210> 11
<211> 12
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Compuesto Antisentido

20 <400> 11
tggccagag cc 12

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un oligonucleótido antisentido gapmer que tiene un hueco desoxi y al menos un engarce internucleosídico modificado, una región ala 5' situada en el extremo 5' del hueco desoxi, y una región ala 3' situada en el extremo 3' del hueco desoxi, en donde al menos uno de los nucleósidos bicíclicos 4' a 2' y el ala 5' tiene al menos un nucleósido 2' modificado no biciclíco.
- 10 **2.** El oligonucleótido antisentido gapmer de la reivindicación 1, en el que el nucleósido 2' modificado no biciclíco está sustituido en la posición 2' con un -O-alquilo sustituido o no sustituido o -O-(2-acetilamida) sustituida o no sustituida, en el que el nucleósido 2' modificado no biciclíco comprende un 2'-OCH₃, 2'-O(CH₂)₂OCH₃, o 2'-OCH₂C(O)-NR₁R₂, en el que R₁ y R₂ son de forma independiente hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido o, como alternativa, se toman juntos para hacer un resto heterocíclico.
- 15 **3.** El oligonucleótido antisentido gapmer de la reivindicación 2, en el que el nucleósido 2' modificado no biciclíco es un nucleósido 2'-O-metilo, o en el que el nucleósido 2' modificado no biciclíco es un nucleósido 2'-O-netoxietilo.
- 20 **4.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nucleósido biciclíco 4' a 2' es un nucleósido LNA (un nucleósido biciclíco metilenoxi (4'-CH₂-O-2') o nucleósido biciclíco etilenoxi (4'-CH₂CH₂-O-2')).
- 25 **5.** El oligonucleótido antisentido gapmer de la reivindicación 4, en el que el nucleósido biciclíco 4' a 2' es α-L-LNA o β-D-LNA.
- 6.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las regiones ala son de entre aproximadamente 1 a aproximadamente 7 nucleósidos de longitud.
- 7.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las regiones ala son de entre aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nucleósidos de longitud.
- 30 **8.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la región hueco desoxi es de 6 a 18 nucleósidos de longitud.
- 35 **9.** El oligonucleótido antisentido gapmer de la reivindicación 8, en el que la región hueco desoxi es de 7 a 10 nucleósidos de longitud.
- 10.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el oligonucleótido antisentido gapmer no tiene BNA en la región ala 5'.
- 40 **11.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que tiene una región ala 5' que tiene sólo nucleótidos modificados 2'-O(CH₂)OCH₃ y sólo nucleósidos LNA o etilenoxi BNA en el ala 3'.
- 12.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el ala 5' comprende al menos un nucleósido biciclíco 4' a 2'.
- 45 **13.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el ala 3' comprende al menos un nucleósido modificado 2' no biciclíco.
- 50 **14.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que nucleósido biciclíco 4' a 2' en un nucleósido biciclíco metilenoxi (4'-CH₂-O-2') o nucleósido biciclíco (4'-CH₂CH₂-O-2').
- 15.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el nucleósido 2' modificado no biciclíco está sustituido en la posición 2' con un -O-alquilo sustituido o no sustituido o -O-(2-acetilamida) sustituida o no sustituida.
- 55 **16.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el engarce internucleosídico modificado es un fosforotioato, en el que el compuesto oligomérico tiene una pluralidad de engarces internucleosídicos de fosforotioato.
- 60 **17.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquier reivindicación anterior, que es de 10 a 25, 10 a 30, 10 a 14, 12 a 25, 15 a 25 o 18 a 24 nucleótidos de longitud.
- 65 **18.** El oligonucleótido antisentido gapmer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso en un procedimiento para reducir la expresión de un ARN diana en un animal, que comprende administrar a dicho animal dicho oligonucleótido antisentido gapmer, en el que la secuencia de dicho oligonucleótido antisentido complementaria de dicho ARN diana.