

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 309**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/55** (2007.01)  
**A61K 47/54** (2007.01)  
**A61K 47/60** (2007.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61K 49/08** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61K 51/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2011 PCT/EP2011/056270**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11131693**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2011 E 11718678 (3)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2560687**

54 Título: **Composiciones y métodos para la distribución selectiva de moléculas de oligonucleótidos a tipos específicos de neuronas**

30 Prioridad:

**09.02.2011 EP 11382031**  
**19.04.2010 US 325515 P**  
**19.04.2010 EP 10382087**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.10.2017**

73 Titular/es:

**NLIFE THERAPEUTICS S.L. (100.0%)**  
**Avda. de la Innovación, 1 Nave 5, Edificio BIC-**  
**Granada-PCTS**  
**18100 Granada, ES**

72 Inventor/es:

**MONTEFELTRO, ANDRÉS PABLO;**  
**ALVARADO URBINA, GABRIEL;**  
**BORTOLOZZI BIASSONI, ANALIA;**  
**ARTIGAS PÉREZ, FRANCESC y**  
**VILA BOVER, MIQUEL**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 638 309 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la distribución selectiva de moléculas de oligonucleótidos a tipos específicos de neuronas

## CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a conjugados que comprenden un ácido nucleico específico para una diana de interés y un grupo que permite la distribución de los ácidos nucleicos a células específicas en el sistema nervioso central por medio de su afinidad hacia moléculas transportadoras de neurotransmisores en la superficie de dichas células.

## ANTECEDENTES TÉCNICOS

- 10 El uso de ácidos nucleicos se ha demostrado eficaz para cambiar el estado de una célula. La introducción de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) en una célula se puede usar para aumentar o disminuir la expresión de genes particulares en la célula, afectando de esta manera una o más vías bioquímicas. De las tecnologías basadas en ácido nucleico usadas para cambiar la fisiología celular, interferencia de ARN (ARNi) es el término general dado para regular la expresión de genes a nivel postranscripcional en organismos diversificados. El silenciamiento génico por ARNi se puede lograr usando fragmentos homólogos de ARNbc cortos (21-23 pb) conocidos como interferentes pequeños o "ARNip".
- 15 Cuando se introduce un ARNbc largo en una línea celular, la enzima celular Dicer lo corta en moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip). Esta molécula de ARN interferente pequeño se llama ahora ARN guiado. El ARN guiado guiará el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) al ARNm diana homólogo. Una vez que forma una estructura híbrida con la secuencia de ARNm homóloga, el RISC cortará el ARNm. Como resultado, la proteína codificada por el ARNm no se producirá más, produciendo así el silenciamiento del gen.
- 20 Interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN interferentes pequeños (ARNip).

- Sin embargo, un obstáculo principal para el desarrollo de planteamientos terapéuticos basados en ARNi para patologías cerebrales es la barrera hematoencefálica (BHE). El cerebro está protegido contra sustancias potencialmente tóxicas por la presencia de dos sistemas barreras: la barrera hematoencefálica (BHE) y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCE). Se considera que la BHE es la vía principal de captación de ligandos de suero ya que su área de superficie es aproximadamente 5000 veces mayor que la de la BSLCE. El endotelio cerebral, que constituye la BHE, representa el principal obstáculo para el uso de potenciales fármacos contra muchos trastornos del SNC. Como regla general, sólo las moléculas lipofílicas pequeñas pueden pasar a través de la BHE, es decir, de la sangre sistémica circulante al cerebro. Muchos fármacos que tienen un tamaño mayor o mayor hidrofobicidad muestran resultados prometedores en estudios animales para tratar trastornos del SNC.
- 25
- 30

- Además de la administración intracerebral directa, se han descrito diferentes estrategias para alcanzar el silenciamiento génico en el SNC por medio de moléculas interferentes de ARN administradas de forma sistémica. Por ejemplo, Kumar *et al.* (Nature, 2007, 448:39-44) han descrito conjugados de ARNip y un péptido derivado de la glicoproteína del virus de la rabia que comprende una arginina nonamérica y su capacidad para silenciar la expresión génica en el cerebro después de inyección intravenosa. Xia *et al.* (Pharmaceutical Research, 2007, 24:2309-2316) han descrito conjugados que comprenden un ARNip biotinilado y un conjugado que comprende un anticuerpo anti-receptor de transferrina-avidina que son capaces de silenciar la expresión génica en el sistema nervioso central después de administración sistémica. WO200979790 describe conjugados que comprenden un ARNip y una serie de péptidos conocidos colectivamente como Angiopeps que son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica mediante transcitosis mediada por receptor usando la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR-1) y que permite la distribución al SNC de conjugados administrados de forma sistémica que comprenden dichos péptidos. WO2007107789 describe el uso de compuestos capaces de producir interferencia de ARN y que son específicos para dianas presentes en el SNC y la distribución al SNC mediante el uso de administración intranasal.
- 35
- 40

- Sin embargo, mientras que todos estos sistemas permiten la distribución de ARNip administrados de forma sistémica al SNC, no permiten la distribución a tipos celulares específicos dentro del cerebro. De hecho, hasta la fecha no se ha descrito ningún sistema de distribución que permita la distribución de un agente terapéutico a un tipo celular específico en el SNC. La posibilidad de distribuir ARNip de especificidad conocida al sistema nervioso central será útil para el tratamiento de enfermedades producidas por una actividad/expresión indeseada de un gen determinado, incluyendo depresión, trastornos cognitivos, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, etc.
- 45

- La depresión se reconoce como una enfermedad del sistema nervioso central. La depresión es tanto biológica como genéticamente un trastorno heterólogo, con síntomas manifestados a nivel psicológico, de comportamiento y fisiológico. Además, la depresión muestra un alto grado de co-morbilidad con trastornos de ansiedad y la ansiedad misma (típicamente ansiedad anticipatoria) es uno de los síntomas más prevalentes en pacientes depresivos. En efecto, la mayoría de los trastornos de ansiedad también se tratan con fármacos antidepresivos.
- 50

- Los primeros fármacos usados en el tratamiento de depresión mayor fueron los antidepresivos tricíclicos (ATC) de tipo imipramina y los inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO). Estos fármacos se descubrieron al final de la década de
- 55

1950 y demostraron ser eficaces, aunque presentaban un número de efectos secundarios graves que llevaron al desarrollo de nuevos fármacos, tales como los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS) o los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN).

5 El descubrimiento de que los ATC (y posteriormente, los ISRS y los IRSN) inhibían la recaptación de las monoaminas serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA) en la célula presináptica, aumentando los niveles de 5-HT en la hendidura sináptica, aumentando así su actividad en el receptor postsináptico, llevó a la primera hipótesis de la etiología de la depresión, es decir, que estaba causada por una deficiencia en la actividad de estos sistemas de transmisores monoaminérgicos en el cerebro. Desde entonces, todos los antidepresivos comercializados se dirigen a transportadores o receptores serotoninérgicos y/o noradrenérgicos.

10 Los receptores de 5-HT están localizados en la membrana celular de células nerviosas y otros tipos de células en animales. Con la excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub>, el resto de los receptores de 5-HT son receptores de siete dominios transmembrana (o heptahelicales) acoplados a proteínas G que activan una cascada intracelular de segundo mensajero. Algunos de los receptores de 5-HT identificados incluyen los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B/1D</sub> expresados presinápticamente en neuronas de serotonina (autorreceptores) y en neuronas postsinápticamente localizados en terminales nerviosas 5-HT. El receptor de 5-HT más directamente unido con los efectos antidepresivos de los ISRS ha sido el receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

15 Se están registrando ahora nuevos antidepresivos con mecanismos de acción basados en la inhibición relativamente selectiva de la recaptación de norepinefrina (IRNA), por ejemplo, reboxetina, o en el bloqueo dual (IRSN), tales como venlafaxina o duloxetina. Otros fármacos, tales como nefazodona, trazodona o mirtazapina tienen una acción más débil en los transportadores de monoaminas y bloquean en su lugar receptores monoaminérgicos.

20 Sin embargo, a pesar del éxito comercial de los ISRS, estos compuestos tienen dos limitaciones principales: 1) solo el 60% de los pacientes experimenta una respuesta terapéutica (reducción a la mitad de la gravedad basal) y 2) la respuesta se produce solo después de varias semanas de tratamiento continuado. Esto es debido a un mecanismo de retroalimentación negativa que tiene lugar en la neurona presináptica. Brevemente, los niveles altos de serotonina inducidos por el bloqueo de la recaptación de serotonina no solo activan los receptores de serotonina postsinápticos, sino también activan los autorreceptores presinápticos, que sirven como un sensor de retroalimentación para la célula. La activación del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> por 5-HT (también denominado receptor presináptico 5-HT<sub>1A</sub> o 5-HT<sub>1AR</sub> presináptico), o agonistas selectivos, suprime la descarga celular y la liberación de 5-HT dependiente de impulso, mientras que los receptores 5-HT<sub>1B</sub> controlan la síntesis de 5-HT y la liberación a nivel terminal. Tanto los receptores 5-HT<sub>1A</sub> como 5-HT<sub>1B</sub> también se localizan en neuronas postsinápticas a los terminales nerviosos 5-HT, principalmente en áreas corticolímbicas. El aumento de 5-HT extracelular producido por el bloqueo en la recaptación de sertralina (SERT, un ISRS) activa el receptor presináptico 5-HT<sub>1A</sub> en los núcleos del rafe del mesencéfalo, suprimiendo la descarga celular y liberación terminal, un efecto que atenúa el aumento extracelular de 5-HT producido por el bloqueo de la recaptación. Los autorreceptores 5-HT<sub>1B</sub> ejercen una retroalimentación negativa similar a nivel local. Después de la administración repetida de ISRS, los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> se desensibilizan, lo que permite a las neuronas serotoninérgicas recuperar la descarga celular y produce un aumento en 5-HT extracelular, a un nivel mayor que el visto después de un tratamiento único. Estas adaptaciones neurofisiológicas (que proceden lentamente) del tejido cerebral no son solo la razón por la que normalmente son necesarias varias semanas de uso continuo de ISRS para que el efecto antidepresivo se manifieste por completo, sino también por qué la ansiedad aumentada es un efecto secundario común en los primeros pocos días o semanas de uso. Se sabe que el bloqueo de estos mecanismos negativos de retroalimentación con antagonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y/o 5-HT<sub>1B</sub> potencia el aumento de 5-HT producido por los ISRS y, por tanto, podría servir para acelerar los efectos clínicos de los ISRS.

25 La estrategia farmacológica para acelerar la respuesta antidepresiva bloqueando la acción de los receptores presinápticos 5-HT<sub>1A</sub> durante la administración de ISRS se probó usando (±)pindolol. Este compuesto es un antagonista de receptor β<sub>1-2</sub> adrenérgico con una putativa acción agonística sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub>. El (±)pindolol antagonizó varias acciones mediadas por la activación de receptores centrales 5-HT<sub>1A</sub>, tales como hipotermia o secreción hormonal. En general la adición de pindolol a ISRS acelera la respuesta antidepresiva. Sin embargo, aunque en algunos estudios se ha mostrado que el pindolol ocupa parcialmente los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en el cerebro humano a dosis clínicas, otros estudios han encontrado baja ocupación. Además, no se debe olvidar que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> se localizan en las neuronas serotoninérgicas así como en neuronas postsinápticas a las neuronas serotoninérgicas. En efecto, una preocupación importante es la falta de selectividad de estos agentes para receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos frente a postsinápticos: el bloqueo completo de los receptores postsinápticos puede cancelar la transmisión aumentada a través de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> del prosencéfalo producida por antidepresivos.

30 De esta manera, a pesar de los avances hechos en el desarrollo de antidepresivos, todavía hay necesidad de compuestos alternativos que actúen específicamente en los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos.

35 La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que con frecuencia disminuye las capacidades motoras del paciente, el habla y otras funciones (Olanow). Los síntomas de la enfermedad de Parkinson provienen de la actividad muy reducida de células dopaminérgicas en la región pars compacta de la sustancia negra (SNpc) (Olanow, Dawson). Estas neuronas se proyectan al cuerpo estriado y su pérdida produce

alteraciones en la actividad de los circuitos neurales en los ganglios basales que regulan el movimiento, en esencia una inhibición de la vía directa y excitación de la vía indirecta. La vía directa facilita el movimiento y la vía indirecta inhibe el movimiento, así la pérdida de estas células produce un trastorno de movimiento hipocinético. La falta de dopamina produce una inhibición aumentada del núcleo ventral anterior del tálamo, que envía proyecciones excitadoras a la corteza motora, produciendo así hipocinesia.

La EP se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y la presencia de inclusiones intracelulares designadas cuerpos de Lewy (CL). Neuroquímicamente, la EP está marcada por disfunción del complejo mitocondrial I e índices aumentados de estrés oxidativo. Se han propuesto varios mecanismos patogénicos para la EP incluyendo estrés oxidativo y nitrosativo, disfunción mitocondrial, mal plegamiento y agregación de proteínas y apoptosis. La EP es fundamentalmente esporádica pero se ha mostrado que algunos casos de EP son familiares. El primer gen de EP familiar identificado fue la  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) que de hecho es el componente principal de los CL en todos los pacientes con EP. La función normal de la  $\alpha$ -sinucleína se entiende poco. La  $\alpha$ -sinucleína se puede unir a lípidos y, en neuronas, se asocia con vesículas presinápticas y la membrana plasmática, posiblemente a través de balsas lipídicas. Las formas patológicas depositadas de  $\alpha$ -sinucleína están agregadas y muestran menor solubilidad que la proteína normal. Se han descrito tres mutaciones puntuales que causan EP familiar, pero también se ha descrito que duplicaciones y triplicaciones del gen *SNCA* son responsables de la EP y la enfermedad de los cuerpos de Lewy. Por lo tanto, incluso sin variantes de secuencia, la dosis de  $\alpha$ -sinucleína puede ser causante de la enfermedad de los cuerpos de Lewy.

La  $\alpha$ -sinucleína afecta a la mitocondria y probablemente induce apoptosis. De hecho, hay evidencias en acumulación de una relación próxima entre  $\alpha$ -sinucleína y daño oxidativo: la sobreexpresión de una  $\alpha$ -sinucleína mutante sensibiliza las neuronas al estrés oxidativo y daño por dopamina e inhibidores del complejo I, produciendo carbonilación de proteínas aumentada y peroxidación lipídica *in vitro* e *in vivo*. Por el contrario, la disfunción del complejo mitocondrial I se ha asociado a formas esporádicas de la EP. El daño oxidativo dependiente del complejo I y la función mitocondrial defectuosa es una causa principal de la degeneración neuronal y muerte celular en la EP. La función mitocondrial defectuosa y la producción de ROS aumenta el nivel del conjunto de citocromo c en el espacio intermembrana mitocondrial, lo que permite su rápida liberación cuando se activa el agonista de muerte celular Bax.

En suma, el escenario en la EP sería una situación de disfunción mitocondrial neuronal con aumento en la producción de ROS que por una parte aumentaría la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína y por otra activaría la muerte celular mediada por Bax. Además, la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína, a su vez, aumentaría la producción celular de ROS y la inducción de degeneración neuronal.

El tratamiento más ampliamente usado para la EP es L-DOPA en varias formas. Sin embargo, solo del 1-5% de la L-DOPA entra en las neuronas dopaminérgicas. La L-DOPA restante con frecuencia se metaboliza a dopamina en otro lugar, produciendo una amplia variedad de efectos secundarios. Los inhibidores de dopa descarboxilasa como carbidopa y benserazida también se usan para el tratamiento de la EP ya que ayudan a prevenir el metabolismo de L-DOPA antes de que alcance las neuronas dopaminérgicas y en general se dan como preparaciones de combinación de carbidopa/levodopa y benserazida/levodopa. Además, los agonistas de dopamina son moderadamente eficaces y actúan estimulando algunos receptores de dopamina. Sin embargo, producen que los receptores de dopamina se vuelvan progresivamente menos sensibles, aumentando por último los síntomas.

Los planteamientos antisentido también podrían ser útiles, y se ha descrito que funcionan en cerebro de rata y ratón. Este planteamiento se basa en la idea de que la  $\alpha$ -sinucleína realmente es dispensable para la función del SNC en seres humanos, como parece ser en ratón pero tal vez incluso una disminución moderada en los niveles de proteína sería suficiente para disminuir la progresión de la EP.

Sin embargo, a pesar de los avances hechos en el desarrollo de agentes terapéuticos de EP, todavía hay la necesidad de compuestos alternativos que sean específicamente capaces de prevenir la actividad reducida de células dopaminérgicas en la región pars compacta de la sustancia negra.

Los sistemas mesocortical y mesolímbico de dopamina (DA) desempeñan un papel crucial en muchos trastornos psiquiátricos incluyendo esquizofrenia. La evidencia farmacológica sugirió un aumento general de la neurotransmisión dopaminérgica en esquizofrenia (Seeman y Lee, 1975; Creese *et al.*, 1976). La visión actual, sin embargo, indica una hiperactividad de la transmisión subcortical de DA junto a una mesocortical hipoactiva. La eficacia total de los antipsicóticos clásicos (antagonistas de receptores D2 de DA) y atípicos (APD, antagonistas preferentes de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> contra D2 de DA) para tratar los síntomas (psicóticos) positivos es similar. Por el contrario, algunos agentes del último grupo, y particularmente la clozapina, son superiores a los antipsicóticos clásicos para el tratamiento de los síntomas negativos y la deficiencia cognitiva. Esta característica clínica se ha relacionado, al menos en parte, a la capacidad de aumentar la liberación de DA en la vía mesocortical, un efecto inducido por los antipsicóticos atípicos, pero no los clásicos. En efecto, una función prefrontal óptima de DA es crucial para la memoria de trabajo y las funciones ejecutivas.

La liberación de DA en las vías mesocortical y mesolímbica de DA está regulada por varios factores. Primero, depende del modo de descarga (tónico/fásico) de neuronas DA VTA. Segundo, está fuertemente regulado por la activación de

autorreceptores  $D_{2/3}$  somatodendríticos y terminales que controlan la descarga celular y la liberación de DA. Por último, la recaptación mediada por transportador de DA (DAT) es uno de los mecanismos clave que define la cinética de caída de las concentraciones extracelulares de DA. Estudios previos indican una densidad diferente de DAT en CPF y cuerpo estriado.

- 5 Además, los axones de noradrenalina (NA) pueden contribuir a la eliminación de DA del espacio extracelular cerebral, ya que el transportador de NA (NAT) muestra una afinidad similar por NA y DA. De esta manera, los inhibidores de NAT preferentemente aumentan la concentración extracelular de DA en la CPF medial (CPFm) comparado con el núcleo caudado y núcleo accumbens (NAc). Por tanto, los axones NA de las neuronas del locus cerúleo (LC) pueden contribuir a regular la concentración extracelular de DA en CPF captando o coliberando DA. Algunos investigadores han mostrado los efectos de un nuevo tratamiento de combinación basado en fármacos dirigidos a NA (inhibidor de NAT más antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico) para aumentar selectivamente la transmisión mesocortical de DA.

10 Kumar Priti *et al.* (Nature, 2007, 448:39-45) describen un conjugado de ARNip y un péptido corto derivado de la glicoproteína del virus de la rabia (RGV) unido de forma covalente a un residuo de arginina nonamérica en el extremo carboxílico de la RGV.

- 15 Pascoal *et al.* (Epilepsia, 2009, Vol. 50, n.º Supl. 10, página 4) describen la distribución transvascular de ARNip en un modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal a través de un conjugado que comprende el péptido de la RGV y ARNip.

WO2008033285 describe un conjugado de ARN bicatenario unido a un péptido que penetra una célula.

WO2009141625 describe un conjugado de una secuencia de ARN no codificante de citomegalovirus humano (TLR4) unido a un grupo que se dirige a una célula neuronal.

- 20 WO2009079790 divulga conjugados de ácido nucleico-polipéptido para tratar enfermedades neurodegenerativas en donde el ácido nucleico es preferentemente un ARNip, ARNhc, ARNbc o miARN y los polipéptidos preferidos son AngioPrep-1 y AngioPrep-2.

Boudreau *et al.* (J. Brain. Res., 2010, 1338: 112-121) describen tratamientos de iARN que comprenden péptido de RGV y ARNip.

- 25 Sin embargo, todavía hay una necesidad para compuestos capaces de aumentar la transmisión mesocortical de DA.

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

- Los inventores han desarrollado construcciones de ácido nucleico que contienen un ácido nucleico específico para un gen diana determinado y un inhibidor selectivo de un transportador de neurotransmisor. Se muestra que estas construcciones son particularmente útiles para la distribución del ácido nucleico de interés al interior de una célula que expresa el transportador del neurotransmisor. Sin querer estar unido a ninguna teoría, se cree que el inhibidor de un transportador de neurotransmisor se unirá al correspondiente transportador del neurotransmisor en la superficie de la célula en donde se expresa el transportador que a su vez translocará el complejo ácido nucleico-inhibidor al interior de la célula. De esta manera, como se ilustra en el ejemplo 3 de la presente invención, la administración de una construcción que comprende un ARNip específico para el receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> y un inhibidor específico del transportador de serotonina (sertralina) produce una reducción en el ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y una falta de respuesta hipotérmica en respuesta a 8-OH-DPAT (una medida de la señalización serotoninérgica) que es mucho mayor que la obtenida con el ARNip no conjugado.

- El experto en la materia apreciará que la invención no está limitada a conjugados para distribución a neuronas serotoninérgicas. Por el contrario, los resultados proporcionados en la presente invención ilustran que el mecanismo usado por las neuronas para transportar neurotransmisores es un medio adecuado para fomentar la distribución a células de moléculas pequeñas unidas a moléculas que muestran afinidad por dicho transportador del neurotransmisor.

De esta manera, en un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende:

- i) al menos un agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor, en donde el agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), un inhibidor de la recaptación de noradrenalina (IRN), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND) y

- ii) al menos un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador del neurotransmisor,

en donde la unión del ácido nucleico a la molécula diana produce una inhibición de la actividad de la molécula diana.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un conjugado de la invención para su uso en medicina.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un conjugado de la invención en donde

(i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) y

5 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana seleccionada del grupo del ARNm que codifica el receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>), el ARNm que codifica el transportador de serotonina (transportador de 5-HHT o SERT), el receptor de serotonina de tipo 1A y el transportador de serotonina,

para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno relacionado con depresión.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un conjugado de la invención en donde

10 (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND o triple bloqueador) y

(ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica la alfa-sinucleína o el polipéptido de la alfa-sinucleína para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy.

15 También se divulga un conjugado en donde

(i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD) o inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND o triple bloqueador) y

(ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica BAX

20 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a apoptosis neuronal y muerte celular (es decir, Parkinson y Alzheimer).

También se divulga un conjugado en donde

(i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de recaptación de norepinefrina (IRN) y

25 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica la dopamina beta hidroxilasa o el ARNm que codifica el transportador de norepinefrina (NET), el polipéptido dopamina beta hidroxilasa

para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a deficiencia en dopamina en proyecciones noradrenérgicas como procesos de memoria y cognitivos asociados con demencia, depresión y enfermedades neurodegenerativas.

30 También se divulga un conjugado de la invención en donde

(i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de recaptación de norepinefrina (IRN) y

(ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica el transportador de norepinefrina (NET) o el polipéptido del transportador de norepinefrina (NET)

35 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a deficiencia en dopamina en proyecciones noradrenérgicas como procesos de memoria y cognitivos asociados con demencia, depresión y enfermedades neurodegenerativas.

También se divulga un conjugado de la invención en donde

(i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD) o inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND o triple bloqueador) y

40 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica tau para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con neurodegeneración por mutaciones en la proteína tau como el Alzheimer.

También se divulga un conjugado de la invención en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD) o inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND o triple bloqueador) y
- (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica huntingtina para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa producida por la acumulación de una expresión alterada (duplicación intragénica) de huntingtina.

También se divulga un conjugado en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de norepinefrina (IRN) y
- (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica la dopamina beta hidroxilasa o el ARNm que codifica el transportador de norepinefrina (NET)

para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a deficiencia en dopamina en proyecciones noradrenérgicas como procesos de memoria y cognitivos asociados con demencia, depresión y enfermedades neurodegenerativas.

También se divulga un conjugado que comprende

- (i) al menos un agente de selectividad que se une específicamente a uno más de un transportador de neurotransmisor y
- (ii) un agente de contraste o un agente marcador.

También se divulga un conjugado que comprende un agente de contraste o un agente marcador para su uso como agente diagnóstico.

Estos y otros objetos de la presente invención se describirán adicionalmente en la sección de descripción detallada que sigue, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende normalmente el experto en la materia a la que pertenece la invención. Se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica de la presente invención. A lo largo de toda la descripción y reivindicaciones no se pretende que la palabra "comprende" y sus variaciones excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Ausencia de respuesta hipotérmica inducida por bromhidrato de (*R*)-(+)-8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT, agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub>R) en ratones que recibieron localmente ARNip dirigido a 5-HT<sub>1A</sub>R (desnudo o conjugado) en el núcleo dorsal del rafe (NDR) como ejemplo de una medida funcional de la actividad presináptica de 5-HT<sub>1A</sub>R. Los ratones recibieron: i) vehículo; ii) ARNip desnudo sin sentido (ARNip desnudo ss); iii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iv) ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R desnudo o v) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (0,3 µg/1 µl/2 días en el NDR). También se evaluó un grupo adicional de ratones deficientes para 5-HT<sub>1A</sub>R (5-HT<sub>1A</sub>R-KO). Se evaluó la temperatura corporal 5 minutos antes y 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de 8-OH-DPAT (1 mg/kg i.p.). Los valores se muestran como media de cambios en la temperatura corporal ± EEM de 5-7 ratones por grupo. \*\* p < 0,01 significativamente diferente del vehículo, ARNip desnudo ss y ARNip-NLF ss respectivamente, usando ANOVA con medidas repetidas con tratamiento como el factor intermedio y tiempo como la variable intrasujeto, seguido por la prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple.

**Figura 2.** La infusión local de ARNip dirigido a 5-HT<sub>1A</sub>R (desnudo o conjugado) en el núcleo dorsal del rafe (NDR) indujo la disminución específica de los niveles de proteína de 5-HT<sub>1A</sub>R. Los ratones recibieron: i) vehículo; ii) ARNip desnudo sin sentido (ARNip desnudo ss); iii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iv) ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R desnudo o v) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (0,3 µg/1 µl/2 días en el NDR). Las barras muestran la cuantificación densitométrica de la unión de [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT a 5-HT<sub>1A</sub>R en el NDR de ratones expresada como media de 5-HT<sub>1A</sub>R fmol/mg de proteína de tejido ± EEM (dos observaciones a 3 niveles AP del núcleo dorsal del rafe por animal y de cuatro a cinco animales por grupo) \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 significativamente diferente del vehículo, ARNip desnudo ss y ARNip-NLF ss usando ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Newman-Keuls *a posteriori*.

**Figura 3.** Silenciamiento selectivo del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> mediante administración intracerebroventricular (i.c.v) de ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R conjugado. **A)** Se evaluó la expresión de 5-HT<sub>1A</sub>R en núcleos del rafe mediante hibridación *in situ*. Los ratones recibieron una administración única en el ventrículo dorsal 3 (D3V) de: i) vehículo; ii) ARNip desnudo sin sentido (ARNip desnudo ss); iii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iv) ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R desnudo o v) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (30 µg/2,5 µl/1 día). a1-a555 muestra secciones coronales de núcleos del rafe de ratones unidos con oligonucleótido marcado con <sup>33</sup>P en 3 coordenadas antero-posteriores (AP) diferentes en mm: -4,84/-4,96, -4,36/-4,60 y -4,24/-4,36 desde el bregma (caudal-rostral de izquierda a derecha). Barra de escala, 2 mm. **B)** Gran aumento de la sección mostrada en a111-a555. Barra de escala, 500 µm. **C)** Gráfico de barras que muestra que ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R

indujo una reducción del nivel del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R en el núcleo dorsal del rafe. La cuantificación densitométrica de los granos positivos del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R medido en películas se muestra como valores de porcentaje de las densidades ópticas (DO) medias ± EEM (n=4-5 ratones por grupo y de dos a cuatro observaciones a 3 niveles AP de núcleo dorsal del rafe). \*\* p < 0,01 significativamente diferente del vehículo, ARNip-NLF ss y ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R desnudo usando ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Newman-Keuls *a posteriori*.

**Figura 4.** ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R indujo el silenciamiento específico de 5-HT<sub>1A</sub>R en sitios presinápticos pero no postsinápticos. Se evaluaron los niveles de proteína 5-HT<sub>1A</sub>R en núcleo dorsal del rafe (**A**), corteza prefrontal (**B**) e hipocampo (**C**) mediante unión autorradiográfica usando <sup>3</sup>[H]-8-OH-DPAT. Los ratones recibieron una administración única en el ventrículo dorsal 3 (D3V) de: i) vehículo; ii) ARNip desnudo sin sentido (ARNip desnudo ss); iii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iv) ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R desnudo o v) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (30 µg/2,5 µl/1 día). Las barras representan medias de 5-HT<sub>1A</sub>R fmol/mg de proteína de tejido ± EEM (n=4-5 ratones por grupo y dos observaciones a 3 niveles AP del núcleo dorsal del rafe y dos observaciones en sitios izquierdo y derecho de la corteza prefrontal e hipocampo). \* p < 0,05 significativamente diferente de los otros tratamientos, usando ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Newman-Keuls *a posteriori*.

**Figura 5.** Los niveles de unión del transportador de serotonina-5-HT (5-HTT) y receptor 5-HT<sub>1B</sub> (5-HT<sub>1B</sub>R) en núcleo dorsal del rafe no cambiaron por el tratamiento con ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R. **A)** Se evaluaron los niveles de proteína 5-HTT en el núcleo dorsal del rafe mediante unión autorradiográfica usando <sup>3</sup>[H]-citalopram. **B)** Se evaluaron los niveles de proteína 5-HT<sub>1B</sub>R en el núcleo dorsal del rafe mediante unión autorradiográfica usando <sup>125</sup>I]cianopindolol en presencia de isoprenalina para bloquear los sitios β-adrenérgicos. Los ratones recibieron una administración única en el ventrículo dorsal 3 (D3V) de: i) vehículo; ii) ARNip desnudo sin sentido (ARNip desnudo ss); iii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iv) ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R desnudo o v) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (30 µg/2,5 µl/1 día). Los gráficos de barras muestran: **A)** medias de 5-HTT fmol/mg de proteína de tejido ± EEM y **B)** valores de porcentaje de las densidades ópticas (DO) medias ± EEM (n=4 ratones por grupo y dos observaciones a 3 niveles AP de núcleo dorsal del rafe).

**Figura 6.** Respuesta hipotérmica inducida por bromhidrato de (R)-(+)-8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT, agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub>R) como medida funcional de la actividad presináptica de 5-HT<sub>1A</sub>R. Los ratones recibieron una administración única en el ventrículo dorsal 3 (D3V) de: i) vehículo; ii) ARNip desnudo sin sentido (ARNip desnudo ss); iii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iv) ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R desnudo o v) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (30 µg/2,5 µl/1 día). También se evaluó un grupo adicional de ratones deficientes para 5-HT<sub>1A</sub>R (5-HT<sub>1A</sub>R-KO). Se evaluó la temperatura corporal 5 minutos antes y 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de 8-OH-DPAT (1 mg/kg i.p.). Nótese la ausencia de efecto de 8-OH-DPAT en la temperatura corporal en ratones con ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R conjugado y 5-HT<sub>1A</sub>R-KO. Los valores se muestran como medias de cambios en la temperatura corporal ± EEM de 7-10 ratones por grupo. \*\* p < 0,01 significativamente diferente del vehículo, ARNip desnudo ss, ARNip-NLF ss y ARNip-5-HT<sub>1A</sub>R desnudo, respectivamente, usando ANOVA con medidas repetidas con tratamiento como el factor intermedio y tiempo como la variable intrasujeto, seguido por la prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple.

**Figura 7.** Efecto de la administración sistémica de bromhidrato de (R)-(+)-8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT, 0,5 mg/kg i.p.) en niveles de 5-HT dializado en corteza prefrontal medial (CPFm) de ratones. Los grupos de ratones fueron: i) vehículo, ii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iii) ARNip-NLF dirigido a 5-HT<sub>1A</sub>R (ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R) y iv) ratones deficientes en 5-HT<sub>1A</sub>R (5-HT<sub>1A</sub>R-KO). Los ratones se infundieron con vehículo o ARNip a 30 µg/2,5 µl/1 día, i.c.v. y los experimentos de microdialisis se realizaron 24-48 horas después de la infusión. Nótese la ausencia de efecto de 8-OH-DPAT sobre los niveles reducidos de 5-HT en CPFm de ratones con autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> silenciado y 5-HT<sub>1A</sub>R-KO. Los datos se expresan como porcentaje del nivel basal y se muestran como media ± EEM (n=5-9 ratones/grupo). \*\* p < 0,01 significativamente diferente de los grupos de vehículo y ARNip-NLF ss, usando ANOVA con medidas repetidas con tratamiento como el factor intermedio y tiempo como la variable intrasujeto, seguido por la prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple.

**Figura 8.** Efecto de sertralina (inhibidor selectivo de transportador de serotonina-5-HTT) en la distribución de ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R conjugado a neuronas 5-HT. **A)** La inyección de dosis única de sertralina (20 mg/kg, i.p.) evitó el silenciamiento del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> por ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R conjugado y la administración en dosis única de 8-OHDPAT (agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub>R, 0,5 mg/kg i.p.) redujo los niveles de 5-HT en la corteza prefrontal medial. Los grupos de ratones fueron: i) vehículo, ii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iii) ARNip-NLF dirigido a 5-HT<sub>1A</sub>R (ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R) y iv) ratones deficientes en 5-HT<sub>1A</sub>R (5-HT<sub>1A</sub>R-KO). Los ratones recibieron una inyección única del inhibidor selectivo de 5-HTT, sertralina (20 mg/kg, i.p.) 3 horas antes de la infusión con el ARNip en D3V (30 µg/2,5 µl/1 día, i.c.v.). Además, un grupo de ratones recibió vehículo i.p. y vehículo en D3V. Los experimentos de microdialisis se realizaron 24 horas después de las administraciones i.c.v. de vehículo o ARNip. Los datos se expresan como porcentaje del nivel basal y se muestran como media ± EEM (n=5-8 ratones/grupo). \*\*\* p < 0,001 significativamente diferente de los grupos control y ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R, usando ANOVA unidireccional seguido por prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple. **B)** Efecto de la administración de 8-OH-DPAT (1 mg/kg i.p.) en la temperatura corporal en ratones ARNip-NLF previamente tratados con el inhibidor selectivo de 5-HTT, sertralina (20 mg/kg i.p.). Los grupos de ratones fueron similares al panel **A**. De forma diferente al grupo de ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R, las administraciones de 8-OH-DPAT produjeron una respuesta hipotérmica en ratones ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R pretratados con sertralina. Los valores

se muestran como media de cambios en la temperatura corporal  $\pm$  EEM de 6-10 ratones por grupo. \*\*\*  $p < 0,001$  usando ANOVA bidireccional seguido por prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple.

**Figura 9.** Efecto la administración en dosis única de fluoxetina (inhibidor selectivo de transportador de serotonina-5-HTT, 20 mg/kg, i.p) en los niveles de 5-HT dializados en la corteza prefrontal medial (CPFm) en ratones. Los grupos de ratones fueron: i) vehículo, ii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), iii) ARNip-NLF dirigido a 5-HT<sub>1A</sub>R (ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R) y iv) ratones deficientes en 5-HT<sub>1A</sub>R (5-HT<sub>1A</sub>R-KO). Los ratones se infusieron con vehículo o ARNip a 30  $\mu$ g/2,5  $\mu$ l/1 día, i.c.v. y los experimentos de microdialisis se realizaron 24-48 horas después de la infusión. Nótese el efecto aumentado de fluoxetina sobre los niveles de 5-HT en CPFm de ratones con silenciamiento de autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> similares a los de ratones 5-HT<sub>1A</sub>R-KO. Los datos se expresan como porcentaje del nivel basal y se muestran como media  $\pm$  EEM (n=4-6 ratones/grupo). \*\*  $p < 0,01$  significativamente diferente de los grupos de vehículo y ARNip-NLF ss, usando ANOVA con medidas repetidas con tratamiento como el factor intermedio y el tiempo como la variable intrasujeto, seguido por la prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple.

**Figura 10.** Sin cambios en el comportamiento similar a ansiedad, pero repuesta alterada en una prueba de estrés/depresión en ratones con autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> silenciado. Los grupos de ratones fueron: i) vehículo, ii) ARNip-NLF dirigido a 5-HT<sub>1A</sub>R (ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R) y iii) ratones deficientes en 5-HT<sub>1A</sub>R (5-HT<sub>1A</sub>R-KO). Los ratones se infusieron en D3V con vehículo o ARNip a 30  $\mu$ g/2,5  $\mu$ l/1 día, i.c.v. **A)** Se evaluó el comportamiento similar a ansiedad usando el modelo del laberinto en cruz elevado 24 horas después de las administraciones de vehículo o ARNip. De forma diferente a los ratones deficientes en 5-HT<sub>1A</sub>R (5-HT<sub>1A</sub>R-KO), los ratones con autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> silenciado (ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R) no mostraron diferencias en el número de entradas y tiempo pasado en los brazos abiertos de laberinto en cruz elevado. **B)** Se eligió la prueba de suspensión de la cola como modelo para evaluar la respuesta en una situación de estrés agudo/depresión. Esta prueba se evaluó 48 horas después de las administraciones de vehículo o ARNip. Los ratones con autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> silenciado y 5-HT<sub>1A</sub>R-KO mostraron movilidad aumentada, comparados con el grupo vehículo en una situación estresante. Los valores son medias  $\pm$  EEM (n=12-18 ratones/grupo). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativamente diferentes del vehículo usando ANOVA unidireccional seguido por prueba de Newman-Keuls *a posteriori*.

**Figura 11.** Silenciamiento selectivo del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> mediante administración intranasal de ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R conjugado. Los ratones recibieron una única administración intranasal de: i) vehículo, ii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss) y iii) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (15  $\mu$ g/5  $\mu$ l en cada narina). **A)** La expresión de 5-HT<sub>1A</sub>R en núcleo dorsal del rafe (NDR) se evaluó mediante hibridación *in situ*. El gráfico de barras muestra que ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R indujo una reducción en el nivel de ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R en NDR. La cuantificación densitométrica de los granos positivos del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R medida en películas se muestra como valores de porcentaje de densidades ópticas (DO) medias  $\pm$  EEM (n=4 ratones por grupo y dos observaciones en 3 niveles AP del NDR). **B-D)** ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R indujo un silenciamiento específico de 5-HT<sub>1A</sub>R en sitios presinápticos pero no postsinápticos. Se examinaron los niveles de proteína 5-HT<sub>1A</sub>R en el núcleo dorsal del rafe (**B**), corteza prefrontal (**C**) e hipocampo (**D**) mediante unión autorradiográfica usando <sup>3</sup>[H]-8-OH-DPAT. Las barras representan medias de 5-HT<sub>1A</sub>R fmol/mg de proteína de tejido  $\pm$  EEM (n=4 ratones por grupo y dos observaciones a 3 niveles AP del NDR y dos observaciones en sitios izquierdo y derecho de la corteza prefrontal e hipocampo). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  significativamente diferente de vehículo y ARNip-NLF ss usando ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Newman-Keuls *a posteriori*.

**Figura 12.** Ausencia de efecto de 8-OH-DPAT (agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub>R) en parámetros fisiológicos y neuroquímicos en ratones con autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> silenciado. Los grupos de ratones recibieron una única administración intranasal de: i) vehículo, ii) ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss) y iii) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (15  $\mu$ g/5  $\mu$ l en cada narina). **A)** De forma diferente a los ratones tratados con vehículo y ARNip-NLF ss, una dosis de 1 mg/kg i.p. de 8-OH-DPAT no produjo ningún cambio en la temperatura corporal en ratones ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R. Los valores se muestran como medias de cambios en la temperatura corporal  $\pm$  EEM (n=4-7 ratones por grupo). **B)** Niveles extracelulares de 5-HT medidos mediante microdialisis *in vivo* en CPFm de ratones vehículo, ARNip-NLF ss y ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R, después de administración sistémica de 8-OH-DPAT (0,5 mg/kg, i.p.). Los niveles de 5-HT se redujeron en CPFm tanto de vehículo como ARNip-NLF ss. Sin embargo, los ratones ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R mostraron ausencia de efecto de 8-OH-DPAT sobre los niveles de 5-HT en CPFm. Los datos se expresan como porcentaje del nivel basal y se muestran como media  $\pm$  EEM (n=4-9 ratones/grupo). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativamente diferente de los grupos de vehículo y ARNip-NLF ss, respectivamente usando ANOVA uni- o bidireccional, seguido por la prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple.

**Figura 13.** El ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R intranasal silencia los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> y evoca respuestas similares a antidepresivos. Los ratones recibieron una administración intranasal única de: i) vehículo, ii) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (15  $\mu$ g/5  $\mu$ l en cada narina) y iii) ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (50  $\mu$ g/5  $\mu$ l en cada narina). **A)** Ninguna dosis del ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R afectó las respuestas similares a ansiedad en el laberinto en cruz elevado (n = 6). Los valores son medias  $\pm$  EEM. **B)** Administración intranasal única de ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (30 o 100  $\mu$ g) evocó una inmovilidad disminuida dependiente de la dosis en la prueba de suspensión de la cola (n=10-15). Los valores son media  $\pm$  EEM. ANOVA unidireccional mostró un efecto significativo de grupo  $F_{2,34} = 8,70$ ,  $p < 0,001$ . \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  frente a vehículo. **C)** La administración intranasal única de ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R (100  $\mu$ g) evocó una inmovilidad disminuida en la prueba de la natación forzada

(n=13-16). Los valores son media  $\pm$  EEM. ANOVA unidireccional mostró un efecto significativo de grupo, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  frente a vehículo.

5 **Figura 14.** Silenciamiento específico del transportador de 5-HT (5-HTT) mediante administración intranasal de ARNip-NLF-5-HTT conjugado. **A)** La expresión de 5-HTT en el núcleo dorsal del rafe (DR) se evaluó mediante hibridación *in situ*. Los ratones recibieron una única administración de: i) vehículo, ii) ARNip-NLF-5HTT 5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  en cada narina (ARNip-NLF-5-HTT 10) y iii) ARNip-NLF-5HTT 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  en cada narina (ARNip-NLF-5-HTT 30). a1-a333 muestra secciones coronales de núcleos del rafe de ratones unidos con oligonucleótido específico de 5-HTT marcado con  $^{33}\text{P}$  en 3 coordinadas antero-posteriores (AP) diferentes en mm: -4,24/-4,36, -4,36/-4,60 y -4,72/-4,84 desde el bregma (rostral-caudal de izquierda a derecha). Barra de escala, 500  $\mu\text{m}$ . **B)** Gráfico de barras que muestra que ARNip-NLF-5HTT indujo una reducción en el nivel de ARNm de 5-HTT en núcleo dorsal del rafe. La cuantificación densitométrica de los granos positivos del ARNm de 5-HTT medida en películas se muestra como valores de porcentaje de densidades ópticas (DO) medias  $\pm$  EEM (n= 4 ratones por grupo y dos a cuatro observaciones en 3 niveles AP del núcleo de rafe dorsal). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  significativamente diferente de vehículo usando ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Newman-Keuls *a posteriori*.

15 **Figura 15.** ARNip-NLF-5-HTT indujo la disminución específica del transportador de serotonina evaluado mediante hibridación *in situ* y unión autorradiográfica. Los ratones recibieron una única administración de: i) vehículo, ii) ARNip-NLF sin sentido 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  en cada narina, iii) ARNip-NLF-5HTT 5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  en cada narina (ARNip-NLF-5HTT 10) y iv) ARNip-NLF-5HTT 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  en cada narina (ARNip-NLF-5HTT 30). **A)** Gráfico de barras que muestra que ARNip-NLF-5HTT indujo una reducción del nivel del ARNm de 5HTT en los núcleos del rafe dorsales (DR) y medios (MnR). Cuantificación densitométrica de granos positivos de ARNm de 5-HTT nmedida en películas se muestra como valores de porcentaje de densidades ópticas medias (DO)  $\pm$  EEM (n=7-10 ratones por grupo). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  significativamente diferente de vehículo y ARNip-NLF sin sentido en la misma región usando ANOVA unidireccional seguido por prueba de Newman-Keuls *a posteriori*. **B-C)** Análisis densitométrico de unión específica de 5-HTT se presenta como % de unión en la región correspondiente de ratones infundados con vehículo, para ilustrar el nivel de disminución de 5-HTT inducida por ARNip-NLF en cada región. Las barras representan media  $\pm$  EEM de 6-9 ratones/grupo). \*  $p < 0,005$ , \*\*  $p < 0,01$  significativamente diferente de vehículo y ARNip-NLF sin sentido en la misma región usando ANOVA unidireccional seguido por prueba de Newman-Keuls *a posteriori*.

30 **Figura 16. A)** Efecto de la administración en dosis única de fluoxetina (inhibidor selectivo de transportador de 5-HT, 20 mg/kg, i.p) en los niveles de 5-HT en dializados en el cuerpo estriado dorsal de ratones. Los ratones recibieron una única administración de: i) vehículo, ii) ARNip-NLF-5HTT 5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  en cada narina (ARNip-NLF-5-HTT 10) y iii) ARNip-NLF-5HTT 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  en cada narina (ARNip-NLF-5-HTT 30). Los experimentos de microdialisis se realizaron 24-48 horas después de la aplicación. La fluoxetina produjo un nivel aumentado de 5-HT en el cuerpo estriado dorsal del grupo vehículo, pero no en los grupos de ARNip-NLF-5HTT. **B)** Efecto local de inhibidor selectivo del transportador de 5-HT, citalopram (Cit) en los niveles de 5-HT en el cuerpo estriado dorsal de ratones tratados con vehículo y ARNip-NLF-5HTT. La administración local de citalopram aumentó el nivel de 5-HT en el cuerpo estriado dorsal del grupo vehículo en una manera dependiente de la concentración. Sin embargo, citalopram sólo a 50  $\mu\text{M}$  produjo un ligero aumento de los niveles de 5-HT en el cuerpo estriado de grupos de ARNip-NLF-5HTT. Los datos se expresan como porcentaje del nivel basal y se muestran como media  $\pm$  EEM (n=7-8 ratones/grupo). \*\*  $p < 0,01$  significativamente diferente del vehículo usando ANOVA con medidas repetidas con tratamiento como el factor intermedio y el tiempo como la variable intrasujeto, seguido por la prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple.

35 **Figura 17.** Direccionamiento selectivo de neuronas dopaminérgicas en la región pars compacta de la sustancia negra con ARNip-NLF-SS-Cy3. A y C muestran el marcaje rojo de ARNip-NLF-SS-Cy3 1 y 3 horas respectivamente después de la administración ICV del ARNip en el mesencéfalo ventral de ratón. B y D muestran el mismo marcaje mezclado con tinción de tirosina hidroxilasa (TH). Después de 1 hora de la administración ICV de ARNip-NLF-SS-Cy3 (A y B), se puede detectar marcaje rojo (Cy3) en neuronas negras positivas para TH (azul), pero no en las neuronas gabaérgicas de la sustancia negra reticulada (\*). El marcaje rojo sigue un patrón puntuado (recuadro). Después de 3 horas de la inyección no se puede detectar ningún marcaje rojo intracelular (C y D).

45 **Figura 18.** Direccionamiento selectivo de neuronas noradrenérgicas del locus cerúleo con ARNip-NLF-SS-Cy3. A y C muestran el marcaje rojo de ARNip-NLF-SS-Cy3 1 y 3 horas respectivamente después de la administración ICV del ARNip. B y D muestran el mismo marcaje mezclado con tinción de tirosina hidroxilasa (TH). Después de 1 hora de la administración ICV de ARNip-NLF-SS-Cy3 (A y B), se puede detectar marcaje rojo (Cy3) principalmente en neuronas noradrenérgicas positivas para TH (azul). El marcaje rojo sigue un patrón puntuado (recuadro). Después de 3 horas de la inyección no se puede detectar ningún marcaje rojo intracelular (C y D).

55 **Figura 19.** Acumulación selectiva de oligonucleótido sin sentido modificado con 2-O'-metil (TOM) conjugado con sertralina (C-ss-TOM) en neuronas de serotonina del rafe. Los ratones recibieron una infusión intracerebroventricular única de C-ss-TOM marcado con Cy3 (30  $\mu\text{g}$ ) en el tercer ventrículo dorsal y se sacrificaron 24 horas después de la infusión (n=2 ratones). Imágenes por confocal láser de núcleos de células inmunorreactivas YOYO1 (verde) que muestran C-ss-TOM marcada con Cy3 inmunolocalizada (rojo). La barra de escala es 40  $\mu\text{m}$ .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han observado que, de forma inesperada, es posible dirigir específicamente un ácido nucleico a una célula de interés que expresa un transportador de neurotransmisor acoplado covalentemente dicho ácido nucleico a una molécula que es capaz de unirse específicamente a dicho transportador del neurotransmisor y, más en particular, a un inhibidor de dicho transportador.

#### 5 A. Conjugados de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende:

- 10 i) al menos un agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor en donde el agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), un inhibidor de la recaptación de noradrenalina (IRN), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina y,
- ii) al menos un oligonucleótido que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador del neurotransmisor,

15 en donde la unión del ácido nucleico a la molécula diana produce una inhibición de la actividad de la molécula diana.

El término "conjugado", como se usa aquí se refiere a cualquier compuesto resultante de la unión covalente de dos o más compuestos individuales. En la presente invención, conjugado se refiere a una molécula que comprende un ácido nucleico y un agente de selectividad que están covalentemente acoplados, siendo dicho acoplamiento directo o a través de un compuesto enlazador.

20 Los términos "acoplamiento covalente" o "unión covalente" significan que el ácido nucleico y el agente de selectividad están unidos covalentemente entre sí de forma directa, o están unidos covalentemente entre sí de forma indirecta a través de un grupo o grupos intermedios, tales como un enlazador, o un puente, o un espaciador, grupo o grupos.

#### A.1. El agente de selectividad

25 La expresión "agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor", como se usa aquí, se refiere a cualquier sustancia que se une a un transportador de neurotransmisor seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), un inhibidor de la recaptación de noradrenalina (IRN), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND). Esta especificidad de unión permite la distribución de una molécula que esté unida a dicho agente de selectividad a la célula, tejido u órgano que contiene dicho transportador de neurotransmisor. De esta manera, un conjugado que tenga dicho agente de selectividad se dirigirá específicamente a dichas células cuando se administra a un animal o se pone en contacto *in vitro* con una población de células de diferentes tipos.

35 Como se usa aquí, la unión específica de una primera molécula a una segunda molécula se refiere a la capacidad de la primera molécula de unirse a dicha segunda molécula de una manera que es mediblemente diferente de una interacción no específica. Un agente de selectividad según la presente invención puede mostrar una Kd para la diana (el transportador del neurotransmisor) de al menos alrededor de  $10^{-4}$  M, de forma alternativa al menos alrededor de  $10^{-5}$  M, de forma alternativa al menos alrededor de  $10^{-6}$  M, de forma alternativa al menos alrededor de  $10^{-7}$  M, de forma alternativa al menos alrededor de  $10^{-8}$  M, de forma alternativa al menos alrededor de  $10^{-9}$  M, de forma alternativa al menos alrededor de  $10^{-10}$  M, de forma alternativa al menos alrededor de  $10^{-11}$  M, de forma alternativa al menos alrededor de  $10^{-12}$  M o mayor.

45 El término "transportador de neurotransmisor", como se usa aquí, se refiere a una proteína que pertenece a una clase de proteínas transportadoras de membrana que atraviesa las membranas celulares de neuronas y cuya función primaria es llevar neurotransmisores a través de estas membranas y dirigir su transporte adicional a localizaciones intracelulares específicas. Los transportadores de neurotransmisores que se pueden tener como diana por los agentes de selectividad de la invención incluyen, sin limitación, transportadores de captación presentes en la membrana plasmática de neuronas y células de glía, que bombean neurotransmisores desde el espacio extracelular a la célula. Este proceso se basa en el gradiente de Na<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática, particularmente el cotransporte de Na<sup>+</sup>. Se han identificado dos familias de proteínas. Una familia incluye los transportadores de GABA, monoaminas tales como noradrenalina, dopamina, serotonina y aminoácidos tales como glicina y prolina. Los componentes estructurales comunes incluyen doce putativos dominios transmembrana de  $\alpha$ -hélice, extremos N- y C- citoplásmicos y un gran bucle extracelular glicosilado que separa los dominios transmembrana tres y cuatro. Esta familia de proteínas homólogas deriva su energía del cotransporte de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> con el neurotransmisor en la célula (transportadores de neurotransmisores Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>). La segunda familia incluye transportadores para aminoácidos excitadores como glutamato. Los componentes estructurales comunes incluyen de 6-10 putativos dominios transmembrana, extremos N- y C- citoplásmicos y glicosilaciones en los bucles extracelulares. Los transportadores de aminoácidos excitadores no dependen de Cl<sup>-</sup> y pueden requerir iones intracelulares de K<sup>+</sup> (transportadores de neurotransmisores Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) (Liu, Y. *et al.* (1999) Trends

Cell Biol. 9: 356-363).

Los transportadores de neurotransmisores que pueden ser dianas de los agentes de selectividad de la invención también incluyen transportadores de neurotransmisores presentes en membranas de vesículas intracelulares, típicamente vesículas sinápticas, cuya función primaria es concentrar neurotransmisores del citoplasma en la vesícula, antes de la exocitosis del contenido vesicular durante la transmisión sináptica. El transporte vesicular usa el gradiente electroquímico a través de la membrana vesicular generado por una H<sup>+</sup>-ATPasa. Dos familias de proteínas están implicadas en el transporte de neurotransmisores a vesículas. Una familia usa principalmente el intercambio de protones para dirigir el transporte en las vesículas secretoras e incluye los transportadores para monoaminas y acetilcolina. Por ejemplo, los transportadores de monoaminas intercambian dos protones lumbales por cada molécula de transmisor citoplásmico. La segunda familia incluye los transportadores de GABA, que se basan en la carga positiva en el interior de la vesícula sináptica. Las dos clases de transportadores vesiculares no muestran similitud de secuencia entre sí y tienen estructuras diferentes de las de transportadores de la membrana plasmática (Schloss, P. *et al.* (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 595-599; Liu, Y. *et al.* (1999) *Trends Cell Biol.* 9: 356-363).

Los tipos específicos de transportadores de neurotransmisores que pueden ser diana de los agentes de selectividad de la invención incluyen transportadores de monoaminas, incluyendo el transportador de dopamina (DAT), transportador de norepinefrina (NET), transportador de serotonina (SERT), transportador vesicular de monoaminas 1 (VMAT1) y transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2).

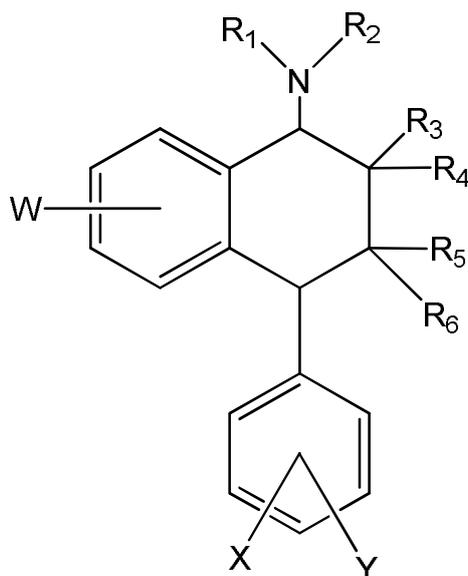
En una forma de realización preferida, el agente de selectividad no es un péptido.

El agente de selectividad se selecciona del grupo de inhibidores de la recaptación de serotonina (IRS), un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN), un inhibidor de la recaptación de noradrenalina (IRN) y un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND).

El término "inhibidor de la recaptación de serotonina" o "IRS" se refiere a una molécula que es capaz de bloquear la captación de serotonina e incluye tanto inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) (que bloquean específicamente la captación de serotonina sin afectar sustancialmente a otros neurotransmisores) así como inhibidores no selectivos de la recaptación de serotonina tal como los inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN) y los inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND).

El término "inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina" o "ISRS" se refiere a inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina sin afectar sustancialmente la recaptación de otros neurotransmisores o sistemas transportadores. Estos compuestos actúan principalmente en la célula serotoninérgica presináptica produciendo un aumento en el nivel extracelular del neurotransmisor serotonina, aumentado por ello el nivel de serotonina disponible para unirse al receptor postsináptico e invertir la deficiencia de la actividad de este sistema de neurotransmisor monoaminérgico en el cerebro. Ejemplos ilustrativos no limitantes de ISRS incluyen sertralina (CAS 79617-96-2), un análogo estructural de la sertralina, fluoxetina (CAS 54910-89-3), fluvoxamina (CAS 54739-18-3), paroxetina (CAS 61869-08-7), indaplina (CAS 63758-79-2), zimeldina (CAS 56775-88-3), citalopram (CAS 59729-33-8) y escitalopram (CAS 219861-08-2). Los ensayos para determinar si un compuesto determinado actúa como un ISRS son, por ejemplo, la capacidad de reducir la captación *ex vivo* de serotonina y de antagonizar el efecto de reducir la serotonina de p-cloroanfetamina sin afectar a la captación en corazón de rata de [<sup>3</sup>H]norepinefrina como se describe esencialmente en Koe *et al.* (*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1983, 226:686-700).

En una forma de realización preferida, el ISRS es sertralina o un análogo estructural del mismo que tiene la estructura (I)

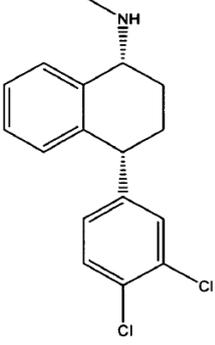
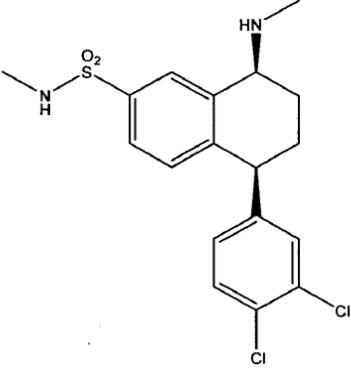
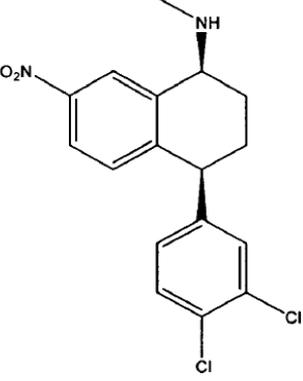
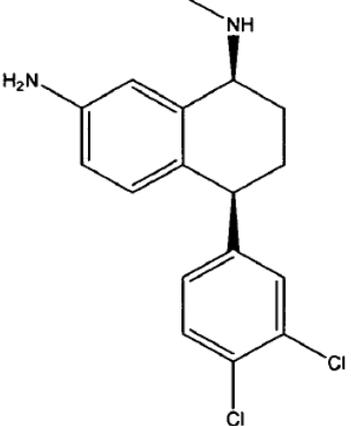


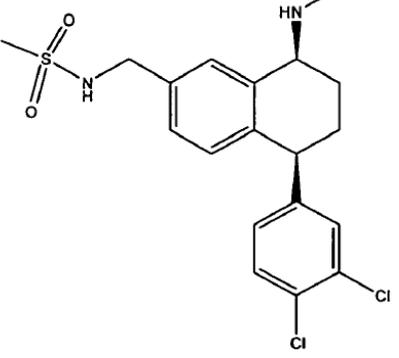
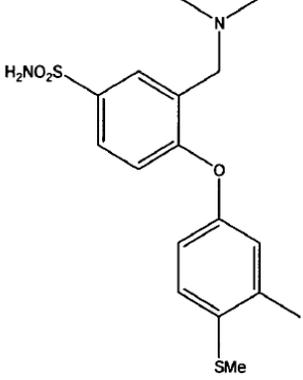
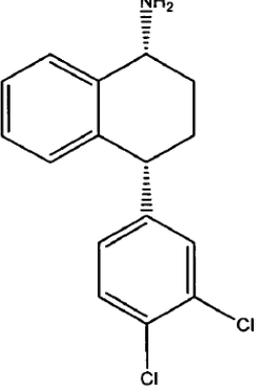
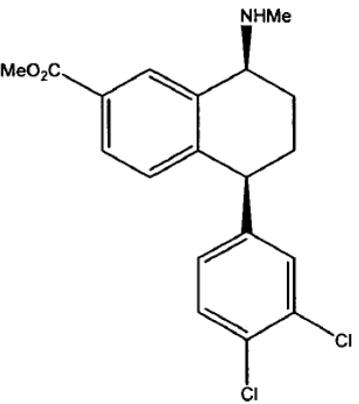
(I)

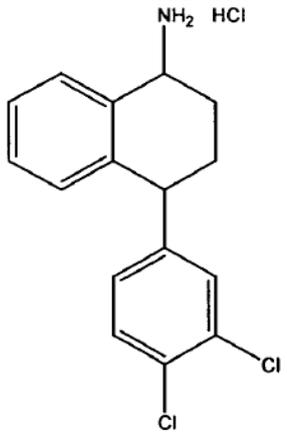
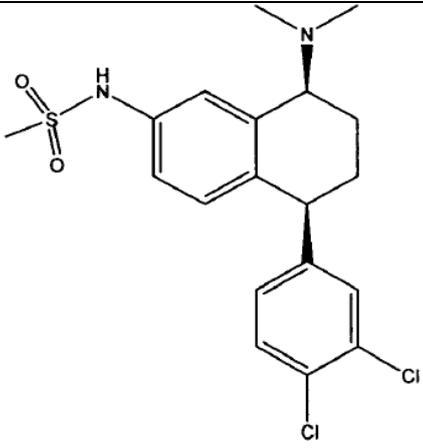
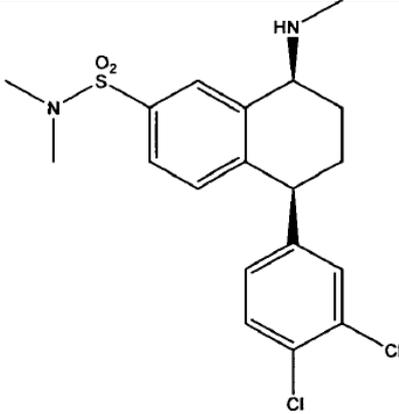
- en donde, de forma independiente, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son hidrógeno o un alquilo de C1-C6 opcionalmente sustituido; X e Y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en hidrógeno, flúor, cloro, bromo, trifluorometilo, alcoxi de C1-C3 y ciano; y W se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, flúor, cloro, bromo, trifluorometilo, nitro y alcoxi de C1-C3. En algunas formas de realización, los análogos de sertralina están en la configuración isomérica cis. El término "isomérico cis" se refiere a la orientación relativa de los grupos NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> y fenilo en el anillo de ciclohexeno (es decir, ambos están orientados al mismo lado del anillo). Puesto que tanto los carbono 1- como 4- están asimétricamente sustituidos, cada compuesto cis tiene dos formas enantioméricas ópticamente activas denominadas (con referencia al carbono I) los enantiómeros cis-(1R) y cis-(1S).
- 5
- 10 Ciertos análogos de sertralina útiles son los siguientes compuestos, en las formas enantiomérica (1S) o racémica (1S)(1R), y sus sales farmacéuticamente aceptables:
- cis-N-metil-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina;
  - cis-N-metil-4-(4-bromofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina;
  - cis-N-metil-4-(4-clorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina;
  - 15 - cis-N-metil-4-(3-trifluorometil-fenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina;
  - cis-N-metil-4-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina;
  - cis-N,N-dimetil-4-(4-clorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina;
  - cis-N,N-dimetil-4-(3-trifluorometil-fenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina y
  - cis-N-metil-4-(4-clorofenil)-7-cloro-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina.
- 20 También es de interés el enantiómero (1R) de cis-N-metil-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina.

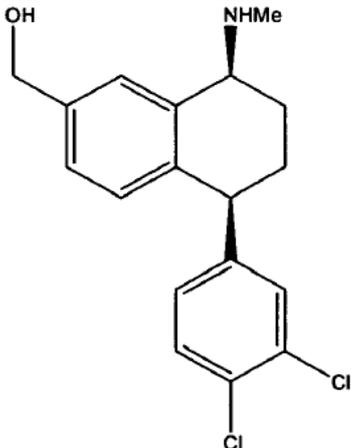
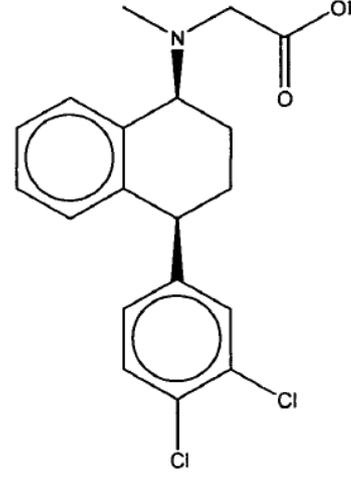
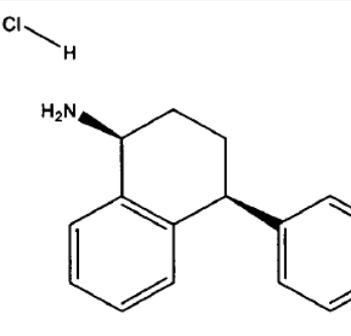
También se describen análogos de sertralina en la patente de EE. UU. No. 4536518. Otros compuestos relacionados incluyen (S,S)-N-desmetilsertralina, rac-cis-N-desmetilsertralina, (1S,4S)-desmetil sertralina, 1-des(metilamina)-1-oxo-2-(R,S)-hidroxi sertralina, (1R,4R)-desmetil sertralina, sertralina, sulfonamida, sertralina (inversa) metano sulfonamida, 1R,4R sertralina, enantiómero, N,N-dimetil sertralina, nitro sertralina, sertralina anilina, yoduro de sertralina, sertralina sulfonamida NH<sub>2</sub>, sertralina sulfonamida etanol, sertralina nitrilo, sertralina-CME, dimetil sertralina inversa sulfonamida, sertralina inversa sulfonamida (enlazador CH<sub>2</sub>), sertralina anillo B orto metoxi, éster metílico de sertralina anillo A, sertralina anillo A etanol, sertralina N,N-dimetilsulfonamida, sertralina anillo A ácido carboxílico, sertralina anillo B parafenoxi, sertralina anillo B para-trifluorometano, N,N-dimetil sertralina anillo B y para-trifluorometano, y UK-416244. Las estructuras de estos análogos se muestran a continuación.

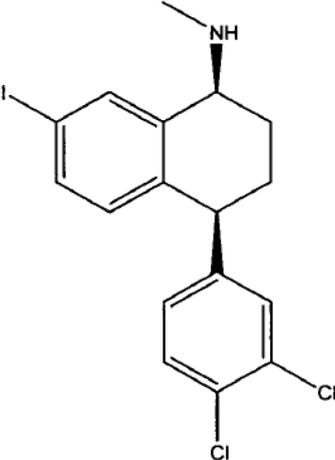
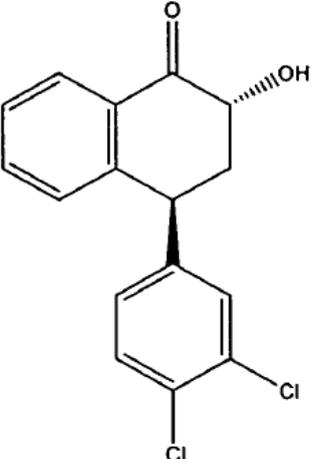
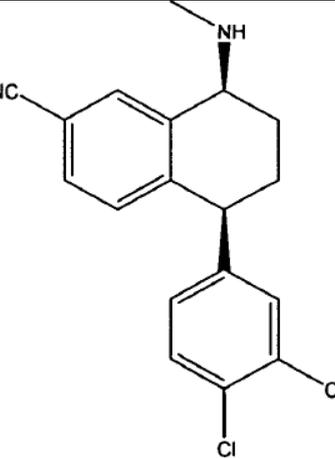
25

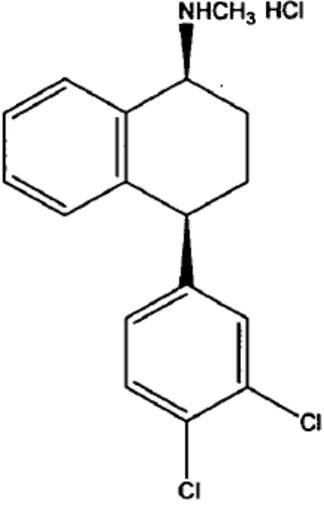
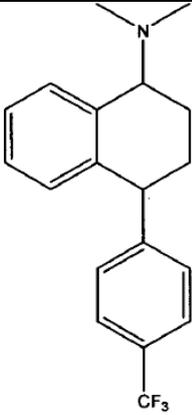
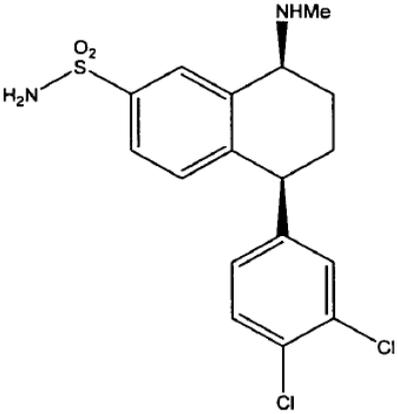
	<p>Enantiómero 1R,4R de sertralina</p>
	<p>Sertralina sulfonamida</p>
	<p>Nitro sertralina</p>
	<p>Sertralina anilina</p>

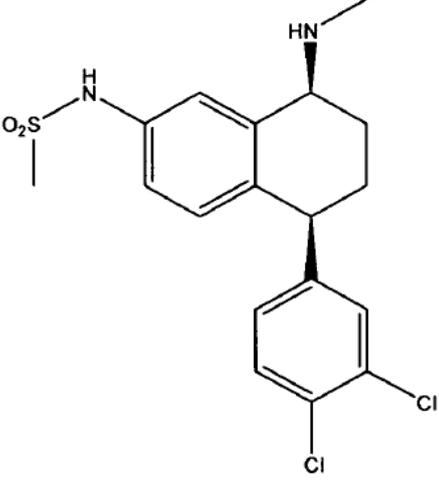
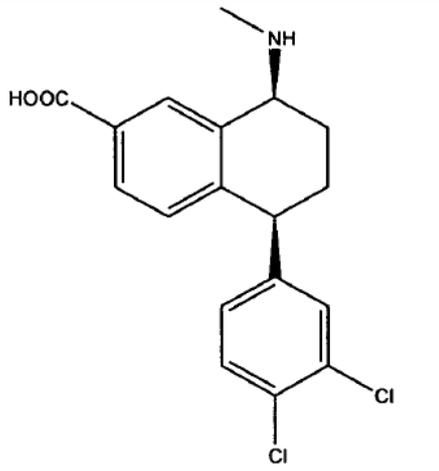
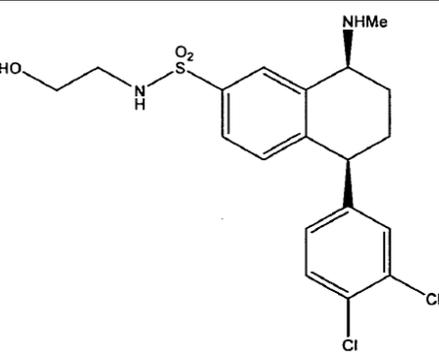
	<p>Sertralina inversa sulfonamida (enlazador CH<sub>2</sub>)</p>
	<p>UK-416244</p>
	<p>(1R,4R)-desmetilsertralina</p>
	<p>Éster metílico de sertralina anillo A</p>

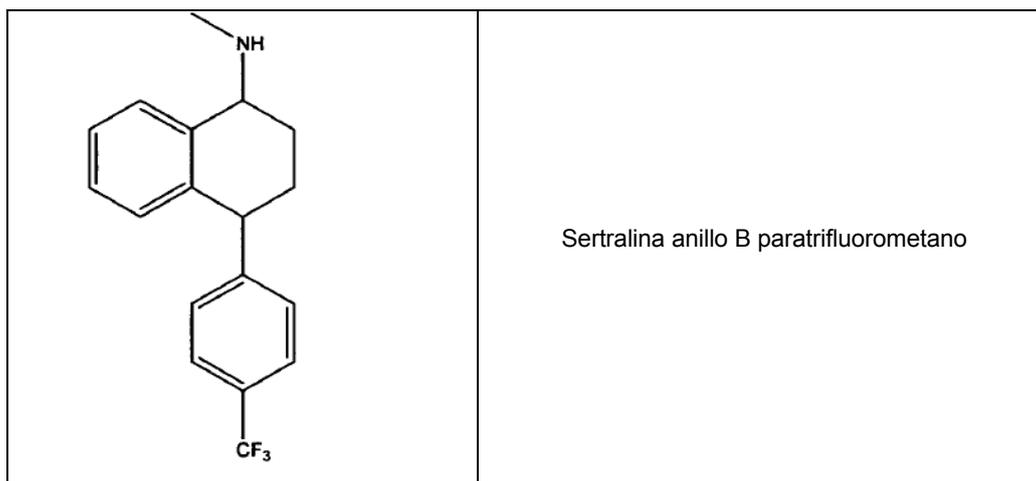
	<p>Clorhidrato de rac-cis-N-desmetil sertralina</p>
	<p>Dimetil sertralina inversa sulfonamida</p>
	<p>Sertralina N,N-dimetilsulfonamida</p>

 <p>The structure shows a piperidine ring with an N-methyl group (NHMe) and a 3,4-dichlorophenyl group. The piperidine ring is also substituted with a 4-hydroxyphenyl group.</p>	<p>Sertralina anillo A etanol</p>
 <p>The structure shows a piperidine ring with a 3,4-dichlorophenyl group and a 1-methyl-2-(3-oxopropylamino)phenyl group.</p>	<p>Sertralina-CME</p>
 <p>The structure shows a piperidine ring with a primary amine group (H<sub>2</sub>N) and a 3,4-dichlorophenyl group. A hydrogen chloride salt (Cl-H) is indicated above the structure.</p>	<p>Clorhidrato de (1S,4S)-desmetil sertralina</p>

	<p>Yoduro de sertralina</p>
	<p>1-Des(metilamina)-1-oxo-2-(R,S)hidroxil sertralina</p>
	<p>Sertralina nitrilo</p>

	<p>Clorhidrato de sertralina</p>
	<p>N,N-dimetil sertralina anillo B paratriluorometano</p>
	<p>Sertralina sulfonamida NH<sub>2</sub></p>

	<p>Sertralina (inversa) metanosulfonamida</p>
	<p>Sertralina anillo A ácido carboxílico</p>
	<p>Sertralina sulfonamida etanol</p>



El término "inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina" o "IRSN" se refiere a una familia de compuestos que son capaces de inhibir la recaptación de serotonina bloqueando el transportador de serotonina y la recaptación de norepinefrina bloqueando el transportador de norepinefrina. Esta familia incluye compuestos tales como venlafaxina (CAS 93413-69-5), desvenlafaxina (CAS 93413-62-8), duloxetine (CAS 116539-59-4), milnacipran (CAS 92623-85-3), sibutramina (106650-56-0), tramadol (CAS 27203-92-5) y bicifadina (CAS 71195-57-8). Los ensayos para determinar si un compuesto determinado actúa como un IRSN son, por ejemplo, la capacidad de reducir la captación de serotonina y norepinefrina por sinaptosomas de cerebro como se describe esencialmente en Bolden-Watson C, Richelson E. (Life Sci. 1993;52(12):1023-9). Un tipo particular de IRSN son antidepresivos tricíclicos que son IRSN que tienen una estructura molecular general que comprende tres anillos. Entre los antidepresivos tricíclicos son prominentes los tricíclicos lineales, por ejemplo, imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, doxepina, ketipramina, mianserina, dotiepina, amoxapina, dibenzepina, melitraceno, maprotilina, flupentixol, azafeno, tianeptina y compuestos relacionados que muestran una actividad similar. Los tricíclicos angulares incluyen indrilina, clodazona, nomifensina y compuestos relacionados. Se ha mostrado que una variedad de otros antidepresivos estructuralmente diversos, por ejemplo, iprindol, wellbatrina, nialamida, milnaciprano, fenelzina y tranilcipromina producen actividades similares. Son funcionalmente equivalentes a los antidepresivos tricíclicos y por lo tanto están incluidos en el ámbito de la invención. De esta manera, el presente inventor pretende que el término antidepresivo tricíclico abarque una clase amplia de antidepresivos descritos anteriormente junto a compuestos relacionados que comparten la propiedad común de que todos poseen actividad antidepresiva y que incluye, sin limitación, compuestos tales como amitriptilina, amitriptilinoxido, carbamazepina, butriptilina, clomipramina, demexiptilina, desipramina, dibenzepina, dimetacrina, dosulepina/dotiepina, doxepina, imipramina, imipraminóxido, liprindol, lofepramina, melitraceno, metapramina, nitroxazepina, nortriptilina, noxiptilina, pregabalina, propizepina, protriptilina, quinupramina y trimipramina.

El término "inhibidor de la recaptación de noradrenalina", "IRN", "IRNE", "inhibidor de la recaptación adrenérgica" o "IRA" se refiere a una familia de compuestos que son capaces de bloquear la recaptación de noradrenalina y adrenalina bloqueando la acción del transportador de norepinefrina (NET). Esta familia de compuestos incluye los IRN selectivos que bloquean exclusivamente el NET sin afectar a otros transportadores de monoamina así como IRN no selectivos tales como los IRSN, que bloquean el transportador de norepinefrina y el transportador de serotonina (véase anteriormente), los inhibidores de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND), que bloquean los transportadores de norepinefrina y dopamina (véase posteriormente), antidepresivos tricíclicos y antidepresivos tetracíclicos (véase anteriormente). Los INR selectivos adecuados para la presente invención incluyen sin limitación, atomoxetina/tomoxetina (Strattera o CAS 83015-26-3), mazindol (Mazanor, Sanorex o CAS 22232-71-9), reboxetina (Edronax, Vestra o CAS 98819-76-2) y viloxazina (Vivalan or CAS 46817-91-8).

El término "inhibidor de la recaptación de dopamina" o "IRD" actúa como un inhibidor de recaptación para el neurotransmisor dopamina bloqueando la acción del transportador de dopamina (DAT). Esto a su vez produce concentraciones extracelulares aumentadas de dopamina y por lo tanto un aumento en la neurotransmisión dopaminérgica. Los IRD adecuados incluyen, sin limitación, fármacos tales como amineptina, benztropina/benzotropina, bupropión, dexmetilfenidato, esketamina, etibenzatropina/Ethybe, Ponalide, fencamfamina, fencamina, ketamina, lefetamina, medifoxamina, mesocarb, metilfenidato, nefopam, nomifensina, pipradrol, prolintano, pirovalerona, tiletamina y tripelenamina; productos químicos de investigación tales como altropano, ácido amfonélico, benociclidina, brasofensina, bromantano, DBL-583, dicloropano, diclofensina, dieticlidina, difluoropina, gaciclidina, GBR-12.935, indatralina, yoflupano, yometopano, manifaxina, radafaxina, tametralina, tesofensina, troparil y vanoxerina. Los IRD adecuados se pueden identificar usando ensayos que conoce el experto en la materia tales como la determinación de la capacidad del putativo IRD de inhibir la captación de alta afinidad de la dopamina por preparaciones sinaptosómicas preparadas de cuerpo estriado de rata llevados a cabo como se describe usando métodos publicados por Kula *et al.*, (Life Sciences 34: 2567-2575, 1984).

El término “inhibidor de la recaptación de endocannabinoides” o “IReCB”, como se usa aquí, se refiere a cualquier compuesto que actúa como inhibidor de la recaptación de endocannabinoides bloqueando la acción del transportador de endocannabinoides. Los compuestos que tienen esta actividad se pueden identificar usando el método descrito en Beltramo, M. *et al.* (Science, 1997, 277:1094–1097) basado en la capacidad del putativo inhibidor de recaptación de endocannabinoides de bloquear la captación de anandamida por neuronas y astrocitos de rata e incluye, sin limitación, AM404, arvanil y olvanil.

El término “inhibidor de la recaptación de adenosina” o “IRAdo” se refiere a un compuesto que actúa como un inhibidor de recaptación para el nucleósido de purina y neurotransmisor adenosina bloqueando la acción de uno o más de los transportadores equilibrativos de nucleósidos (ENT). Esto a su vez produce concentraciones extracelulares aumentadas de adenosina y por lo tanto un aumento en la neurotransmisión adenosinérgica. Los compuestos que tienen actividad IRAdo se pueden identificar usando un ensayo *in vitro* basado en la capacidad del putativo IRAdo en inhibir la captación de adenosina por eritrocitos así como ensayos *in vivo* basados en la capacidad del putativo IRAdo de inhibir el efecto vasodilatador de la adenosina así como de prevenir el fomento del crecimiento de vasos colaterales mediado por adenosina, todo lo que se puede llevar a cabo esencialmente como se describe en US6984642. Los IRAdo adecuados incluyen, sin limitación, acadesina, acetato, barbitúricos, benzodiazepinas, bloqueantes de canales de calcio, carbamacepina, carisoprodol, cilostazol, ciclobenzaprina, dilazep, dipiridamol, estradiol, etanol (alcohol), flumazenil, hexobendina, hidroxizina, indometacina, inosina, KF24345, meprobamato, nitrobenziltioguanosina, nitrobenziltioinosina, papaverina, pentoxifilina, fenotiazinas, fenitoina, progesterona, propentofilina, propofol, puromicina, R75231, RE 102 BS, solufazina, toyocamicina, trazazolato, antidepresivos tricíclicos.

El término “inhibidor de la recaptación de aminoácidos excitadores” o “IRAAE”, se refiere a compuestos que inhiben la recaptación de aminoácidos excitadores bloqueando el transportador de aminoácidos excitadores o EAAT. Se sabe que muchos compuestos se unen a los EAAT e inhiben la función transportadora. Los inhibidores de EAAT se clasifican en dos clases principales que se diferencian en su modo de acción: bloqueantes no transportables y sustratos competitivos. Los IRAAE adecuados incluyen, sin limitación, DL-treo-beta-benciloxiaspartato, cainita, dihidrocainata, 2S4R4MG, treo-β-hidroxiaspartato, ácido L-*trans*-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (*t*-2,4-PDC). Los IRAAE adecuados se pueden identificar por ejemplo, usando un ensayo descrito por Shimamoto *et al.* (Molecular Pharmacology, 1998, 53:195-201) basado en la capacidad de putativo IRAAE de inhibir la captación de glutamato radiomarcado por células Cos-1 que expresan el transportador de aminoácidos excitadores humano 1 (EAAT1) o el transportador de aminoácidos excitadores humano 2 (EAAT2).

El término “inhibidor de la recaptación de glutamato” o “IRGlu”, se refiere a un compuesto que actúa como un inhibidor de recaptación para el glutamato bloqueando la acción de uno o más de los transportadores de glutamato. Los inhibidores adecuados de la recaptación de glutamato abarcan cualquiera de esos inhibidores que ya se conocen en la técnica, incluyendo, de forma ilustrativa, ácido treo-3-hidroxi-DL-aspartico (THA), ácido (2S)-*trans*-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC), ácido aminocaproico y (2S,3S)-3-{3-[4-(trifluorometil)benzoilamino]benciloxi}aspartato. Los compuestos que tienen actividad IRGlu se pueden identificar por ejemplo usando el ensayo descrito por Shimamoto *et al.* (Molecular Pharmacology, 1998, 53:195-201) basado en la capacidad de putativo IRGlu de inhibir la captación de glutamato radiomarcado por células Cos-1 que expresan el transportador de aminoácidos excitadores humano 1 (EAAT1) o el transportador de aminoácidos excitadores humano 2 (EAAT2).

El término “inhibidor de la recaptación de GABA” o “IRG”, se refiere a un compuesto que actúa como un inhibidor de la recaptación para el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) bloqueando la acción de los transportadores de ácido gamma-aminobutírico (GAT). Esto a su vez produce concentraciones extracelulares aumentadas de GABA y por lo tanto un aumento en la neurotransmisión GABAérgica. Los inhibidores adecuados de la recaptación de GABA incluyen, sin limitación, adhiperforina (encontrada en *Hypericum perforatum* (hierba de san Juan)), CI-966, deramciclano (EGIS-3886), Guvacina (C10149), hiperforina (encontrada en *Hypericum perforatum* (hierba de san Juan)), ácido nipecotico, NNC 05-2090, NNC-711, SKF-89976A, SNAP-5114, estiripentol y Tiagabina (Gabitril) que se describen en Borden LA *et al.* (Eur J Pharmacol. 1994, 269: 219–224). Los métodos para detectar si un compuesto determinado es un inhibidor de la recaptación de GABA se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en US6906177; US6225115; US4383999 y Ali, F. E., *et al.* (J. Med. Chem. 1985, 28, 653-660). Estos métodos normalmente comprenden poner en contacto una célula con GABA radiomarcado y detectar la captación de GABA en presencia y ausencia de un compuesto candidato.

El término “inhibidor de la recaptación de glicina” o “IRGly” se refiere a un compuesto que actúa como un inhibidor de recaptación para el neurotransmisor glicina bloqueando la acción de los transportadores (GlyT) incluyendo compuestos que bloquean el transportador de glicina (tipo 1) GlyT1 que está implicado en la eliminación de glicina de la hendidura sináptica así como GlyT2 que se necesita para la recaptación y recarga de glicina en la vesícula sináptica (Gomez *et al.*, 2003; Curr Opin Drug Discov Devel 6(5): 675-82). Los inhibidores de la recaptación de glicina adecuados para su uso en la presente invención incluyen inhibidores específicos de GlyT1 tales como N-metil-N-[[[(1R,2S)-1,2,3,4-tetrahydro-6-metoxi-1-fenil-2-naftalenil]metil glicina (la base libre de MTHMPNMglicina), ácido 4-[3-fluoro-4-propoxifenil]-espiro[2H-1-benzopiran-2,4'-piperidin]-1'-acético (la base libre de FPPSBPAA) que se describen en WO0007978 y WO0136423, ALX 5407, sarcosina, 5,5-diaril-2-amino-4-pentenoatos o los compuestos descritos en WO0208216 así como inhibidores específicos de GlyT2 tales como los descritos en WO05044810A.

Los métodos para detectar inhibidores de recaptación específicos de GlyT1 y GlyT2 se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo el método descrito en WO05018676A o WO05044810 en donde células que expresan el receptor relevante (GlyT1 o GlyT2) se ponen en contacto con glicina radiomarcada en presencia del compuesto cuya actividad inhibitoria de la recaptación se va a ensayar y se determina la cantidad de glicina encontrada en el interior de la célula después de un tiempo determinado.

El término “inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina” o “IRND”, como se usa aquí, se refiere a un compuesto que actúa como un inhibidor de recaptación para los neurotransmisores norepinefrina y dopamina bloqueando la acción del transportador de norepinefrina (NET) y el transportador de dopamina (DAT), respectivamente. Esto a su vez produce concentraciones extracelulares aumentadas tanto de norepinefrina como de dopamina y por lo tanto un aumento en las neurotransmisiones adrenérgica y dopaminérgica. Los IRND adecuados para su uso en los conjugados de la presente invención incluyen, sin limitación, amineptina (Survector, Maneon, Directin), bupropión (Wellbutrin, Zyban), dexametilfenidato (Focalin), fencamfamina (Glucocenergán, Reactivan), fencamina (Altimina, Sicochlor), lefetamina (Santenol), metilfenidato (Ritalin, Concerta), nomifensina (Merital), pipradrol (Meretran), prolintano (Promotil, Katovit), pirovalerona (Centrotron, Thymergix), nefopam (Acupan), adhiperforina (encontrada en *Hypericum perforatum* (hierba de San Juan)), hiperforina (encontrada en *Hypericum perforatum* (hierba de San Juan)), cocaína, desoxipipradrol (2-DPMP), difenilprolinol (D2PM), metilendioxipirovalerona (MDPV), cilobamina, manifaxina (GW-320.659), radafaxina (GW-353.162), tametralina (CP-24.441).

En una forma de realización preferida, el conjugado de la invención contiene un agente de selectividad que es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS). En una forma de realización aún más preferida, el ISRS es sertralina o un análogo estructural de la misma como se define anteriormente.

#### A.2. El ácido nucleico de los conjugados de la invención

El segundo componente de los conjugados según la presente invención es un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador del neurotransmisor. Típicamente, el ácido nucleico de la invención es capaz de inhibir la función de la molécula diana. De esta manera, si la molécula diana es un ARNm, entonces el ácido nucleico (típicamente un ARNip, un ARNhc o un ácido nucleico antisentido) actúa inhibiendo la traducción del ARNm lo que produce un descenso en los niveles de la proteína codificada por el ARNm. Si la molécula diana es una proteína, entonces el ácido nucleico (típicamente un aptámero) actúa inhibiendo la actividad de la proteína.

El término “ácido nucleico”, como se usa aquí, se refiere a un polímero que tiene dos o más moléculas de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de nucleótidos así como moléculas que son estructuralmente similares a un ácido nucleico nativo, pero se diferencian del ácido nucleico nativo (por ejemplo, mediante modificación química) en uno o más del esqueleto del ácido nucleico (por ejemplo, fosfato en ácidos nucleicos nativos), azúcar del ácido nucleico (por ejemplo, desoxirribosa para ADN nativo y ribosa en ARN nativo) y base del ácido nucleico (por ejemplo, adenosina, citosina, guanina o timidina en ácidos nucleicos nativos).

El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido bicatenario o monocatenario incluyendo, sin limitación, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN horquillado corto (ARNhc), microARN (miARN), oligonucleótidos antisentido o ribozimas. Si se usan ácidos nucleicos bicatenarios, estos comprenden una primera cadena sentido que es complementaria al ácido nucleico diana y una segunda cadena antisentido que es complementaria a la sentido, que permite la formación del ADN bicatenario mediante la formación de pares de bases de la primera y segunda cadena.

El término “cadena antisentido” se refiere a la cadena de un ácido nucleico bicatenario que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. Donde la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los malos emparejamientos son más tolerados fuera de los nucleótidos 2-7 del extremo 5' de la cadena antisentido.

El término “cadena sentido”, como se usa aquí, se refiere a la cadena de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la cadena antisentido.

El término ARN interferente pequeño (“ARNip”) se refiere a dúplex de ARN inhibidores pequeños que inducen la vía de interferencia de ARN. Estas moléculas pueden variar en longitud (generalmente de 18-30 pares de bases) y contienen grados variables de complementariedad a sus ARNm diana en la cadena antisentido. Algunos ARNip, pero no todos, tienen bases no apareadas sobresalientes en el extremo 5' ó 3' de la hebra sentido y/o la hebra antisentido. El término “ARNip” incluye dúplex de dos cadenas separadas. Como se usa aquí, las moléculas de ARNip no están limitadas a moléculas de ARN sino que abarcan además ácidos nucleicos con uno o más nucleótidos químicamente modificados, tales como morfolinós.

El término “ARNhc” o “ARN horquillado corto” como se usa aquí, se refiere a un ARNbc donde las dos cadenas están unidas por una cadena sin interrumpir de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva para formar una estructura dúplex.

El término “micro ARN” o “miARN” se refiere a moléculas de ARN monocatenario cortas, típicamente de alrededor de 21-23 nucleótidos de longitud capaces de regular la expresión génica. Los miARN pueden ser sintéticos (es decir, recombinantes) o naturales. Los miARN naturales están codificados por genes que se transcriben del ADN y se procesan de transcritos primarios (“pri-miARN”) a estructuras cortas de tallo-bucle (“pre-miARN”) y por último a miARN maduro. Las moléculas de miARN maduro son parcialmente complementarias a una o más moléculas de ARNm y disminuyen la expresión génica a través de un proceso similar a la interferencia de ARN o inhibiendo la traducción del ARNm.

Una “secuencia antisentido”, como se usa aquí, incluye oligonucleótidos antisentido o sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenario (ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm (sentido) o ADN (antisentido) diana. Se describe la capacidad de derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basada en una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada en, por ejemplo, Stein y Cohen, *Cancer Res.* 48:2659, (1988) y van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6:958, (1988).

Como se usa aquí, el término “ribozima” o “enzima de ARN” o “ARN catalítico” se refiere a una molécula de ARN que cataliza una reacción química. Muchas ribozimas naturales catalizan la hidrólisis de uno de sus propios enlaces fosfodiéster o la hidrólisis de enlaces en otros ARN, pero también se ha encontrado que catalizan la actividad aminotransferasa del ribosoma, la actividad ligasa de una ADN ligasa y un número de otras reacciones químicas realizadas por enzimas proteicas convencionales.

Un “aptámero” como se usa aquí, se refiere a un ligando de ácido nucleico que se une a más de un sitio en una molécula diana donde la unión no es “complementaria”, es decir, no se debe a la formación de pares de bases entre un ligando ácido nucleico y una secuencia diana de ácido nucleico. Se puede diseñar un aptámero que se una a cualquier diana previsible, incluyendo polipéptidos. Los aptámeros ofrecen la utilidad para las aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con la de la biomolécula normalmente usada, anticuerpos. Además de su reconocimiento selectivo, los aptámeros ofrecen ventajas sobre los anticuerpos ya que se pueden manipular completamente en un tubo de ensayo y se producen fácilmente mediante síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. Los aptámeros se pueden sintetizar mediante rondas repetidas de reparto *in vitro*, selección y amplificación, una metodología conocida en el estado de la técnica como “SELEX” (siglas en inglés de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) (Shamah *et al.*, *Acc. Chem. Res.* 2008, 41 pp. 130-8). De forma alternativa, se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante fase sólida paso a paso.

El ácido nucleico que forma parte de los conjugados de la invención puede contener una o más modificaciones en las nucleobases, en los azúcares y/o en los enlaces entre nucleótidos.

Las modificaciones a uno o más residuos del esqueleto de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: modificaciones del azúcar en 2' tal como 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-metoxietoxi, 2'-fluoro (2'-F), 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo], 2'-O-(N-metilcarbamato); modificaciones del azúcar en 4' incluyendo 4'-tio, puente 4'-CH<sub>2</sub>-O-2', puente 4-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'; ácido nucleico cerrado (LNA); ácido péptido nucleico (APN); ácido nucleico intercalante (INA); ácido nucleico intercalante enrollado (TINA); ácidos nucleicos de hexitol (HNA); ácido arabinonucleico (ANA); ácidos ciclohexano nucleicos (CNA); ácido ciclohexenilnucleico (CeNA); ácido treosil nucleico (TNA); oligonucleótidos morfolinos; Gap-meros; Mix-meros; incorporación de péptidos ricos en arginina; adición de 5'-fosfato a ARN sintéticos; aptámeros de ARN (Que-Gewirth NS, *Gene Ther.* 2007 Feb;14(4):283-91); aptámeros de ARN regulados con antídotos en el sujeto del aptámero de ARN específico (ref. Oney S, *Oligonucleotides.* 2007 Fall; 17(3):265-74) o cualquier combinación de los mismos.

Las modificaciones a uno o más enlaces entre nucleósidos de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: fosforotioato, fosforamidato, fosforodiamidato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato y fosforanilidato, o cualquier combinación de los mismos.

Un ácido nucleico cerrado (LNA), con frecuencia denominado ARN inaccesible, es un nucleótido de ARN modificado. El grupo ribosa de un nucleótido LNA se modifica con un puente extra que une los carbonos 2' y 4' (puente O2',C4'-metileno). El puente “cierra” la ribosa en la conformación estructural 3'-endo, que con frecuencia se encuentra en la forma A del ADN o ARN. Los nucleótidos LNA se pueden mezclar con bases de ADN o ARN en el ácido nucleico cuando se desee. Tales oligómeros están comercialmente disponibles. La conformación cerrada de la ribosa aumenta el apilamiento de bases y pre-organización del esqueleto. Esto aumenta significativamente la estabilidad térmica (temperatura de fusión) y la afinidad de hibridación de ácidos nucleicos modificados con LNA, además de tener capacidades mejoradas en la discriminación a malos emparejamientos. Estas propiedades los hacen muy útiles para técnicas antisentido. Además, los oligonucleótidos LNA anti-miR se han probado en primates con resultados esperanzadores y baja toxicidad.

Un ácido péptido nucleico (APN) es un polímero artificialmente sintetizado similar a ADN o ARN y se usa en investigación biológica y tratamientos médicos. No se sabe que el APN se produzca de forma natural. EL ADN y ARN tienen un esqueleto de azúcar de desoxirribosa y ribosa, respectivamente, mientras que el esqueleto de APN está compuesto de unidades repetitivas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. Las diferentes bases de

purina y pirimidina están unidas al esqueleto por enlaces metilen-carbonilo. Los APN se representan como péptidos, con el N-terminal en la primera posición (izquierda) y el C-terminal a la derecha. Puesto que el esqueleto del APN no contiene grupos fosfato cargados, la unión entre las hebras APN/ADN es más fuerte que entre las hebras ADN/ADN debido a la falta de repulsión electrostática. Las moléculas de bases mezcladas de APN son imitadores verdaderos de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. La unión APN/APN es más fuerte que la unión APN/ADN.

Un ácido nucleico intercalante (INA) es un análogo de ácido nucleico modificado que comprende desoxirribonucleótidos normales unidos covalentemente a inserciones hidrofóbicas. El INA tiene una gran afinidad por el ADN complementario con estabilización de hasta 11 grados para cada modificación. El INA tiene mayor especificidad por una diana completamente apareada sobre dianas mal apareadas que el ADN normal. Utilizando que los INA tienen mayor afinidad por ADN hace posible usar sondas más cortas y aumentar así la especificidad incluso más. Además, un INA es un análogo oligonucleotídico selectivo de ADN, con una capacidad única para discriminar entre ADN y ARN. Incluso aunque los INA tienen altas afinidades para ADN complementario, tiene una menor afinidad por una secuencia complementaria de INA complementarios. Los ácidos nucleicos intercalantes enrollados se denominan TINA.

Los ácidos nucleicos de hexitol (HNA) son nucleótidos contruidos de nucleobases naturales y un esqueleto 1,5-anhidrohexitol fosforilado. Las asociaciones moleculares entre HNA y ARN son más estables que entre HNA y ADN y entre ácidos nucleicos naturales (ADNbc, ARNbc, ADN/ARN). Otros oligonucleótidos sintéticamente modificados comprenden ANA (ácido arabinonucleico), CNA (ácidos ciclohexano nucleicos), CeNA (ácido ciclohexenilnucleico) y TNA (ácido treosilnucleico).

Los morfolinos son moléculas sintéticas que son el producto de un rediseño de la estructura natural del ácido nucleico. Estructuralmente, la diferencia entre morfolinos y ADN o ARN es que mientras los morfolinos tienen nucleobases estándar, esas bases están unidas a anillos de 6 miembros de morfolina en lugar de a anillos de desoxirribosa/ribosa y los enlaces fosfordiamidato no iónicos entre las subunidades reemplazan los enlaces fosfodiéster aniónicos. Los morfolinos se denominan algunas veces PMO (oligonucleótido fosfordiamidato de morfolino). El anillo de morfolina de 6 miembros tiene la fórmula química  $O-(CH_2-CH_2)_2-NH$ .

Los gapmeros o "compuestos oligoméricos con huecos" son sondas oligonucleotídicas quiméricas de ARN-ADN-ARN, donde se insertan ventanas o 'huecos' ('gaps') de ADN en un oligonucleótido de ARN de otra manera normal o modificado conocidas como "alas". Esta modificación aumenta la estabilidad del oligonucleótido *in vivo* y la avidéz de la interacción de la sonda con la diana, de modo que se pueden usar sondas más cortas de forma eficaz. Preferiblemente, las alas son oligonucleótidos 2'-O-metil (OMe) o 2'-O-metoxietil (MOE) modificados que protegen el bloque interno de la degradación por nucleasas. Además, los nucleótidos que forman el hueco o las alas pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o por enlaces fosforotioato, que los hace así resistentes a la degradación por RNasa. Además, los nucleótidos que forman las alas también pueden estar modificados por incorporación de bases unidas por enlaces 3' metilfosfonato.

Los ácidos nucleicos de los conjugados de la invención son capaces de unirse específicamente a la molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador del neurotransmisor. La unión del ácido nucleico a la molécula diana se puede producir a través de interacciones de Watson-Crick en donde la molécula diana es un ácido nucleico que contiene una secuencia que es complementaria a la secuencia del ácido nucleico. De forma alternativa, cuando la molécula diana es un polipéptido, el ácido nucleico de los conjugados de la invención también puede interactuar con dicha molécula, en cuyo caso el ácido nucleico actúa como un aptámero.

En donde el ácido nucleico que forma parte de los conjugados de la invención es complementario a la secuencia de ácido nucleico del ARNm diana, el experto en la materia dispone de diferentes criterios para seleccionar el ácido nucleico más adecuado. A modo de ejemplo, cuando el ácido nucleico que forma parte del conjugado es un ARNip, este se puede seleccionar mediante barrido de la secuencia del ARNm de la diana para dinucleótidos AA y registrar los 19 nucleótidos inmediatamente posteriores de los AA. También se pueden usar otros métodos para seleccionar las dianas de ácido nucleico. En un ejemplo, la selección de la secuencia diana del ARNip se determina puramente de forma empírica (véase, por ejemplo, Sui G *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5515-20 (2002)), siempre que la secuencia diana empiece con GG y no comparta homología de secuencia significativa con otros genes analizados mediante búsqueda con BLAST. En otro ejemplo, se emplea un método más elaborado para seleccionar las secuencias diana del ARNip. Este procedimiento explota una observación de que cualquier sitio accesible en el ARNm endógeno puede ser diana para degradación por el método oligodesoxirribonucleótido sintético/RNasa H (véase, por ejemplo, Lee NS *et al.*, Nature Biotechnol. 20:500-05 (2002)).

De forma alternativa se construye el casete de expresión del ARNip horquillado para que contenga la hebra sentido de la diana, seguido por un espaciador corto, la hebra antisentido de la diana y 5-6 T como terminación de transcripción. El orden de las hebras sentido y antisentido dentro de las construcciones de expresión de ARNip se puede cambiar sin afectar las actividades de silenciamiento génico del ARNip horquillado. En ciertos casos, la inversión del orden puede producir reducción parcial en las actividades de silenciamiento génico.

La longitud de la secuencia de nucleótidos que se usa como tallo del casete de expresión del ARNip puede variar, por

ejemplo, de 19 a 29. El tamaño del bucle puede variar de 3 a 23 nucleótidos. También se pueden usar otras longitudes y/o tamaños del bucle.

En aún otra forma de realización, se puede usar un saliente 5' en la construcción ARNip horquillada, siempre que el ARNip horquillado sea funcional en el silenciamiento génico. En un ejemplo específico, el saliente 5' incluye alrededor de 6 residuos de nucleótidos.

En aún otra forma de realización, la secuencia diana para ARNi es un fragmento 21-mero de secuencia. El extremo 5' de la secuencia diana tiene el dinucleótido "NA", donde "N" puede ser cualquier base y "A" representa adenina. La secuencia 19-mera restante tiene un contenido en GC de entre el 35% y el 55%. Además, la secuencia 19-mera restante no incluye cuatro A o T consecutivas (es decir, AAAA o TTTT), tres G o C consecutivas (es decir, GGG o CCC) o siete "GC" seguidas.

También se pueden usar criterios adicionales para seleccionar las secuencias diana para ARNi. Por ejemplo, el contenido de GC de la secuencia 19-mera restante se puede limitar a entre el 45% y el 55%. Además, se excluye cualquier secuencia 19-mera que tenga tres bases idénticas consecutivas (es decir, GGG, CCC, TTT o AAA) o una secuencia palindrómica con 5 o más bases. Además, se puede seleccionar la secuencia 19-mera restante para tenga baja homología de secuencia a otros genes. En un ejemplo específico, se buscan secuencias diana potenciales mediante BLASTN contra la base de datos de secuencias de agrupamientos de UniGene humano del NCBI. La base de datos de UniGene humano contiene conjuntos no redundantes de agrupamientos orientados de genes. Cada agrupamiento de UniGene incluye secuencias que representan un gen único. Se pueden seleccionar secuencias 19-meras que no coinciden con otros genes humanos en la búsqueda de BLASTN. Durante la búsqueda, el valor e se puede ajustar a un valor riguroso (tal como "1").

La eficacia de las secuencias del ARNip, así como de cualquier otra secuencia de ARNi derivada según la presente invención en silenciar la expresión del gen diana, se puede evaluar usando varios métodos conocidos en la técnica.

Los términos "silenciar" e "inhibir la expresión de", "disminuir la expresión de", "suprimir la expresión de" y similares, en tanto que se refieren a un gen diana, se refieren aquí a la supresión al menos parcial de la expresión de un gen diana, manifestado mediante la reducción de la cantidad de ARNm diana, que se puede aislar de una primera célula o grupo de células en las que se transcribe el gen diana y que se ha o han tratado de modo que se inhibe la expresión de un gen diana, comparada con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no se ha o han tratado (células control). El grado de inhibición normalmente se expresa en términos de:

$$\frac{(\text{ARNm en células control}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células control})} * 100 \text{ por ciento}$$

(ARNm en células control)

De forma alternativa, el grado de inhibición se puede dar en términos de una reducción de un parámetro que está unido funcionalmente a la expresión del gen diana, por ejemplo, la cantidad de proteína codificada por un gen diana o el número de células que muestran un cierto fenotipo. En principio, se puede determinar el silenciamiento del genoma diana en cualquier célula que expresa la diana, de forma constitutiva o por manipulación genética, y mediante cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia para determinar si un ácido nucleico determinado inhibe la expresión de un gen diana en un cierto grado y por lo tanto está abarcado por la presente invención, el ensayo proporcionado en los ejemplos posteriores y los conocidos en la técnica sirven como tal referencia. Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión de un gen diana se suprime al menos en alrededor del 5 por ciento, el 10 por ciento, el 15 por ciento, el 20 por ciento, el 25 por ciento, el 30 por ciento, el 35 por ciento, el 40 por ciento, el 45 por ciento o el 50 por ciento mediante la administración del oligonucleótido bicatenario. En algunas formas de realización, se suprime un gen diana en al menos alrededor del 60 por ciento, el 70 por ciento o el 80 por ciento mediante la administración del oligonucleótido bicatenario. En algunas formas de realización, el gen diana se suprime en al menos alrededor del 85 por ciento, el 90 por ciento, o el 95 por ciento mediante la administración del oligonucleótido bicatenario.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico según la presente invención se puede introducir en una célula que expresa el gen diana. El nivel de ARNm del gen diana en la célula se puede detectar usando RT-PCR, transferencia de Northern o cualquier otro método estándar. De forma alternativa, el nivel de polipéptido codificado por el ARNm diana se puede medir usando inmunotransferencia, ELISA o cualquier otro método inmunológico o no inmunológico. Un cambio sustancial en el nivel de expresión del ARNm o de la proteína codificada por el gen diana después de la introducción de la secuencia ARNip es indicativo de la eficacia de la secuencia ARNip en suprimir la expresión del gen diana. En un ejemplo específico, los niveles de expresión de otros genes también se controlan antes y después de introducir la secuencia ARNip. Se puede seleccionar una secuencia ARNip que tiene efecto inhibitorio sobre la expresión del gen diana pero no afecta significativamente la expresión de otros genes. En otro ejemplo específico, se pueden introducir múltiples ARNip u otras secuencias de ARNi en la misma célula diana. Estas secuencias ARNip o ARNi específicamente inhiben la expresión de genes diana pero no la expresión de otros genes. En aún otro ejemplo específico, se pueden usar ARNip u otras secuencias ARNi que inhiben la expresión del gen diana y de otro gen o genes.

El experto en la materia apreciará que la elección específica de la molécula de ácido nucleico que se incorpora en los conjugados de la invención dependerá del tipo de agente de selectividad presente en el conjugado. De esta manera, el ácido nucleico será específico para una molécula diana que se expresa en las células que expresan el transportador del neurotransmisor al que se une específicamente el agente de selectividad.

- 5 En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es específico para el receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>). En esos casos en los que el ácido nucleico es un antisentido, un ARNip, un ARNhc o una ribozima, el ácido nucleico actúa mediante apareamiento de bases con la molécula diana, en cuyo caso la molécula diana es el ARNm que codifica el receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>). Si el ácido nucleico es un aptámero, la molécula diana es polipéptido del receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>).
- 10 El término "receptor de serotonina de tipo 1A" o "5-HT<sub>1A</sub>R", como se usa aquí, se refiere a un tipo de receptor de serotonina que se encuentra predominantemente en la neurona serotoninérgica presináptica. Estos receptores se activan por serotonina extracelular produciendo la reducción de la actividad de descarga celular y, a su vez, un descenso en la liberación de serotonina en las áreas principales de prosencéfalo. Esta retroalimentación negativa limita el aumento de serotonina sináptica que se puede inducir por antidepresivos de una dosis. A lo largo del tiempo, los autorreceptores somatodendríticos se desensibilizan, lo que permite que se exprese el efecto completo de los ISRS en el prosencéfalo. Se ha encontrado que este periodo de tiempo corresponde con la latencia para el inicio de la actividad antidepresiva [Perez, V., *et al.*, *The Lancet*, 1997, 349: 1594-1597]. De esta manera, en células en donde se inactiva el receptor de serotonina de tipo 1A, el aumento en la serotonina extracelular como consecuencia del bloqueo en el transportador de serotonina no producirá una reducción en la actividad de descarga celular, previniendo así la retroalimentación negativa asociada con el tratamiento por inhibidores de la recaptación de serotonina.

El receptor de serotonina de tipo 1A que puede ser diana del ácido nucleico de los conjugados de la invención puede ser cualquier receptor de serotonina de tipo 1A incluyendo, sin limitación, el 5-HT<sub>1A</sub>R humano, cuya secuencia se da en la base de datos SwissProt con el número de acceso P08908, el 5-HT<sub>1A</sub>R de ratón, cuya secuencia se da en la base de datos SwissProt con el número de acceso Q64264, el 5-HT<sub>1A</sub>R de rata, cuya secuencia se da en la base de datos SwissProt con el número de acceso P19327, el 5-HT<sub>1A</sub>R de perro, cuya secuencia se da en la base de datos SwissProt con el número de acceso Q6XXX9.

El experto en la materia apreciará que el ácido nucleico de la invención específico hacia el ARNm que codifica 5-HT<sub>1A</sub>R se puede seleccionar usando cualquiera de los métodos mencionados anteriormente y probar su capacidad para inducir un descenso sustancial en los niveles del ARNm correspondiente. Los autores de la presente invención han identificado regiones en la secuencia del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R que los ácidos nucleicos de la invención pueden usar preferentemente como dianas. Estas regiones corresponden a regiones que están muy conservadas entre diferentes especies o regiones que corresponden a regiones no codificantes del transcrito primario para evitar interferencia potencial con complejos de traducción dentro de la región codificante.

De esta manera, en una forma de realización preferida, las secuencias de ácido nucleico son complementarias a una región correspondiente a los nucleótidos 621 a 1640 o a los nucleótidos 1880 a 2400 en el ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R de ratón (secuencia con el número de acceso NM\_008308 en la base de datos de NCBI) o las regiones correspondientes en los ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R de otras especies. Dichas regiones correspondientes se pueden determinar mediante alineamientos por pares de dichos ADNc con el ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R de ratón o mediante alineamientos múltiples de diferentes ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R e identificación de las regiones en dichos otros ADNc que solapan con las regiones seleccionadas en el ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R de ratón.

Los métodos para el alineamiento por pares de dos secuencias de ácidos nucleicos determinadas los conoce ampliamente el experto en la materia y se pueden llevar a cabo mediante algoritmos estándar del tipo BLASTN [BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)] usando los parámetros por defecto. Los métodos para el alineamiento de múltiples secuencias de ácidos nucleicos se pueden llevar a cabo usando algoritmos estándar del tipo CLUSTALW (Thompson JD *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1994, 22:4673-4680) usando los parámetros por defecto. Una vez que se han identificado las regiones en el ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R en diferentes especies, es posible identificar secuencias adecuadas de ácido nucleico que se pueden incorporar en los ácidos nucleicos de los conjugados de la invención. En una forma de realización preferida, el conjugado de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que está dirigida a la región en el ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1 (nucleótidos 1841 a 1910 del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R de ratón), SEQ ID NO: 2 (nucleótidos 591 a 700 del ARNm del 5-HT<sub>1A</sub>R de ratón), SEQ ID NO: 3 (nucleótidos 831 a 940 del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R de ratón) y SEQ ID NO: 4 (nucleótidos 2120 a 4411 del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R de ratón).

En una forma de realización aún más preferida, el ácido nucleico de los conjugados de la invención comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11 (véase la tabla 2).

55 Si los ácidos nucleicos se suministran como ácidos nucleicos bicatenarios (por ejemplo, como ARNip), los oligonucleótidos se ajustan a la hebra antisentido correspondiente que se proporciona en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 (véase la tabla 2).

En otra forma de realización, el ácido nucleico de la invención se dirige al ARNm que codifica el transportador de serotonina (en donde el ácido nucleico actúa mediante emparejamiento de bases con la diana) o al transportador de la serotonina como tal (en donde el ácido nucleico actúa como un aptámero uniéndose directamente e inhibiendo la actividad del polipéptido).

5 El término “transportador de serotonina” o “SERT”, como se usa aquí, se refiere a un polipéptido que es una proteína integral de membrana que transporta el neurotransmisor serotonina de los espacios sinápticos a neuronas presinápticas. Las secuencias de SERT humana, de rata, ratón y bovina se proporcionan en la base de datos SwissProt con los números de acceso P31645, P31652, Q60857 y Q9XT49 respectivamente. De forma similar a los ácidos nucleicos que se dirigen al ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R, cualquier región del ADNc de SERT puede ser diana siempre que produzca una inhibición sustancial de los niveles del ARNm correspondiente o la proteína codificada por dicho ARNm. De esta manera, se pueden identificar los ácidos nucleicos específicos de SERT adecuados como se ha descrito anteriormente midiendo los niveles del ARNm de SERT o la proteína SERT en células que expresan SERT después de haber puesto en contacto dichas células con el ácido nucleico que se va a probar.

15 A modo de ejemplo, se pueden usar ARNip específicos de SERT como se describe en Mol. Psychiatry. 2005 Agosto; 10(8):782-9, 714 y J. Recept. Signal Transduct. Res. 2006; 26:527-47. En una forma de realización aún más preferida, el ARNip específico de SERT contiene la secuencia

5' CUCCUGGAACACUGGCAACdTdT 3' (SEQ ID NO:13)

En aún otra forma de realización, los ARNip específicos de SERT comprenden las secuencias descritas en la tabla X.

Identificación de oligonucleótido de ARN	Secuencia (dirección 5'-3')	SEQ ID NO:
ARNip-A-s (sentido)	GCUAGCUACAACAAGUUCATT	14
ARNip-A-a (antisentido)	UGAACUUGUUGUAGCUAGCTT	15

25 Además de 5-HT<sub>1A</sub> presináptico también es posible modular la acción de 5-HT<sub>1A</sub> modulando algunos canales iónicos que están después de la acción de 5-HT<sub>1A</sub>, tales como TREK-1 o GIRK. Estos canales modulan la actividad neuronal hiperpolarizando la membrana produciendo una gran entrada de potasio. Este cambio en el potencial de membrana inhibe la descarga celular. Se ha propuesto que un antagonista de TREK-1 o GirK aumentará la actividad neuronal. Al final esto romperá el efecto de inhibición presináptica de 5-HT<sub>1A</sub> en presencia de altos niveles de serotonina.

30 En otra forma de realización, el ácido nucleico de la invención se dirige al ARNm que codifica un canal iónico que actúa después de la acción de 5-HT<sub>1A</sub> (en donde el ácido nucleico actúa mediante emparejamiento de bases con la diana) o al canal iónico que actúa después de 5-HT<sub>1A</sub> como tal (en donde el ácido nucleico actúa como un aptámero uniéndose directamente e inhibiendo la actividad del polipéptido). Esos canales modulan la actividad neuronal hiperpolarizando la membrana mediante la producción de una gran entrada de potasio. Este cambio en el potencial de membrana inhibe la descarga celular. Al final esto romperá el efecto de inhibición presináptica de 5-HT<sub>1A</sub> en presencia de altos niveles de serotonina. En una forma de realización preferida el canal iónico que actúa después de 5-HT<sub>1A</sub> es TREK-1 o GIRK.

35 El término “TREK-1”, como se usa aquí, se refiere a un polipéptido también conocido como KCNK2, TREK, TPKC1, K2p2.1, TREK1, hTREK-1c, hTREK-1e, MGC126742, MGC126744 y KCNK2 que es un canal de potasio con actividad de fondo con dominio de dos poros formado por dos homodímeros que crean un canal que echa potasio fuera de la célula para controlar el potencial de membrana de reposo. Sin embargo, el canal se puede abrir por ciertos anestésicos, estiramiento de membrana, acidosis intracelular y calor. En seres humanos hay tres isoformas resultantes de ajuste alternativo del gen TREK y que se proporcionan en la base de datos del NCBI con los números de acceso NP\_001017424.1, NP\_001017425.2 y NP\_055032.1. En la base de datos de proteínas del NCBI se proporcionan los ortólogos de TREK-1 de perro (*Canis familiaris*), chimpancé (*Pan troglodytes*), vaca (*Bos taurus*), rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*) con los números de acceso XP\_849278, XP\_001171677, NP\_777111, NP\_742038 y NP\_034737, respectivamente. De forma similar a los ácidos nucleicos que se dirigen al ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R, cualquier región del ADNc de TREK-1 puede ser diana siempre que produzca una inhibición sustancial en los niveles del ARNm correspondiente o la proteína codificada por dicho ARNm. De esta manera, los ácidos nucleicos específicos de TREK-1 adecuados se pueden identificar como se ha descrito anteriormente midiendo los niveles del ARNm de TREK-1 o la proteína TREK-1 en células que expresan TREK-1 después de haber puesto en contacto dichas células con el ácido nucleico que se va a probar.

50 El ARNip específico de TREK-1 que se puede usar en los conjugados de la presente invención incluye, sin limitación, el ARNip sc-37180 proporcionado por Santa Cruz Biotechnology y las moléculas antisentido descritas en US2009317811.

Los términos canales de potasio rectificadores hacia el interior acoplados a proteínas G, GIRK o Kir3.x, como se usa aquí, se refieren a cualquier miembro de la familia de canales de iones potasio rectificadores hacia el interior que se activan (abren) a través de una cascada de transducción de señales que empieza con receptores acoplados a proteínas

G (GPCR) estimulados por ligandos. Los GPCR a su vez liberan subunidades  $\beta\gamma$  activadas de proteína G ( $G\beta\gamma$ ) de complejos heterotriméricos inactivos de proteína G ( $G\alpha\beta\gamma$ ). Por último, la proteína dimérica  $G\beta\gamma$  interacciona con los canales GIRK para abrirlos de modo que se vuelvan permeables a los iones de potasio produciendo la hiperpolarización de la célula. Los canales de potasio rectificadores hacia el interior acoplados a proteínas G son un tipo de canales iónicos operados por proteínas G debido a esta activación directa de los canales GIRK por subunidades de proteína G.

Los GIRK adecuados incluyen, sin limitación, todos los miembros de la subfamilia J incluyendo el miembro 3 (también conocido como GIRK1 o Kir3.1) tales como por ejemplo GIRK1 humano que corresponde al ácido nucleico identificado en la base de datos de genes del NCBI con el número de acceso U39196 o la variante cerebral del mismo conocida como GIRKd, el miembro 6 (también conocido como GIRK2 o Kir3.2) tal como por ejemplo GIRK2 humano que corresponde al ácido nucleico identificado en la base de datos de genes del NCBI con el número de acceso U24660, el miembro 9 (también conocido como GIRK3 o Kir3.3) tal como por ejemplo GIRK3 humano que corresponde al ácido nucleico identificado en la base de datos de genes del NCBI con el número de acceso U52152, el miembro 5 (también conocido como GIRK4 o Kir3.4) tal como por ejemplo GIRK4 humano que corresponde al ácido nucleico identificado en la base de datos de genes del NCBI con el número de acceso U39195, el miembro 2 (también conocido como IRK1 o Kir2.1) tal como por ejemplo IRK1 humano que corresponde al ácido nucleico identificado en la base de datos de genes del NCBI con el número de acceso U24055 y el miembro 4 (también conocido como IRK3 o Kir2.3) tal como por ejemplo IRK3 humano que corresponde al ácido nucleico identificado en la base de datos de genes del NCBI con el número de acceso U07364.

Los ácidos nucleicos adecuados capaces de dirigirse a GIRK incluyen, por ejemplo, las ribozimas y moléculas antisentido descritas en WO2005054848.

Esos ácidos que se dirigen al ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R o la proteína 5-HT<sub>1A</sub>R, al ARNm o la proteína SERT, al ARNm o la proteína TREK-1 o al ARNm o la proteína GIRK se acoplan preferiblemente a un agente de selectividad que es capaz de unirse a un transportador de neurotransmisor presente en células donde se expresan 5-HT<sub>1A</sub>R, SERT, TREK-1 o GIRK, es decir, una neurona dopaminérgica. Según esto, los conjugados de la invención comprenden un ácido nucleico específico de 5-HT<sub>1A</sub>R, un ácido nucleico específico de SERT, un ácido nucleico específico de TREK-1 o un ácido nucleico específico de GIRK que se acopla a un agente de selectividad capaz de unirse a un transportador de serotonina, que puede ser un transportador de serotonina no selectivo (tal como un IRS o un IRSN) o, más preferiblemente, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS).

En otra forma de realización, el ácido nucleico que forma parte de los conjugados de la invención se dirige a sinucleína.

El término "sinucleína", como se usa aquí, se refiere a un polipéptido de la familia de miembros de sinucleína que contiene un motivo altamente conservado de alfa hélice de unión a lípidos con similitud a la clase A2 de dominios de unión a lípidos de las apolipoproteínas intercambiables y que son capaces de formar agregados intracelulares conocidos como cuerpos de Lewy que aparecen en ciertas enfermedades neuronales tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de los cuerpos de Lewy. El término "sinucleína" se refiere a  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -sinucleína o  $\gamma$ -sinucleína. En una forma de realización preferida, los ácidos nucleicos que forman parte de los conjugados de la invención son específicos para  $\alpha$ -sinucleína.

Las secuencias de  $\alpha$ -sinucleína humana, de rata, ratón y bovina se proporcionan en la base de datos SwissProt con los números de acceso P37840, P37377, O55042 y Q3T0G8, respectivamente. De forma similar a los ácidos nucleicos que se dirigen al ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R, los ácidos nucleicos específicos de  $\alpha$ -sinucleína se pueden identificar o seleccionar usando cualquier método descrito anteriormente y probar su capacidad de inducir una inhibición sustancial en los niveles del ARNm correspondiente o la proteína codificada por dicho ARNm. De esta manera, se pueden identificar ácidos nucleicos adecuados específicos de  $\alpha$ -sinucleína como se ha descrito anteriormente midiendo los niveles del ARNm de  $\alpha$ -sinucleína o la proteína  $\alpha$ -sinucleína en células que expresan  $\alpha$ -sinucleína después de haber puesto en contacto dichas células con el ácido nucleico que se va a probar.

En una forma de realización preferida, los ácidos nucleicos específicos de  $\alpha$ -sinucleína se dirigen contra una región del ADNc de  $\alpha$ -sinucleína humana. En otra forma de realización, el ácido nucleico de la invención se dirige al ARNm que codifica un canal iónico que actúa después de la acción del 5-HT<sub>1A</sub> como tal (en donde el ácido nucleico actúa mediante apareamiento de bases con la diana) o al canal iónico que actúa después de 5-HT<sub>1A</sub> (en donde el ácido nucleico actúa como un aptámero uniéndose directamente e inhibiendo la actividad del polipéptido). Esos canales modulan la actividad neuronal hiperpolarizando la membrana mediante la producción de una gran entrada de potasio. Este cambio en el potencial de membrana inhibe la descarga neuronal. Al final esto interrumpirá el efecto de inhibición de 5-HT<sub>1A</sub> presináptico en presencia de altos niveles de serotonina. En una forma de realización preferida el canal iónico que actúa después de 5-HT<sub>1A</sub> es TREK-1.

Las regiones diana adecuadas en el ARNm de  $\alpha$ -sinucleína incluyen, sin limitación las descritas en WO07135426 (por ejemplo ácidos nucleicos y en particular ARNip que comprenden una secuencia seleccionada del grupo de ARNip como se describen en WO2006039253 tales como

5'-GGAAAGACAAAAGAGGUGdTdT-3'	SEQ ID NO:16
5'-GGAAAGACAAAAGAGGUGdTdT-3'	SEQ ID NO:17
5'-GGAGGAAUUUUAGAAGAGGdTdT-3'	SEQ ID NO:18
5'-UGUUGGAGGAGCAGUGGUGdTdT-3'	SEQ ID NO:19
5'-GGACCAGUUGGGCAAGAAUdTdT-3'	SEQ ID NO:20

u oligonucleótidos horquillados que tienen la secuencia

5'-GATCCCCGGACCAGTTGGGCAAGAATTT**CAAGAGA**AATTCTTGCCAACTGGTCCTTTTTGGAAA-3'

y

5'-CTAGTTTTCCAAAAAGGACCAGTTGGGCAAGAATTT**CTCTTGAA**AATTCTTGCCAACTGGTCCGGG-3'

5 que corresponden respectivamente a SEQ ID NO: 21 y 22.

Otras secuencias de ARNip específicas de sinucleína son las descritas en US2008139799 (secuencias representadas en el ejemplo XVII) y secuencias ARNip como se describen en WO2009079399 seleccionadas del grupo de:

5'-GGUGUGGCAACAGUGGCUGAG-3'	SEQ ID NO:23
5'-AACAGUGGCUGAGAAGACCAA-3'	SEQ ID NO:24
5'-AUUGCAGCAGCCACUGGCUUU-3'	SEQ ID NO:25
5'-AAGUGACAAAUGUUGGAGGAG-3'	SEQ ID NO:26
5'-GAAGAAGGAGCCCCACAGGAA-3'	SEQ ID NO:27
5'-CGGGUGUGACAGCAGUAGCdTdT-3'	SEQ ID NO:28
5'-UCCUGACAAUGAGGCUUAUdTdT-3'	SEQ ID NO:29
5'-U* <u>CCUGACAAUGAGGCUUAUdT</u> *dT-3'	SEQ ID NO:30
5'-CUACGAACCUGAAGCCUAAdTdT-3'	SEQ ID NO:31
5'-C* <u>UACGAACCUGAAGCCUAA</u> dT*dT-3'	SEQ ID NO:32
5'-C* <u>UACGAACCUGAAGCCUAA</u> dT*dT-3'	SEQ ID NO:33
5'-CUAUUGUAGAGUGGUCUAUdTdT-3'	SEQ ID NO:34
5'-C* <u>UAUGAGCCUGAAGC</u> * <u>UAAT</u> *T-3'	SEQ ID NO:35
5'-C* <u>UAUGAGCCUGAAGCCUAAT</u> *T-3'	SEQ ID NO:36

en donde \* indica enlace fosforotiato, los nucleótidos subrayados indican una modificación 2'-O-Me.

10 Esos están preferiblemente acoplados a un agente de selectividad que es capaz de unirse a un transportador de neurotransmisor presente en células en donde se expresa sinucleína. Según esto, los conjugados de la invención comprenden un ácido nucleico específico de sinucleína que se acopla a un agente de selectividad capaz de mediar la internalización en neuronas monoaminérgicas. Según esto, los ácidos nucleicos dirigidos al ARNm o proteína sinucleína se acoplan a un agente capaz de fomentar la internalización de dicho ácido nucleico en neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y/o dopaminérgicas. De esta manera, en una forma de realización preferida, el ácido nucleico

15 específico de sinucleína se acopla a un agente de selectividad para neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas que se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) (IRSND o triple bloqueador).

En otra forma de realización, el ácido nucleico que forma parte de los conjugados de la invención se dirige a la óxido nítrico sintasa (NOS).

20 Como se usa aquí, "óxido nítrico sintasa" o "NOS" significa una enzima natural que cataliza la síntesis *in vivo* de óxido nítrico. El óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir del grupo guanidino de L-arginina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasa (NOS). El término aplica a todas las isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS)

encontradas en sistemas vivos e incluye, sin limitación, la forma constitutiva de NOS, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

5 Las secuencias de la iNOS humana, de rata, ratón, perro y bovina se proporcionan en la base de datos SwissProt con los números de acceso P35228, Q06518, P29477, O62699 y Q27995, respectivamente. Las secuencias de la eNOS humana, de rata, ratón y bovina se proporcionan en la base de datos SwissProt con los números de acceso P29474, Q62600, P70313 y P29473, respectivamente. Las secuencias de la nNOS humana, de rata, ratón y bovina se proporcionan en la base de datos SwissProt con los números de acceso P29475, P29476, Q9Z0J4 y P29473, respectivamente.

10 Cualquier región en el ADNc de NOS puede ser diana siempre que produzca una inhibición sustancial en los niveles del ARNm correspondiente o la proteína codificada por dicho ARNm. De esta manera, se pueden identificar ácidos nucleicos específicos de NOS adecuados como se describe anteriormente midiendo los niveles del ARNm o proteína NOS en células que expresan NOS después de poner en contacto dichas células con el ácido nucleico que se va a probar o determinando la actividad de NOS en células tratadas. Se puede medir la actividad de NOS por cualquier método conocido en la técnica para determinar las actividades de iNOS, eNOS y nNOS según sea el caso. Por ejemplo, 15 se puede determinar la actividad de NOS midiendo la conversión de [<sup>3</sup>H]-arginina a [<sup>3</sup>H] L-citrulina por un método radiométrico o en la formación de óxido nítrico usando el método de Griess.

Los agentes silenciadores específicos de NOS incluyen, sin limitación, los ARNip específicos de nNOS descritos en WO08100591 obtenidos por los siguientes pares de polinucleótidos:

- 20
- CAAAGAGATCGACACCATC (SEQ ID NO: 58) (sentido), GATGGTGTGCGATCTCTTTGTT (SEQ ID NO:59) (antisentido);
  - CACGCATGTCTGGAAAGGC (SEQ ID NO:60) (sentido) y GCCTTCCAGACATGCGTGTT (SEQ ID NO:61) (antisentido);
  - GGTCTATCCAATGTCCACA (SEQ ID NO:62) (sentido) y TGTGGACATTGGATAGACCTT (SEQ ID NO:63) (antisentido)
  - 25 - El ARNip específico de iNOS que tiene la secuencia 5'-CCACCAGTATGCAATGAAT-3' (SEQ ID NO:64)
  - Los ARNip específicos de eNOS disponibles de Invitrogen (Carlsbad, CA) que tienen los números de identificación de oligo HSS 107326, HSS 107327 y HSS 107328
  - Los ARNip específicos de iNOS descritos en la tabla 2 de Fang *et al.* (RNA, 2010, 16:1429–1435)
  - 30 - Los ARNip específicos de iNOS que tienen las secuencias 5'-ACAACAGGAACCUACCAGCTT-3' (SEQ ID NO:65) (sentido) y 5'-GCUGGUAGGUUCCUGUUGUTT-3' (SEQ ID NO:66) (antisentido).

Antisentido específicos de NOS ilustrativos y no limitantes adecuados para uso en la presente invención incluyen:

- 35
- el oligonucleótido antisentido específico de iNOS que tiene la secuencia 5'-ACAGCTCAGTCCCTTCACCAA-3' (SEQ ID NO:67) como se describe en Grasso *et al.* (Exp. Biol. Med., 2003, 228:491-8).
  - El oligonucleótido antisentido específico de iNOS que tiene la secuencia 5'-TTTGCCTTATACTGTTCC-3' (SEQ ID NO:68) como describen Hemmrich *et al.* (Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2003, 285: C489-C498).
  - Los oligonucleótidos antisentido específicos de iNOS descritos en las tablas 1 y 2 en WO0152902.
  - Las moléculas antisentido específicas de iNOS descritas en la tabla 1 de Fang *et al.* (RNA, 2010, 16:1429–1435)

40 Los agentes silenciadores específicos de NOS preferiblemente se acoplan a un agente de selectividad que es capaz de unirse a un transportador de neurotransmisor presente en células en donde se expresa NOS. Según esto, los conjugados de la invención comprenden un ácido nucleico específico de NOS que está acoplado a un agente de selectividad capaz de mediar la internalización en neuronas monoaminérgicas. Según esto, los ácidos nucleicos dirigidos al ARNm o proteína sinucleína están acoplados a un agente capaz de fomentar la internalización de dicho ácido nucleico en neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y/o dopaminérgicas. De esta manera, en una forma de 45 realización preferida, el ácido nucleico específico de sinucleína está acoplado a un agente de selectividad para neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas que se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) (IRSND o triple bloqueador).

50 En otra forma de realización, el ácido nucleico que forma parte de los conjugados de la invención se dirige al transportador de noradrenalina.

El término “transportador de noradrenalina”, “NAT”, “transportador de norepinefrina” o “NET” se usan aquí indistintamente para referirse a un transportador de monoaminas que transporta los neurotransmisores norepinefrina (noradrenalina) y dopamina desde la sinapsis de vuelta a sus vesículas para su almacenamiento hasta su posterior uso. NET tiene 617 aminoácidos de longitud, contiene 12 dominios transmembrana que está codificada por el gen SLC6A2.

- 5 Se proporcionan las secuencias de los transportadores de norepinefrina humano, de perro (*Canis familiaris*), chimpancé (*Pan troglodytes*), vaca (*Bos taurus*), rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*) en la base de datos del NCBI con los números de acceso P23975, XM\_544398.2, XM\_001167680.1, NM\_174608.2, NM\_031343.1 y NM\_009209.2, respectivamente. Cualquier región del ADNc de NET puede ser diana siempre que produzca una inhibición sustancial en los niveles del ARNm correspondiente o la proteína codificada por dicho ARNm. De esta manera, los ácidos nucleicos  
10 específicos de NET adecuados se pueden identificar como se ha descrito anteriormente midiendo los niveles del ARNm o la proteína NET en células que expresan NET después de haber puesto en contacto dichas células con el ácido nucleico a probar.

Los ácidos nucleicos adecuados específicos de NET incluyen, sin limitación, cualquier ARNi específico de SLC6A2 tales como los ARNi disponibles de Invitrogen con los números de acceso HSS109852, HSS109853 y HSS185858.

- 15 En otra forma de realización, el ácido nucleico que forma parte de los conjugados de la invención se dirige a dopamina- $\beta$ -hidroxilasa.

El término “dopamina- $\beta$ -hidroxilasa”, como se usa aquí, se refiere a un polipéptido que es capaz de convertir dopamina en norepinefrina.

- 20 Se proporcionan las secuencias de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa humana, de rata, ratón y bovina en la base de datos de proteínas del NCBI con los números de acceso NP\_000778, NP\_037290, NP\_620392 y NP\_851338, respectivamente. De forma similar a los ácidos nucleicos que se dirigen a otros ácidos nucleicos según la invención, cualquier región del ADNc de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa puede ser diana siempre que produzca una inhibición sustancial del ARNm correspondiente o la proteína codificada por dicho ARNm. De esta manera, los ácidos nucleicos adecuados específicos de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa se pueden identificar como se ha descrito anteriormente midiendo los niveles del ARNm o la  
25 proteína dopamina- $\beta$ -hidroxilasa en células que expresan dopamina- $\beta$ -hidroxilasa después de haber puesto en contacto dichas células con el ácido nucleico que se va a probar.

Los ácidos nucleicos adecuados específicos de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa incluyen, sin limitación, el ácido nucleico descrito en WO2008019159 que tiene la secuencia

5'-GACCACGUACUGGUGCUACAUTA-3' (SEQ ID NO:37)

- 30 Así como los ácidos nucleicos específicos de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa comercialmente disponibles tales como el ARNi específico de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa de Santa Cruz Biotechnology (n.º de catálogo sc-35180), de Invitrogen (n.º de catálogo HSS175953, HSS175954 y HSS175955), de Abnova (n.º de catálogo H00001621-R01), Applied Biosystems (ARNi id s3946, s3947 y s3945).

- 35 Esos ácidos nucleicos dirigidos al ARNm o la proteína de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa están preferiblemente acoplados a un agente de selectividad que es capaz de unirse a un transportador de neurotransmisor presente en células en donde se expresa dopamina- $\beta$ -hidroxilasa y en donde se requiere un descenso en la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa para compensar por una deficiencia en neurotransmisor que produce una afección patológica determinada. Según esto, los conjugados de la invención comprenden un ácido nucleico específico de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa que está acoplado a un agente de selectividad capaz de unirse a un inhibidor de la recaptación de norepinefrina (IRN).

- 40 En otra forma de realización, el ácido nucleico que forma parte de los conjugados de la invención es específico para BAX. El término “BAX” o “proteína X asociada a BCL-2” como se usa aquí, se refiere a un miembro de la familia preapoptótica BCL-2 cuya activación implica translocación subcelular y dimerización. En células viables, una parte sustancial de la proteína X asociada a BCL-2 es monomérica y se encuentra en el citosol o laxamente asociada con membranas. Después de un estímulo de muerte, la proteína X asociada a BCL-2 monomérica citosólica se transloca a  
45 la mitocondria donde se vuelve una proteína integral de membrana, entrecruzable. La capacidad de la proteína X asociada a BCL-2 de formar diferentes poros de membrana conductores de iones puede ser, en parte, responsable de la disfunción mitocondrial que produce muerte celular (Korsmeyer *et al.*, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1999, 64, 343-350; Korsmeyer *et al.*, Cell Death Differ., 2000, 7, 1166-1173). El término “BAX” se refiere a cualquier variante de ajuste de la misma, incluyendo BAX-alfa (número de acceso de GenBank L22473), BAX-beta (número de acceso de GenBank NM004324), BAX-gamma (Oltvai *et al.*, Cell, 1993, 74, 609-619), BAX-delta (número de acceso de GenBank  
50 AI382305) (Apte *et al.*, Genomics, 1995, 26, 592-594), BAX-omega (número de acceso de GenBank AF008196) (Zhou *et al.*, J. Biol. Chem., 1998, 273, 11930-11936) y BAX-épsilon (número de acceso de GenBank AF007826) (Shi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, 254, 779-785). Se divulgan y reivindican las secuencias de nucleótidos que codifican BAX-alfa, BAX-beta y BAX-gamma en las patentes de EE UU n.ºs 5691179 y 5955595. Se divulgan y reivindican las secuencias de nucleótidos que codifican BAX-omega en la patente de EE UU n.º 6140484 y la  
55 publicación PCT correspondiente WO 97/01635. En la patente de EE UU n.º 6140484 también se divulga un

oligonucleótido antisentido 22-mero dirigido contra la unión exón5/intrón5 de BAX-omega humana.

Los ácidos nucleicos adecuados específicos de BAX para su uso en los conjugados según la presente invención incluyen:

- La secuencia 5'-UCGAUCCUGGAUGAAACCCtg-3' (SEQ ID NO: 38) (como se describe en CN101255422),
- 5 - Oligonucleótidos antisentido dirigidos a las bases 83-102 y 103-122 de BAX humana como se describe en (Manfredini *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 1998, 8, 341-350) y neutrófilos (Dibbert *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999, 96, 13330-13335).
- Cualquiera de las secuencias divulgadas en US20040077583 (tablas 1 y 3).

10 Esos ácidos nucleicos dirigidos al ARNm o la proteína bax están preferiblemente acoplados a un agente de selectividad que es capaz de unirse a un transportador de neurotransmisor presente en células en donde se expresa BAX. Según esto, los conjugados de la invención comprenden un ácido nucleico específico de BAX que está acoplado a un agente de selectividad capaz de mediar la internalización en neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas. De esta manera, el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD) o un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND o triple bloqueador).

15 En otra forma de realización, los ácidos nucleicos de los conjugados de la invención se dirigen al ARNm o proteína de la proteína asociada a microtúbulos tau. El término "tau" se refiere a cualquier proteína de la familia de proteína tau incluyendo, pero no limitada a, monómero de proteína tau nativa, proteínas precursoras de tau, péptidos tau, intermedios de tau, metabolitos y derivados de tau de cualquier origen incluyendo humano (P10636), de perro (XM\_844939), chimpancé (NM\_001009068.1), ratón (Z12133), pez cebra (BI981282.1) y C. elegans (NM\_001027407.2) y que son capaces de sufrir hiperfosforilación que produce el autoensamblaje de ovillos de filamentos helicoidales y filamentos lineales apareados, que también están implicados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y otras patologías de tau.

Los ácidos nucleicos adecuados específicos de tau incluyen, sin limitación:

- 25 - los ARNip descritos en WO2005118858 que tienen las secuencias  
5'-AATCACACCCAACGTGCAGAA-3' (SEQ ID NO:39)

y

5'-AACTGGCAGTTCTGGAGCAAA-3' (SEQ ID NO:40)

- los ARNip descritos en US2004241854 que tienen las secuencias

Hebra sentido	SEQ ID NO:	Hebra antisentido	SEQ ID NO:
TCGAAGTGATGGAAGATCACGC	41	CTTCACTACCTTCTAGTGCGAC	42
CAGCCGGGAGTCGGCAAGGTGC	43	CGGCCCTCAGCCCTTCCACGTC	44
ACGTCTCGGCGGCGGCAGTGTGC	45	CAGGCGCCTGCGGCGTCACACGTT	46
ACGTCTCCATGGCATCTCAGC	47	TTGCTGAGATGCCATGGAGAC	48
GTGGCCAGATGGAAGTAAAATC	49	CCGGTCTACCTTCATTTTAGAC	50
GTGGCCAGATGCAAGTAAAATC	51	CCGGTCTACGTTTCATTTTAGAC	52

- los ácidos nucleicos antisentido específicos de tau descritos por Caceres *et al.* (J. Neuroscience, 1991, 11:1515-1 523 que tienen las secuencias:

GGTTCAGCCATGCTGCTTCAAAGCC SEQ ID NO:53

y

TGATAATCGACAGGAGGCGAGGACA SEQ ID NO:54

30 Esos ácidos nucleicos dirigidos al ARNm o la proteína tau están preferiblemente acoplados a un agente de selectividad que es capaz de unirse a un transportador de neurotransmisor presente en células en donde se expresa tau. Según

5 esto, los conjugados de la invención comprenden un ácido nucleico específico de tau que está acoplado a un agente de selectividad capaz de mediar la internalización en neuronas monoaminérgicas, en particular, neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas. El agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD) o un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND o triple bloqueador).

10 En otra forma de realización, los ácidos nucleicos de la invención se dirigen al ARNm o proteína huntingtina. El término "huntingtina" se refiere a una proteína de 350 kDa de función desconocida con el número de acceso en la base de datos UniPortKB P42858 así como proteínas codificadas por la secuencia de ácido nucleico depositado con el número de acceso L12392 y ortólogos del mismo encontrados en perro (número de acceso de NCBI XP\_536221.2), chimpancé (número de acceso de NCBI XP\_517080.2), vaca (número de acceso de NCBI XP\_871851.2), rata (número de acceso de NCBI XP\_573634.1) o ratón (número de acceso de NCBI NP\_034544.11) así como variantes de las mismas resultantes de la expansión de repeticiones CAG (CAG6-37 en la proteína salvaje a repeticiones CAG35-121 en la proteína mutante). La expansión CAG resulta en la producción de una proteína mutante que contiene una expansión en el tramo de poliglutamina en la proteína huntingtina.

15 Los ácidos nucleicos adecuados específicos de huntingtina incluyen, sin limitación, los oligonucleótidos antisentido descritos en las tablas 4 y 5 en US2008039418A así como en las tablas 1, 2, 7, 8, 9 y 10 en US7320965, el ARNip descrito en US2005042646A y que tiene la secuencia

5'-AAGAGGAGGAGGCCGACGCC-3' (SEQ ID NO:55)

20 Esos ácidos nucleicos dirigidos al ARNm o la proteína huntingtina están preferiblemente acoplados a un agente de selectividad que es capaz de unirse a un transportador de neurotransmisor presente en células en donde se expresa huntingtina. Según esto, los conjugados de la invención comprenden un ácido nucleico específico de huntingtina que está acoplado a un agente de selectividad capaz de mediar la internalización en neuronas monoaminérgicas, en particular neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas. El agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD), o un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND o triple bloqueador).

25 Las combinaciones adecuadas de agentes de selectividad y ácidos nucleicos según la presente invención se resumen en la tabla I

Transportador de neurotransmisor	Agente de selectividad	Ácido nucleico diana del oligonucleótido
SERT	ISRS (sertralina)	5-HT <sub>1A</sub>
SERT	ISRS (sertralina)	SERT
SERT	ISRS (sertralina)	5-HT <sub>1B</sub>
SERT	ISRS (sertralina)	TREK-1
DAT, SERT o NET	IRSDN (triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)	Alfa-sinucleína
DAT, SERT o NET	DAT, SERT o NET IRSDN (triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)	NOS (iNOS, eNOS o nNOS)
DAT, SERT o NET	IRSDN (triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)	BAX
NET	IRN (Reboxetina)	Dopamina-beta-hidroxilasa
NET	IRN (Reboxetina), IRSDN, IRDN	NET
DAT, SERT o NET	IRSDN (triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)	Tau
DAT, SERT o NET	IRSDN (triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)	Huntingtina

## A.3. Regiones enlazadoras de los conjugados de la invención

El ácido nucleico y el agente de selectividad pueden estar acoplados directamente. Sin embargo, se prefiere que ambos grupos estén unidos mediante un grupo conector.

5 Los términos "grupo conector" y "enlazador" y equivalentes gramaticales de los mismos se usan aquí para referirse a un grupo orgánico que une dos partes de un compuesto. El agente de selectividad se puede unir a cualquier nucleótido sentido o antisentido en el ácido nucleico, pero se puede acoplar preferiblemente a través del nucleótido 3' terminal y/o el nucleótido 5' terminal. Un conjugado interno puede estar unido directa o indirectamente a través de un enlazador a una posición 2' del grupo ribosa o a otra posición adecuada.

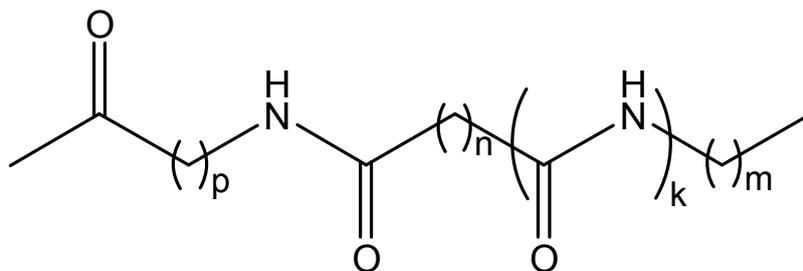
10 En el caso en donde el ácido nucleico sea un ácido nucleico bicatenario, el conjugado se puede unir al nucleótido 3' terminal sentido, al nucleótido 5' terminal sentido, al nucleótido 3' terminal antisentido y/o al nucleótido 5' antisentido.

15 Aunque sin querer estar limitado por definiciones o convenciones, en esta solicitud la longitud del enlazador se describe contando el número de átomos que representan la distancia más corta entre el átomo que une el grupo del conjugado al enlazador y el átomo de oxígeno del grupo fosfato terminal asociado con el oligonucleótido a través del cual el enlazador se une al oligonucleótido. En casos donde el enlazador comprende una o más estructuras de anillo, se prefiere contar los átomos alrededor del anillo que representa el camino más corto.

20 Los grupos enlazadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, nucleótidos modificados o sin modificar, nucleósidos, polímeros, azúcares, hidratos de carbono, polialquilenos, tales como polietilenglicoles y polipropilenglicoles, polialcoholes, polipropilenos, mezclas de etilen- y propilenglicoles, polialquilaminas, poliaminas tales como polilisina y espermidina, poliésteres tales como poli(acrilato de etilo), polifosfodiésteres, alifáticos y alquilenos. Además, se pueden aplicar enlazadores/químicas de enlazadores que se basan en omega-amino-1,3-dioles, omega-amino-1,2-dioles, hidroxiprolinolos, omega-amino-alcanoles, dietanolaminas, omega-hidroxi-1,3-dioles, omega-hidroxi-1,2-dioles, omega-tio-1,3-dioles, omega-tio-1,2-dioles, omega-carboxi-1,3-dioles, omega-carboxi-1,2-dioles, co-hidroxi-alcanoles, omega-tio-alcanoles, omega-carboxi-alcanoles, oligoetilenglicoles funcionalizados, alil amina, ácido acrílico, alcohol alílico, propargil amina, alcohol propargílico y más, en este contexto para generar enlazadores de la longitud apropiada.

Los enlazadores también pueden conferir otras propiedades deseables al conjugado de oligonucleótido, solubilidad acuosa mejorada, distancia óptima de separación entre el grupo conjugado y el oligonucleótido, flexibilidad (o falta de la misma), orientación específica, ramificación y otras.

Preferiblemente, dicho grupo conector tiene la siguiente estructura

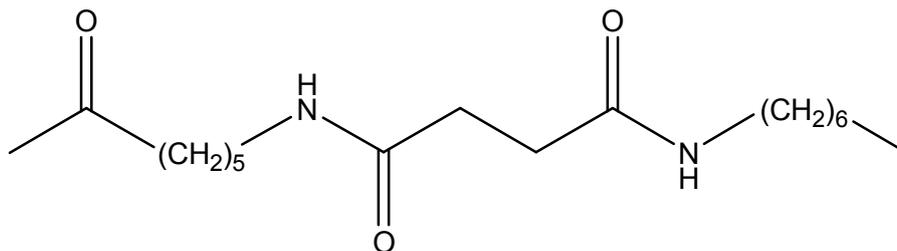


30 en donde m, n y p se seleccionan de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13,

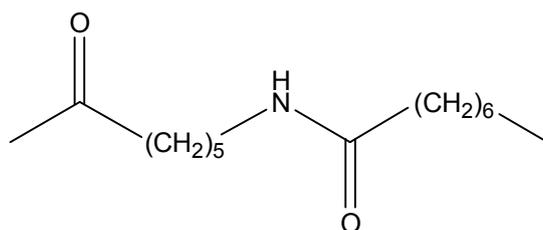
en donde la suma de m+n+p es un número entero seleccionado de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 y

en donde k es 0 o 1.

En una forma de realización preferida, p es 5, n es 2, k es 1 y m es 6 lo que da un enlazador que tiene la estructura:



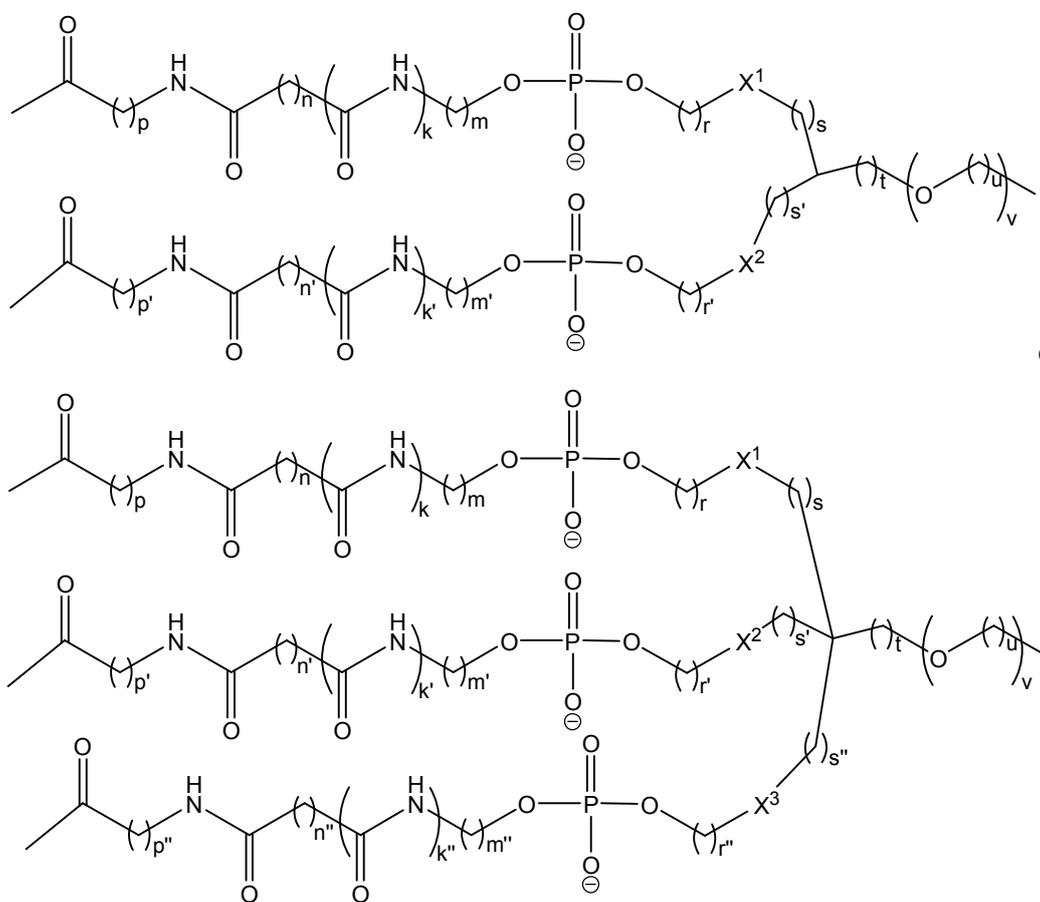
35 En otra forma de realización preferida, p es 5, n y k son 0 y m es 6 lo que da un enlazador que tiene la estructura:



En una forma de realización particular, el enlazador comprende más de un acoplamiento para el agente de selectividad. En una forma de realización preferida, el enlazador es un enlazador bivalente o trivalente, es decir, se pueden acoplar 2 o 3 moléculas de agente de selectividad, respectivamente.

- 5 En el caso en donde se acopla más de una molécula de agente de selectividad al ácido nucleico a través de un enlazador, dichas moléculas pueden representar el mismo o diferentes agentes de selectividad.

En una forma de realización particular, el enlazador bivalente o trivalente tiene la siguiente fórmula:



- 10 en donde

$m, m', m'', n, n', n'', p, p', p'', r, r', r'', s, s', s'', t$  y  $u$  se seleccionan independientemente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13;

$k, k', k''$  y  $v$  se seleccionan independientemente de 0 y 1; y

$X^1, X^2$  y  $X^3$  se seleccionan independientemente de  $\text{CH}_2, \text{O}, \text{S}, \text{NH}, \text{CO}, \text{C}(\text{O})\text{O}$  y  $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ .

- 15 Dependiendo de los valores de los grupos mencionados anteriormente, los enlazadores ramificados pueden ser simétricos o asimétricos.

En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador bivalente como se muestra anteriormente en donde  $p$  y  $p'$  son 5,  $n$  y  $n'$  son 2,  $k$  y  $k'$  son 1 y  $m$  y  $m'$  son 6. En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador bivalente en donde  $p$  y  $p'$  son 5,  $n, n', k$  y  $k'$  son 0 y  $m$  y  $m'$  son 6.

- En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador bivalente como se muestra anteriormente en donde r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan C(O)NH. En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador bivalente en donde r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan CH<sub>2</sub>.
- 5 En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n y n' son 2, k y k' son 1, m y m' son 6, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan C(O)NH.
- En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n y n' son 2, k y k' son 1, m y m' son 6, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan CH<sub>2</sub>.
- En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n, n', k y k' son 0 y m y m' son 6, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan C(O)NH.
- 10 En otra forma de realización el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n, n', k y k' son 0 y m y m' son 6, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan CH<sub>2</sub>.
- En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador trivalente como se muestra anteriormente en donde p, p' y p'' son 5, n, n' y n'' son 2, k, k' y k'' son 1 y m, m' y m'' son 6. En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n', n'', k, k' y k'' son 0 y m, m' y m'' son 6.
- 15 En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador trivalente como se muestra anteriormente en donde r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O. En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.
- En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n' y n'' son 2, k, k' y k'' son 1, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.
- 20 En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n' y n'' son 2, k, k' y k'' son 1, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.
- En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n', n'', k, k' y k'' son 0, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.
- En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n', n'', k, k' y k'' son 0, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.
- 25

#### A.4. Grupos de direccionamiento de los conjugados de la invención

- Otra modificación de los conjugados de la invención implica unir químicamente al ácido nucleico o al grupo protector uno o más grupos o conjugados que aumentan la actividad, distribución celular o absorción celular del ácido nucleico. Tales grupos incluyen pero no están limitados a grupos lipídicos tales como un grupo colesterol (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 1994 4 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, beril-S-tritiltilol (Manoharan *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, Nucleosides and Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un grupo palmitilo (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un grupo octadecilamina o hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).
- 30
- 35
- 40

- De forma alternativa, el grupo capaz de aumentar la distribución celular puede ser un compuesto de bajo peso molecular o un polipéptido que es capaz de ser translocado específicamente a través de barreras biológicas mediante el uso de endocitosis mediada por receptor usando transportadores específicos presentes en dichas barreras biológicas. En la técnica se conocen una amplia gama de receptores y transportadores de captación, con un número incluso más amplio de ligandos específicos de receptor. Los ligandos preferidos para receptores que median endocitosis y/o transcitosis para su uso según la presente invención incluyen, por ejemplo, ligandos para, o que se unen específicamente al transportador de tiamina, receptor de folato, receptores de vitamina B12, receptores de asialoglicoproteína, receptor de alfa(2,3)-sialoglicoproteína (con por ejemplo, los nanocuerpos FC5 y FC44 que consisten en anticuerpos de dominio único de llama (sdAc) como ligandos específicos de receptores), receptores de transferrina-1 y -2, receptores depuradores (clase A o B, tipos I, II o III o CD36 o CD163), receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), receptor de la proteína 1 relacionada con LDL (LRP1, tipo B), el receptor LRP2 (también conocido como megalina o glicoproteína 330), receptor de la toxina de la difteria (DTR, que es el precursor unido a membrana del factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF)), receptor de insulina, receptores de factores de crecimiento insulinoideos (IGF), receptores de leptina, receptor de sustancia P, receptor de glutatión, receptores de
- 45
- 50

glutamato y receptor de manosa-6-fosfato.

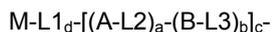
Los ligandos preferidos que se unen a estos receptores para su uso según la presente invención incluyen, por ejemplo, ligandos seleccionados del grupo que consiste en; lipoproteína lipasa (LPL), alfa2-macroglobulina (alfa2M), proteína asociada a receptor (RAP), lactoferrina, desmoteplasa, activador de plasminógeno de tipo tisular y uroquinasa (tPA/uPA), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-I), complejos tPA/uPA:PAI-I, melanotransferrina (o P97), trombospondina 1 y 2, lipasa hepática, inhibidor de la vía factor VIIa/factor tisular (TFPI), factor VIIIa, factor IXa, Abetal-40, proteína precursora del beta amiloide (APP), inhibidor C1, complemento C3, apolipoproteína E (apoE), exotoxina A de pseudomonas, CRM66, proteína Tat de VIH-I, rinovirus, metaloproteínasa 9 de matriz (MMP-9), MMP-13 (colagenasa-3), proteína activadora de esfingolípidos (SAP), proteína de la zona de gestación, antitrombina III, cofactor de heparina II, alfa1-antitripsina, proteína de choque térmico 96 (HSP-96), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), apolipoproteína J (apoJ o clusterina), ABETA unida a apoJ y apoE, aprotinina, angio-pep1, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), transferrina, insulina, leptina, un factor de crecimiento insulinoide, factores de crecimiento epidérmicos, lectinas, peptidomiméticos y/o anticuerpos monoclonales humanizados o péptidos específicos para dichos receptores (por ejemplo, las secuencias HAIYPRH y THRPPMWSPVWP que se unen al receptor de transferrina humana o un anticuerpo monoclonal anti-receptor de transferrina humana (TfR) A24), hemoglobina, parte no tóxica de una cadena polipeptídica de la toxina de la difteria, toda o parte de la cadena B de la toxina de la difteria (incluyendo DTB-His (como se describe en Spilsberg *et al.*, 2005, *Toxicon.*, 46(8):900-6)), todo o parte de un mutante no tóxico de la toxina de la difteria CRM197, apolipoproteína B, apolipoproteína E (por ejemplo, después de unirse a recubrimiento polisorb-80 en nanopartículas), proteína de unión a vitamina D, proteína de unión a vitamina A/retinol, proteína transportadora en plasma de vitamina B12/cobalamina, glutatión y transcobalamina-B12.

#### A.5. Grupos protectores

Los ácidos nucleicos que forman parte de los conjugados de la invención se tienen que conservar de factores de degradación, tales como nucleasas (endo/exonucleasas), durante su transporte a través de los diferentes líquidos y compartimentos del organismo. Con este fin, los oligonucleótidos se diseñan para resistir la digestión enzimática y para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad *in vivo* del oligonucleótido. Preferiblemente, los ácidos nucleicos se modifican químicamente mediante la presencia de un grupo que previene la degradación mediada por nucleasas.

Para los fines de la presente invención, "estructura de protección" o "grupo protector" se debe entender que significa modificaciones químicas, que se han incorporado a cualquier extremo del oligonucleótido. Ejemplos no limitantes del 5'-protector incluye residuos abásicos invertidos (grupo), 4',5'-metilen nucleótido, 1-(beta-D-eritrofuranosil) nucleótido, 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; L-nucleótidos; alfa-nucleótidos; nucleótido de base modificada; enlace fosforoditioato; treo-pentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxitil nucleótido acíclico; 3,5-dihidroxipentil nucleótido acíclico, grupo de nucleótido 3'-3'-invertido; grupo abásico 3'-3'-invertido; grupo nucleótido 3'-2'-invertido; grupo abásico 3'-2'-invertido; 1,4-butanodiol fosfato; 3'-fosforamidato; hexilfosfato; aminohexil fosfato; 3'-fosfato; 3'-fosforotioato; fosforoditioato; o grupo metilfosfonato con puente o sin puente. Los detalles se describen en WO97/26270, incorporado aquí mediante referencia. El 3'-protector incluye, por ejemplo, 4',5'-metilen nucleótido; 1-(beta-D-eritrofuranosil) nucleótido; 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; 5'-amino-alkil fosfato; 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato; 6-aminohehexil fosfato; 1,2-aminododecil fosfato; hidroxipropil fosfato; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; L-nucleótido; alfa-nucleótido; nucleótido de base modificada; fosforoditioato; treo-pentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxitil nucleótido; 3,5-dihidroxipentil nucleótido, grupo de nucleótido 5'-5'-invertido; grupo abásico 5'-5'-invertido; 5'-fosforamidato; 5'-fosforotioato; 1,4-butanodiol fosfato; 5'-amino; 5'-fosforamidato con puente y/o sin puente, fosforotioato y/o fosforoditioato, metilfosfonato con puente o sin puente y grupos 5'-mercapto. Véase también Beaucage e Iyer, 1993, *Tetrahedron* 49, 1925; el contenido del cual se incorpora aquí mediante referencia.

En una forma de realización preferida, la estructura de protección que se une a la secuencia de ácido nucleico de los conjugados de la invención tiene la siguiente estructura general:



en donde:

M es H, un grupo lipídico o un grupo de direccionamiento como se ha definido anteriormente;

A y B representan unidades monoméricas seleccionadas independientemente del grupo que consiste en un monosacárido y un alquilenglicol (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>);

L1, L2 y L3 son compuestos enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, carbamato, metilfosfonato, guanidinio, sulfamato, sulfamida, formacetal, tioformacetal, sulfona, amida y mezclas de los mismos;

a y b son números enteros que varían de 0 a 50;

c es un número entero que varía de 0 a 30;

d es un número entero que es al menos 1.

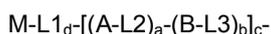
Un grupo lipídico, como se usa aquí, se refiere a un grupo de compuestos orgánicos que tiene propiedades lipofílicas o anfipáticas, incluyendo, pero no limitado a, grasas, grasas no volátiles, aceites esenciales, ceras, esteroides, esteroides, fosfolípidos, glicolípidos, sulfolípidos, aminolípidos, cromolípidos (lipocromos) y ácidos grasos. El término "lípidos" abarca lípidos tanto naturales como sintéticamente producidos. Los grupos lipídicos normalmente aumentan las propiedades lipofílicas del oligonucleótido y facilitan la absorción intracelular *in vivo* de la construcción de oligonucleótido. Los lípidos adecuados que se pueden usar incluyen ácidos grasos, grasas, aceites, ceras, colesterol, esteroides, vitaminas liposolubles, tales como vitaminas A, D, E y K, monoglicéridos, diglicéridos y fosfolípidos. Los ácidos grasos preferidos son los seleccionados del grupo que consiste en ácido lauroico (C12), ácido mirístico (C14), ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), ácido docosanoico (C22) e híbrido de ácido litocólico y oleilamina (litocólico-oleilamina, C43). El experto en la materia puede seleccionar el lípido según las circunstancias considerando el tejido diana, la célula diana, la vía de administración, la vía que se espera que siga el oligonucleótido, etc.

El término "monosacárido", como se usa aquí y es bien conocido en la técnica, se refiere a una forma sencilla de un azúcar que consiste en una única unidad de sacárido que no se puede descomponer más a bloques o grupos constituyentes de sacáridos más pequeños. Los grupos azúcar preferidos para este grupo de conjugación se seleccionan del grupo que consiste en furanosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, un monosacárido modificado, ácido siálico y eritrosa y mezclas de los mismos. Los monosacáridos pueden estar en sus formas lineales o cíclicas (isómeros hemiacetálicos cíclicos). La furanosa es cualquier azúcar sencillo que contiene un anillo basado en furano de cinco miembros, tal como una D-ribose o un residuo de fructosa (D-(-)-fructofuranosa). Con la combinación de los monosacáridos, se pueden lograr múltiples estructuras de azúcar. Los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS) son combinaciones de interés especial, así como los disacáridos sacarosa o lactosa; o los polisacáridos inulina, dextrina, almidón o glucógeno.

Los términos "alquilenglicol", "poli(alquilenglicol)" y "óxido de alquileo", como se usan aquí, abarcan una familia de polímeros de poliéter que comparten la fórmula general  $-O-[(CH_2)_m-O-]_n-$ , en donde m representa el número de grupos metileno presentes en cada unidad de alquilenglicol y n representa el número de unidades de repetición y por lo tanto representa el tamaño o longitud del polímero. El término incluye, sin limitación, etilenglicol, propilenglicol, dialquilenglicol (por ejemplo, dietilenglicol), trialquilenglicol (por ejemplo, trietilenglicol) y glicoles tales como los correspondientes mono- y dialquileteres de los glicoles anteriormente mencionados, en donde los alquileteres son alquileteres inferiores que tienen de 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo éter de metilo, etilo, propilo y similares).

En otra forma de realización, el grupo de la fórmula (I) tiene una unidad monomérica de alquilenglicol (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), que puede ser cualquier molécula lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de carbono o, dependiendo de los valores de *a* y *b*, un polímero de polialquilenglicol con varias unidades monoméricas de alquilenglicol (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>). Preferiblemente, el grupo alquilenglicol se selecciona de alquilenglicol C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub>. Aún más preferiblemente, el grupo alquilenglicol es un alquilenglicol C<sub>18</sub>.

Los grupos protectores adecuados para los conjugados de la presente invención incluyen, sin limitación:



- PEG + Azúcar, que corresponde a la fórmula anterior en donde M es H, d es 0, A es PEG, B es un azúcar, a y b son cada uno 1 y L1 y L2 son enlaces fosfodiéster;
- PEG + (Azúcar)<sub>2</sub>, que corresponde a la fórmula anterior en donde A es PEG, B es un azúcar, a es 1, b es 2, M es H y d es 0 y L1 y L2 son enlaces fosfodiéster;
- (PEG)<sub>2</sub>+ Azúcar, que corresponde a la fórmula anterior en donde A es PEG, B es un azúcar, a es 2, b es 1, M es H y d es 0 y L1 y L2 son enlaces fosfodiéster;
- (PEG)<sub>3</sub>+ Azúcar, que corresponde a la fórmula anterior en donde A es PEG, B es un azúcar, a es 3, b es 1, M es H y d es 0 y L1 y L2 son enlaces fosfodiéster;
- (PEG)<sub>5</sub>+ Azúcar que corresponde a la fórmula anterior en donde A es PEG, B es un azúcar, a es 5, b es 1, M es H y d es 0 y L1 y L2 son enlaces fosfodiéster.

Los términos "PEG" y "azúcar" se usan esencialmente como se ha descrito anteriormente e incluyen furanosa como azúcar y un PEG seleccionado del grupo de espaciadores de C3, C9 y C18.

#### **B. Estructura de los conjugados de la invención**

Los diferentes elementos de los conjugados según la presente invención se pueden organizar de diferentes maneras. De este modo, el agente de selectividad se puede acoplar al extremo 5' y/o al extremo 3' del ácido nucleico. Además, el ácido nucleico y el agente de selectividad pueden estar unidos directamente o pueden estar conectados por un enlazador. De forma similar, el enlazador puede estar acoplado al extremo 5' y/o al extremo 3' del ácido nucleico. De

esta manera, en donde el ácido nucleico de la invención contiene una cadena única de ácido nucleico, las posibles organizaciones son:

- un ácido nucleico que comprende un agente de selectividad unido al extremo 5',
- un ácido nucleico que comprende un agente de selectividad unido al extremo 3',
- 5 - un ácido nucleico que comprende un agente de selectividad unido al 5' y un grupo protector unido al extremo 3' y
- un ácido nucleico que comprende un grupo protector unido al extremo 5' y un agente de selectividad unido al extremo 3'.
- Un ácido nucleico modificado que comprende un primer y segundo agentes de selectividad, dichos primer y segundo agentes de selectividad son iguales o diferentes, ambos agentes de selectividad unidos a los dos extremos de un enlazador bifuncional que está unido al extremo 5' del ácido nucleico,
- 10 - Un ácido nucleico modificado que comprende un primer y segundo agentes de selectividad, dichos primer y segundo agentes de selectividad son iguales o diferentes, ambos agentes de selectividad unidos a los dos extremos de un enlazador bifuncional que está unido al extremo 3' del ácido nucleico,
- 15 - Un ácido nucleico modificado que comprende cuatro agentes de selectividad, dichos agentes de selectividad son iguales o diferentes, en donde dos de los agentes de selectividad están unidos a ambos extremos de un primer enlazador bifuncional que está unido al extremo 5' del ácido nucleico y en donde dos de los agentes de selectividad están unidos a ambos extremos de un segundo enlazador bifuncional que está unido al extremo 3' del ácido nucleico.

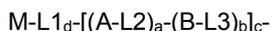
20 Además, el conjugado de la invención puede contener más de una cadena de ácido nucleico que module la expresión de la molécula diana. Por ejemplo, una construcción de esta invención puede contener hasta cinco ácidos nucleicos diferentes unidos en tándem mediante fosfodiésteres dirigidos a diferentes regiones de una molécula diana determinada.

25 Además, en esos casos en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico bicatenario, el agente de selectividad se puede acoplar a la hebra sentido y/o antisentido y puede estar directamente acoplado o conectado por un grupo enlazador.

Los ácidos nucleicos que forman parte de los conjugados de la invención se tienen que proteger de factores de degradación, tales como nucleasas (endo/exonucleasas), durante su transporte a través de diferentes líquidos y compartimentos del organismo. Con este propósito, los oligonucleótidos se diseñan para resistir la digestión enzimática y para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad *in vivo* del oligonucleótido. Las exonucleasas celulares usan extremos 5' libres como dianas. De esta manera, en el caso de ácidos nucleicos monocatenarios, el agente de selectividad puede actuar como un grupo estabilizante cuando está acoplado al 5' del ácido nucleico. Sin embargo, en el caso de conjugados que comprenden ácidos nucleicos bicatenarios o un ácido nucleico monocatenario en el que el agente de selectividad está unido al extremo 3', el conjugado puede comprender además un grupo estabilizante o estructura protectora que normalmente es un grupo que previene la degradación del ácido nucleico por la actividad de exonucleasas. En el caso de ácidos nucleicos bicatenarios, existen las siguientes posibles organizaciones:

- [1] el agente de selectividad está unido al extremo 5' de una de las hebras, en cuyo caso es útil unir una estructura protectora al extremo 5' de la hebra opuesta. Además, también puede estar presente una estructura protectora en uno o dos de los extremos 3'.
- 40 [2] el agente de selectividad está unido al extremo 3' de una de las hebras, en cuyo caso es útil unir una estructura protectora a los extremos 5' de las hebras sentido y antisentido. Además, una estructura protectora puede estar presente en el extremo 3' libre.
- [3] El conjugado comprende más de un agente de selectividad que puede ser el mismo o diferente en cuyo caso los agentes de selectividad están acoplados a los extremos 5' de la hebra sentido y la antisentido. Opcionalmente, una estructura protectora puede estar acoplada a uno o dos de los extremos 3' libres.

45 En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es un ARN bicatenario en donde el agente de selectividad está unido al extremo 5' de la hebra antisentido y el grupo protector está unido al extremo 5' de la hebra sentido. En una forma de realización aún más preferida, el grupo protector tiene la estructura



50 en donde M es H, d es 0, A es un espaciador de C18 de polietilenglicol, B es una furanosa, a es 2, b y c son 1 y L2 y L3 son enlaces fosfodiéster.

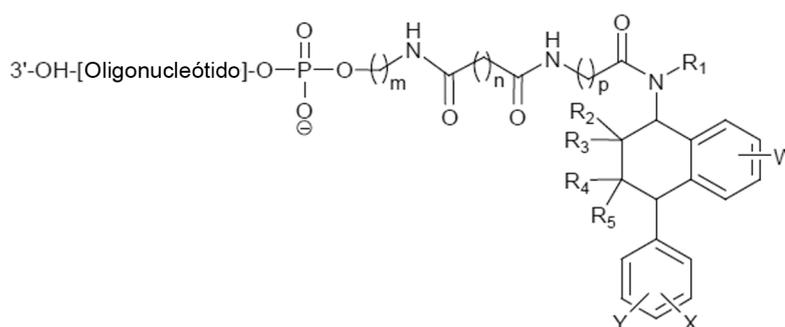
En una forma de realización preferida, el conjugado de la invención comprende

(i) al menos un agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor en donde el agente de selectividad se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la recaptación de serotonina (IRS), un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN) y

5 (ii) un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana en donde la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en el receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>), el ARNm que codifica el receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>), la proteína transportadora de serotonina y el ARNm que codifica el transportador de serotonina.

10 En una forma de realización más preferida, el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm que codifica el receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>) comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En una forma de realización aún más preferida, el conjugado de la invención tiene la estructura (I)



(I)

15 en donde

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

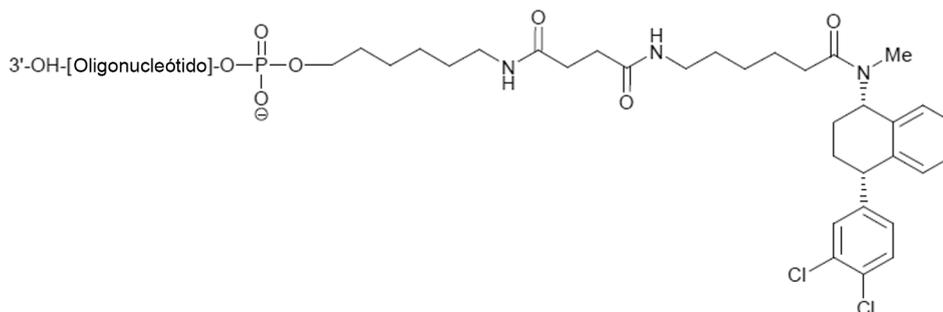
X e Y se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, OR<sup>a</sup> y SR<sup>b</sup>, en donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y arilo de C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>;

20 W se selecciona de hidrógeno, halógeno, CN, NO<sub>2</sub>, alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>, SO<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>R<sup>f</sup>, NR<sup>g</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>h</sup>, CO<sub>2</sub>R<sup>i</sup>, en donde R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup>, R<sup>f</sup>, R<sup>g</sup>, R<sup>h</sup> y R<sup>i</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

m, n y p se seleccionan de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, en donde la suma de m+n+p es un número entero seleccionado de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y

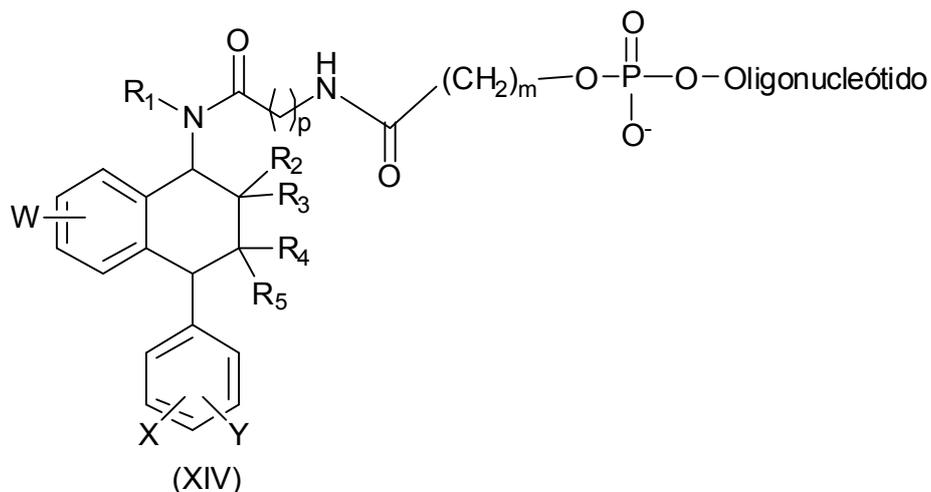
25 en donde el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En otra forma de realización, el conjugado de la invención tiene la estructura:



en donde el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

30 En una forma de realización aún más preferida, el conjugado de la invención tiene la estructura (XIV)



en donde

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo de  $C_1$ - $C_6$ ;

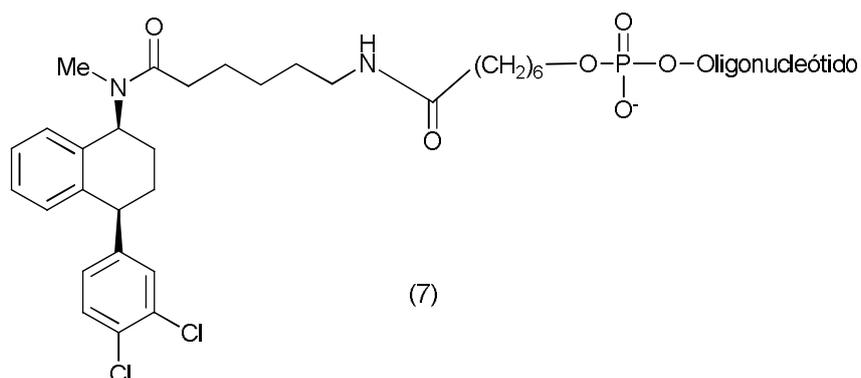
5 X e Y se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo de  $C_1$ - $C_3$ , haloalquilo de  $C_1$ - $C_3$ ,  $OR^a$  y  $SR^b$ , en donde  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan independientemente de alquilo de  $C_1$ - $C_3$  y arilo de  $C_6$ - $C_{10}$ ;

W se selecciona de hidrógeno, halógeno, CN,  $NO_2$ , alquilo de  $C_1$ - $C_3$ , haloalquilo de  $C_1$ - $C_3$ ,  $NR^cR^d$ ,  $SO_2NR^eR^f$ ,  $NR^gSO_2R^h$ ,  $CO_2R^i$ , en donde  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^g$ ,  $R^h$  y  $R^i$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo de  $C_1$ - $C_3$ ;

10 m y p se seleccionan de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, en donde la suma de m+ p es un número entero seleccionado de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 y

en donde el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En una forma de realización particular, el conjugado tiene la estructura



15 en donde el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En aún otra forma de realización preferida, el conjugado de la invención comprende un ácido nucleico bicatenario en donde el extremo 5' de la hebra sentido está acoplado al grupo protector y el extremo 5' de la hebra antisentido está acoplado al agente de selectividad. En donde el grupo protector tiene la estructura:

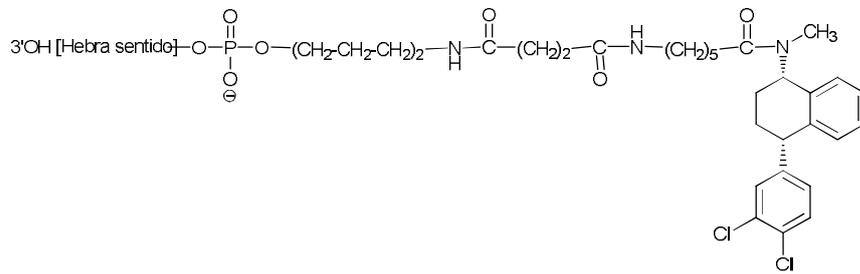
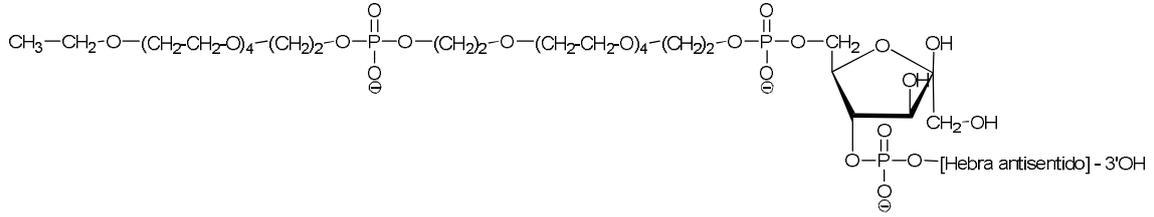
20  $M-L1_d-[(A-L2)_a-(B-L3)_b]_c-$

en donde M es H, d es 0, A es un espaciador de C18 de polietilenglicol, B es una furanosa, a es 2, b y c son 1 y L2 y L3 son enlaces fosfodiéster y en donde el grupo protector es sertralina, el compuesto de la invención tiene la estructura:

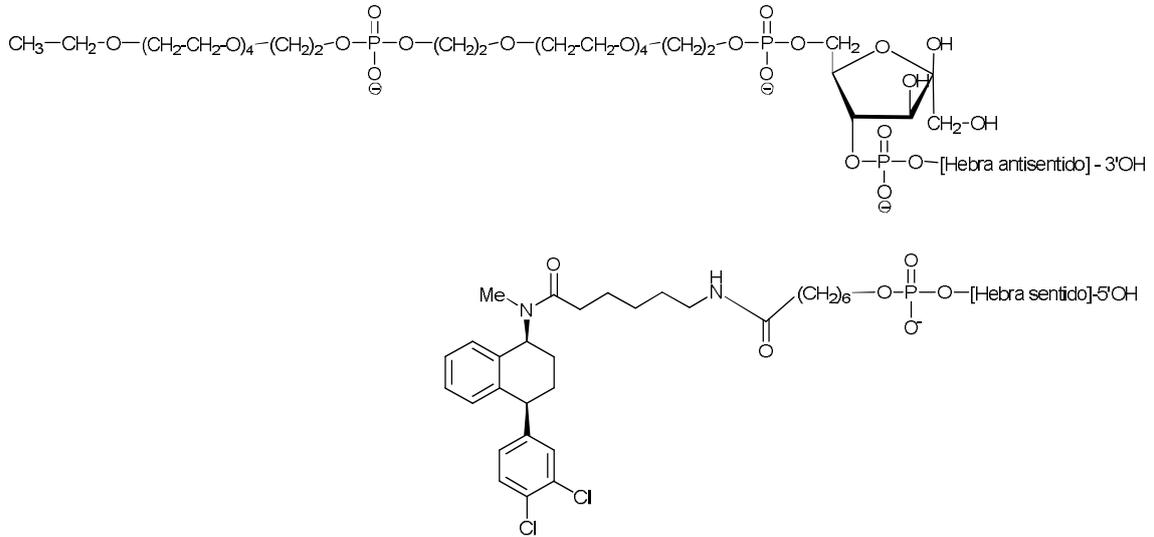
C18-fosfodiéster-C18-fosfodiéster-furanosa-fosfodiéster-hebra ARNa

hebra ARNs – enlace peptídico - sertralina

En una forma de realización aún más preferida, el compuesto de la invención tiene la estructura:

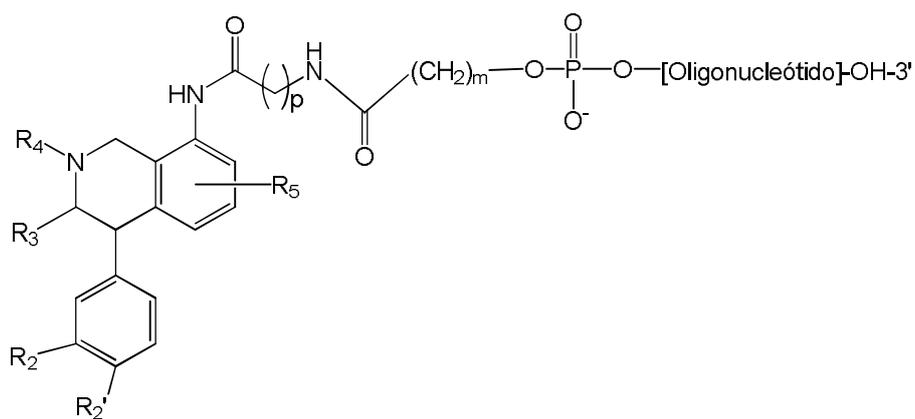


En una forma de realización aún más preferida, el compuesto de la invención tiene la estructura:



5

En otra forma de realización, el conjugado tiene la siguiente estructura:



(XIV)

en donde

R<sub>1</sub> representa hidrógeno, un grupo alquilo inferior o un grupo bencilo

R<sub>2</sub> representa hidrógeno, grupos metilo, cloro o flúor

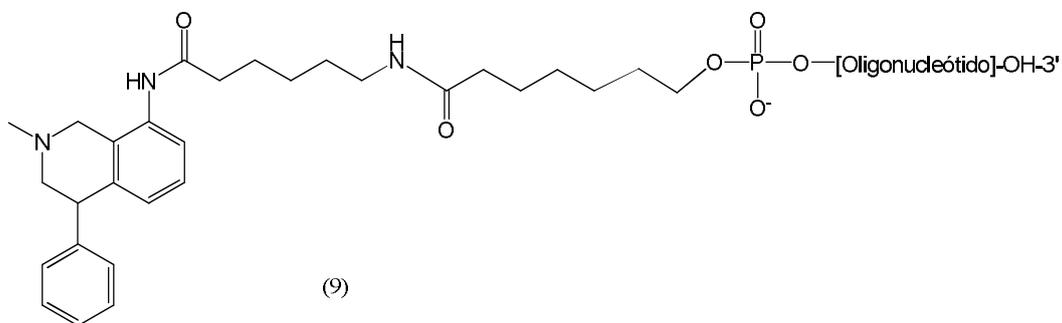
5 R<sub>2</sub>' representa hidrógeno, metilo, metoxi, hidroxilo o átomos de halógeno

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan hidrógeno, un grupo alquilo inferior

R<sub>5</sub> representa hidrógeno, cloro o grupo metoxi en la posición 5 o 6 y

p es 2-6.

En una forma de realización aún más preferida, el conjugado tiene la siguiente estructura



(9)

10

En una forma de realización aún más preferida, el oligonucleótido que forma parte de los conjugados definidos anteriormente son capaces de unirse específicamente a una molécula diana seleccionada del grupo que consiste en:

- dopamina-β-hidroxilasa,
- 15 - el ARNm que codifica dopamina-β-hidroxilasa,
- BAX,
- el ARNm que codifica BAX,
- tau,
- el ARNm que codifica tau,
- 20 - huntingtina y
- el ARNm que codifica huntingtina.

En el sentido de la invención, el grupo protector de fórmula puede estar unido a los grupos 5'-OH o 3'-OH del oligonucleótido por medio de un compuesto enlazador (denominado en el grupo de la fórmula (I) como "L"), obteniéndose así un conjugado-oligonucleótido. Las propiedades químicas del oligonucleótido y el grupo de fórmula (I) permiten varias formas de realización.

5 Por ejemplo, es posible unir en una única molécula de oligonucleótido un número variable de grupos de fórmula (I), típicamente de 2 a 4, dependiendo si el oligonucleótido es bicatenario o monocatenario siempre que la unión se haga a través del 5'-OH y/o 3'-OH. También es posible que una cadena de varios grupos de fórmula (I) se unan al oligonucleótido, dichos grupos de fórmula (I) están unidos entre sí por medio de compuestos enlazadores, tales como los derivados de fosforamidita que producen un enlace fosfodiéster entre las moléculas y/o el oligonucleótido. Además,  
10 la construcción de oligonucleótido puede contener una cadena de varios grupos de fórmula (I) unidos a un extremo del oligonucleótido y otro grupo de fórmula (I) unido al otro extremo del oligonucleótido.

Además, las construcciones de oligonucleótido de la invención pueden contener más de un agente de direccionamiento, distribuidos con todas las combinaciones posibles entre los extremos 5'-OH y 3'-OH de las dos hebras del oligonucleótido o unidos al grupo de fórmula (I). Además, si hay más de un agente de direccionamiento, estos pueden estar unidos en tándem al grupo de fórmula (I) y/o al oligonucleótido.  
15

Si la construcción de oligonucleótido contiene más de un agente de direccionamiento, son posibles diferentes combinaciones. Por ejemplo, el grupo protector se puede unir a los grupos terminales 5'-OH o 3'-OH de una de las hebras del oligonucleótido. Otra combinación posible incluye un fármaco unido al grupo 5'-OH de una hebra del oligonucleótido y una serie de aptámeros unidos a la unidad terminal del grupo de fórmula (I) que se une a la otra hebra del oligonucleótido.  
20

### C. *Composiciones farmacéuticas de la invención*

Los inventores han encontrado que los conjugados de la invención tienen la capacidad de modular la expresión del ácido nucleico que es diana de las secuencias de ácido nucleico de los conjugados. Por ejemplo, en el caso de conjugados que comprenden un ácido nucleico específico para el 5-HT<sub>1A</sub>R presináptico, cuando la construcción se administra a un sujeto, puede inducir de forma eficaz un silenciamiento específico de 5-HT<sub>1A</sub>R en los núcleos del rafe del mesencéfalo de los sujetos (es decir, un área en el cerebro donde se localizan los cuerpos de las neuronas serotoninérgicas).  
25

De esta manera, el experto en la materia apreciará que los conjugados de la invención son adecuados para el tratamiento de enfermedades que se pueden beneficiar de la reducción en los niveles de expresión de los genes que son diana de los ácidos nucleicos presentes en los conjugados de la invención. De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado según la invención para su uso en medicina. Además, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.  
30

Se pueden formular cantidades apropiadas de las construcciones de oligonucleótido de la invención con excipientes y/o soportes farmacéuticamente aceptables para obtener una composición farmacéutica. Una composición que incluye un conjugado según la invención se puede administrar a un sujeto por varias vías. Las vías ejemplares incluyen, administración intraestratral, intracerebroventricular, intratecal, intraparenquimática (por ejemplo, en el cuerpo estriado), intranasal y ocular. La composición también se puede administrar de forma sistémica, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, que es particularmente útil para la distribución de los conjugados a neuronas periféricas. Además, también es posible administrar los conjugados de la invención por vía intranasal lo que permite la administración sistémica mediante un modo de administración no agresivo. Además, la administración intraventricular también puede ser adecuada. Una vía preferida de administración es directamente en el cerebro, por ejemplo, en los ventrículos o el hipotálamo del cerebro, o en las áreas lateral o dorsal del cerebro.  
35 40

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una pluralidad de conjugados diferentes, en donde los diferentes conjugados comprenden ácidos nucleicos que se dirigen a diferentes regiones de la misma molécula diana. De esta manera, las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 y más conjugados diferentes que comprenden cada uno un ácido nucleico diferente.  
45

Los expertos en la materia están familiarizados con los principios y procedimientos discutidos en fuentes ampliamente conocidas y disponibles como *Pharmaceutical Science* de Remington (17<sup>a</sup> Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985) y *The Pharmaceutical Basis of Therapeutics* de Goodman y Gilman (8<sup>a</sup> Ed., Pergamon Press, Elmsford, N.Y., 1990).  
50

En una forma de realización preferida de la presente invención, los conjugados se formulan según un procedimiento estándar como una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos y otros mamíferos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa o intraventricular con soluciones en tampones acuosos isotónicos estériles.  
55

Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar cualquier dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en una

- forma farmacológica, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado sin agua en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de principio activo. Donde la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Donde la composición se administra mediante inyección, se puede suministrar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.
- En casos diferentes de la administración intravenosa, la composición puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes reguladores del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, gel, polímero o formulación de liberación sostenida. La composición se puede formular con los aglutinantes y soportes tradicionales, como se sabe en la técnica. Las formulaciones pueden incluir soportes estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacárido de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc., de grado farmacéutico, soportes inertes que tienen funcionalidad bien establecida en la fabricación de fármacos. Se conocen varios sistemas de distribución y se pueden usar para administrar un agente terapéutico de la presente invención incluyendo encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas y similares.
- En aún otra forma de realización preferida, los agentes terapéuticos que contienen los conjugados de la invención se pueden formular como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico y similares, y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína o similares.
- Para formas de realización en las que la composición se distribuye a través de la barrera hematoencefálica, la composición incluye, por ejemplo, un liposoma, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE UU No. 6372250 (Pardridge) y un soporte farmacéuticamente aceptable. Los liposomas como se describen aquí pueden distribuir agentes biológicamente activos a través de la barrera hematoencefálica, seguido por expresión en el cerebro. Los liposomas y nanopartículas son formas ejemplares de nanocontenedores que se usan normalmente para la encapsulación de fármacos. Los liposomas preferiblemente tienen diámetros de menos de 200 nanómetros. Los liposomas que tienen diámetros de entre 50 y 150 nanómetros son preferidos. Especialmente preferidos son liposomas u otros nanocontenedores que tienen diámetros externos de alrededor de 80 nanómetros. Los tipos adecuados de liposomas están hechos con fosfolípidos neutros tales como 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC), difosfatidil fosfocolina, diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) o colesterol, junto con pequeñas cantidades (1 por ciento) de lípidos catiónicos, tales como bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) para estabilizar el ADN en el liposoma.
- El liposoma se puede cambiar por una nanopartícula o cualquier otro nanocontenedor molecular con un diámetro menor de 200 nm que pueda encapsular ADN y proteger los ácidos nucleicos de las nucleasas mientras que la formulación está aún en la sangre o en tránsito de la sangre al compartimento intracelular de la célula diana. Además, en lugar de usar agentes de conjugación tales como cadenas de PEG, se pueden unir una o más sustancias poliméricas diferentes, tal como esfingomielina, a la superficie del liposoma o nanocontenedor y servir para el doble fin de proporcionar un andamiaje para la conjugación del "péptido transportable" y retrasar la eliminación de la formulación de la sangre y optimizar la farmacocinética en plasma. Además, la presente invención contempla la distribución de ADN a cualquier grupo de células u órganos que tienen receptores diana específicos. Los liposomas se pueden usar para distribuir ADN a órganos, tales como hígado, pulmón y bazo.
- Otros contenedores adecuados para la distribución de los conjugados de la invención incluyen dendrímeros. El término "dendrímero" se refiere a una macromolécula que tiene un núcleo y que tiene múltiples capas de estructuras ramificadas que emanan del núcleo. La forma y tamaño de un soporte dendrítico pueden variar. En algunos casos, el soporte dendrítico puede ser aproximadamente de forma esférica o globular. Además, el transportador dendrítico tiene un diámetro en el intervalo de alrededor de 15 angstroms (Å) hasta alrededor de 250 Å, con un intervalo correspondiente de pesos moleculares, por ejemplo, desde alrededor de 500 Dalton hasta alrededor de 2 millones de Dalton. Los dendrímeros se pueden obtener comercialmente de varias fuentes (por ejemplo, Dendritech, Midland, Michigan) o sintetizar por métodos que conoce bien el experto en la materia. Las moléculas dendríticas se pueden dividir aproximadamente en las especies de bajo peso molecular y las de alto peso molecular. La primera categoría incluye dendrímeros y dendrones mientras que la segunda abarca polímeros dendronizados, polímeros hiperramificados y polímeros tipo peine (también llamados limpiabotellas). Los dendrímeros y dendrones son compuestos repetidamente ramificados, monodispersos y normalmente muy simétricos. No hay diferencia aparente en definir dendrímero y dendrón. Un dendrón normalmente contiene un grupo único químicamente localizable que se llama el punto focal. Debido a la falta de distribución de la masa molar los dendrímeros y dendrones de alta masa molar son macromoléculas pero no polímeros. Las propiedades de los dendrímeros están dominadas por los grupos funcionales en la superficie molecular. La encapsulación dendrítica de moléculas funcionales permite el aislamiento del sitio activo, una estructura que mimetiza la estructura de sitios activos en biomateriales porque los andamiajes dendríticos separan funciones internas y externas. Por ejemplo, un dendrímero puede ser soluble en agua cuando su grupo extremo es un grupo hidrofílico, como un grupo carboxilo.
- Los dendrímeros se pueden caracterizar en general por las siguientes características: (i) un núcleo iniciador (I) que puede tener uno o más sitios reactivos y ser similar a un punto o de tamaño significativo de modo que afecte a la

topología final del dendrímero; (ii) una o más capas de unidades ramificadas que se repiten unidas al núcleo iniciador; (iii) grupos funcionales terminales, tales como grupos aniónicos o catiónicos, unidos, opcionalmente a través de grupos enlazadores, a la superficie del dendrímero.

5 Los dendrímeros contemplados aquí pueden comprender unidades formadoras de lisina o un análogo de lisina. El término "análogo de lisina" se refiere a una molécula que tiene un único grupo carboxilo apical para la unión a la capa previa de unidades formadoras y dos o tres grupos amino primario a los que se pueden unir unidades formadoras adicionales, grupos bloqueantes, enlazadores o grupos arilácido. Los ejemplos de "análogos de lisina" contemplados aquí se describen en PCT/AU2007/000352, por ejemplo, glicil-lys. En algunos ejemplos particulares, el dendrímero comprende sólo lisina o un tipo de análogo de lisina como la unidad formadora.

10 Otros dendrímeros contemplados aquí incluyen los que comprenden unidades formadoras de poliamidoamina (PAMAM), poli(eterhidroxilamina) (PEHAM) o polipropilenimina. En ejemplos particulares de los mismos, el dendrímero tiene sólo poliamidoamina (PAMAM), poli(eterhidroxilamina) (PEHAM) o polipropilenimina como la unidad formadora.

15 El grupo nuclear puede contener solo 1 punto de unión para una unidad formadora o puede contener 2, 3 o más puntos, que se pueden utilizar o no adicionalmente para la unión de unidades formadoras. Típicamente, el punto de unión es un grupo amino libre. Los grupos nucleares pueden consistir en, comprender o estar derivados de una unidad formadora o puede ser una molécula diferente de las unidades formadoras. Aquí se ilustran grupos nucleares ejemplares y se describen en PCT/AU2007/000352.

20 Los liposomas y dendrímeros se pueden combinar con cualquier soporte farmacéuticamente aceptable para la administración intravenosa. La administración intravenosa de la composición es la vía preferida ya que es la menos invasora. Otras vías de administración son posibles, si se desean. Los soportes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen solución salina, tampón Tris, tampón fosfato o cualquier otra solución acuosa. Se puede establecer una dosis apropiada por procedimientos que conoce bien el experto en la materia.

#### D. Usos terapéuticos de los conjugados de la invención

25 Se apreciará que la afección clínica que se puede tratar con los conjugados de la invención dependerá de la especificidad del ácido nucleico que forma parte de los conjugados. De esta manera, los conjugados de la invención se pueden usar para el tratamiento de cualquier enfermedad que se pueda mejorar silenciando un gen de interés en una célula que expresa un transportador de neurotransmisor. El experto en la materia entenderá que los conjugados son útiles para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la expresión anormal de una proteína en una célula (por ejemplo, acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en cuerpos de Lewy) o para enfermedades en donde la proteína diana se expresa a niveles normales pero que se puede mejorar disminuyendo la expresión de dicha proteína diana.

#### D.1. Conjugados que comprenden ácidos nucleicos dirigidos a los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, transportador de serotonina o canales iónicos localizados en neuronas serotoninérgicas.

35 Como se ha mencionado anteriormente, cuando se administra un ISRS a un sujeto en necesidad del mismo, hay un mecanismo de retroalimentación negativa que tiene lugar como resultado de la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados en las neuronas serotoninérgicas (el 5-HT<sub>1A</sub>R presináptico). La acción del ISRS produce niveles altos de serotonina inducidos por el bloqueo de la recaptación de serotonina mediada por los transportadores de recaptación de serotonina (SERT), que están localizados en las neuronas serotoninérgicas. Este hecho no solo activará los receptores postsinápticos de serotonina sino también los 5-HT<sub>1A</sub>R presinápticos, lo que sirve como un sensor de retroalimentación para la célula. La activación de estos 5-HT<sub>1A</sub>R produce un descenso en los niveles de serotonina debido a la supresión de la descarga celular y la liberación de serotonina dependiente de impulso, limitando así el efecto del ISRS administrado.

40 Este efecto se muestra por ejemplo en los ejemplos 2 y 3 de la presente invención, en donde se muestra que la infusión de un conjugado que comprende sertralina y un ARNip específico para 5-HT<sub>1A</sub>R son capaces de prevenir la respuesta hipotérmica inducida por el agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub>R. Este efecto permite el uso de los conjugados de la invención en todas esas afecciones clínicas en donde se desea disminuir la expresión de un gen que es complementario al ácido nucleico que forma parte de los conjugados.

45 Este es un descubrimiento significativo en el campo de la terapia antidepresiva, ya que los oligonucleótidos de la invención pueden ser útiles para neutralizar los efectos secundarios de los ISRS comerciales mencionados anteriormente, es decir, inicio de acción lento y eficacia limitada. Además, al emplear las construcciones de oligonucleótidos altamente selectivas de la presente invención, solo se necesita administrar dosis bajas del oligonucleótido terapéutico para alcanzar el efecto deseado. Como resultado, las construcciones de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con una concentración anormal de serotonina presente en el área sináptica, especialmente las que están relacionadas con la transmisión deficiente de serotonina (es decir, niveles disminuidos de concentración de serotonina en la sinapsis), tales como trastornos relacionados con depresión.

55 Según esto, si el ácido nucleico se dirige contra un componente de las neuronas serotoninérgicas presinápticas, los conjugados serán adecuados para el tratamiento de enfermedades en donde se requiere una actividad disminuida de

las neuronas serotoninérgicas presinápticas. De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de la invención en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN) y
- 5 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana seleccionada del grupo del ARNm del receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>), el ARNm del transportador de serotonina, el ARNm de TREK-1, el polipéptido del receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>) y el polipéptido transportador de serotonina

para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno relacionado con la depresión.

10 También se divulga un método de tratamiento o prevención de un trastorno relacionado con depresión que comprende la administración a un sujeto en necesidad del mismo del conjugado de la invención en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN) o un antidepresivo noradrenérgico y serotoninérgico específico (NASSA) y
- 15 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana seleccionada del grupo del codificador del ARNm del receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>), el ARNm del transportador de serotonina, el ARNm de TREK-1, el polipéptido del receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>), el polipéptido transportador de serotonina y el polipéptido TREK-1.

La expresión “trastorno relacionado con depresión”, como se usa aquí, se refiere a esas afecciones que se caracterizan por un nivel anormalmente bajo de serotonina en las sinapsis y que se definen en Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders—Cuarta Edición (DSM-IV), publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría, Washington DC e incluyen, sin limitación, depresión mayor, depresión a largo plazo, depresión resistente a tratamiento, distimia, estados mentales de estado de ánimo deprimido caracterizados por sentimientos de tristeza, desesperación, desaliento, “depresión”, melancolía, sentimientos de baja autoestima, culpa y autorreproche, eliminación de contacto interpersonal y síntomas somáticos tales como trastornos alimenticios y de sueño. Preferiblemente el trastorno relacionado con depresión se selecciona del grupo que consiste en: depresión mayor, trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), trastornos generalizado del desarrollo (TGD), trastorno de estrés postraumático (TEPT), trastornos de ansiedad, trastornos bipolares, trastornos alimenticios y dolor crónico.

Además, los conjugados de la invención que comprenden un reactivo de selectividad específico para neuronas serotoninérgicas y un oligonucleótido que silencia el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, la liberación de serotonina en la corteza prefrontal aumenta aproximadamente del 150-200% de los valores basales comparado con el aumento del 50% producido por el antidepresivo sólo (véase la figura 8). Como se ha mencionado anteriormente, los antidepresivos tradicionales se diseñan para mejorar la transmisión de serotonina pero tienen efectos limitados debido a la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos. De esta manera, con las construcciones de oligonucleótidos de la invención se superan las limitaciones principales de dichos antidepresivos (inicio de acción lento y eficacia limitada). Como resultado, se puede alcanzar una respuesta positiva al tratamiento antidepresivo en un periodo de tiempo corto y se puede mejorar el número de pacientes que responden al tratamiento en relación al tratamiento solo con los antidepresivos comerciales (es decir, ISRS). De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con la depresión que comprende la administración de un conjugado según la invención y un antidepresivo.

40 La construcción de oligonucleótido de la invención se puede administrar simultáneamente con los antidepresivos actuales (ISRS, IRNA, IMAO, ATC, etc.). La administración de una secuencia de oligonucleótido que bloquea la expresión de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> permite mejorar el efecto de estos antidepresivos inhibiendo la atenuación del aumento extracelular de 5-HT producido por el bloqueo de la recaptación.

#### D.2. Conjugados que comprenden ácidos nucleicos dirigidos a sinucleína

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de la invención en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina (IRD) y un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y
- (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica la alfa-sinucleína o el polipéptido alfa-sinucleína

50 para el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy.

El término “enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy” se refiere a una afección que se caracteriza por trastornos en el metabolismo de alfa-sinucleína, que da lugar a la formación de inclusiones anormales de alfa-

sinucleína. Más en particular los trastornos de cuerpos de Lewy incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), EP con demencia (EPD) y atrofia de múltiples sistemas.

Preferiblemente, el conjugado de la presente invención se puede administrar junto con un antidepresivo comercial, tal como un ISRS, para el tratamiento de depresión y/o trastornos relacionados con depresión.

5 D.3. Conjugados que comprenden ácidos nucleicos dirigidos al transportador de norepinefrina

Como se ha explicado en la sección de antecedentes, un aumento en la transmisión de DA mesocortical puede ser útil para el tratamiento de esquizofrenia. Puesto que el transportador de NA (NAT) muestra una afinidad similar por NA y DA, los inhibidores de NAT preferentemente aumentan la concentración extracelular de DA en la CPF medial (CPFm) comparada con el núcleo caudado y núcleo acumbens (NAc). Por lo tanto, los axones de NA de las neuronas del locus cerúleo (LC) pueden contribuir a regular la concentración extracelular de DA en CPF tomando o coliberando DA.

También se divulgan conjugados en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de dopamina, un inhibidor de la recaptación de noradrenalina, un inhibidor de la recaptación de serotonina-noradrenalina y un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y
- 15 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica el transportador de norepinefrina o el polipéptido norepinefrina

para el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por o que responde a la inhibición de la recaptación de norepinefrina.

Dichas afecciones médicas incluyen, a modo de ejemplo, trastornos del dolor tales como dolor neuropático y dolor crónico, trastornos depresivos tal como depresión mayor, trastornos afectivos tal como un trastorno de ansiedad, trastorno por deficiencia de atención con hiperactividad, trastornos cognitivos tal como demencia e incontinencia urinaria por esfuerzo.

20 D.4. Conjugados que comprenden ácidos nucleicos dirigidos a la dopamina-beta-hidroxilasa

Como se ha explicado en la sección de antecedentes, un aumento en la transmisión mesocortical de DA puede ser útil para el tratamiento de esquizofrenia. Este aumento se puede alcanzar mediante el uso de inhibidores del transportador de noradrenalina o, de forma alternativa, inhibiendo la dopamina-beta-hidroxilasa. Esta enzima es responsable de la conversión de dopamina en noradrenalina y así, cuando se silencia, se produciría un aumento en el nivel de dopamina en las neuronas NA. Esto producirá a su vez vesículas noradrenérgicas que contienen NA y un mayor nivel de DA. Esto aumenta el nivel de DA en zonas de proyección de NA mejorando la función relacionada con la memoria y cognitiva en el cerebro.

También se divulgan conjugados en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor del transportador de norepinefrina (IRSDN) y un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y
- 35 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica la dopamina-beta hidroxilasa o el polipéptido dopamina-beta-hidroxilasa

para el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con una deficiencia en dopamina en proyecciones noradrenérgicas.

La expresión "enfermedad asociada con deficiencia de dopamina en proyecciones noradrenérgicas", como se usa aquí, se refiere a procesos de memoria y cognitivos asociados con demencia, depresión y enfermedades neurodegenerativas.

40 D.5. Conjugados que comprenden ácidos nucleicos dirigidos a BAX

También se divulgan conjugados en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de serotonina-dopamina-norepinefrina (IRSDN) y un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y
- 45 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica BAX o el polipéptido BAX

para el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con apoptosis neuronal y muerte celular.

El término “enfermedad asociada con apoptosis neuronal y muerte celular”, como se usa aquí se refiere al ‘punto final’ de muchos trastornos neurológicos humanos, incluyendo pero no limitados a enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, ictus/traumatismo, esclerosis múltiple y lateral amiotrófica. La muerte apoptótica de neuronas del hipocampo y corticales es responsable de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer; la muerte de neuronas del mesencéfalo que usan el neurotransmisor dopamina subyace a la enfermedad de Parkinson; la enfermedad de Huntington implica la muerte de neuronas en el cuerpo estriado, que controlan los movimientos del cuerpo; y la muerte de neuronas motoras inferiores se manifiesta como esclerosis lateral amiotrófica. Además, la isquemia cerebral y el traumatismo inducen necrosis de un área cerebral pequeña, que después propaga la pérdida de células neuronales por apoptosis a un área mayor del cerebro, debido al material neurotóxico liberado por las células necróticas. La pérdida apoptótica de células neuronales también se observa en el cerebro envejecido, como un proceso fisiológico.

#### D.6. Conjugados que comprenden ácidos nucleicos dirigidos a tau

También se divulgan conjugados en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de serotonina-dopamina-norepinefrina (IRSDN) y un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y
- (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica tau o el polipéptido tau

para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con tau.

El término “enfermedad asociada con tau”, como se usa aquí, se refiere a enfermedades asociadas con anomalías en tau así como a enfermedades que son “tauopatías”. Las enfermedades asociadas a tau incluyen, pero no están limitadas a, demencia frontotemporal, incluyendo el subtipo de demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, enfermedad de gránulos argirofílicos así como enfermedad de Parkinson, síndrome de Down, parkinsonismo posencefálico, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick C, demencia pugilística, enfermedad de Blint, enfermedades de priones, esclerosis lateral amiotrófica, complejo parkinsonismo-demencia de Guam, esclerosis múltiple, glaucoma, retinopatía diabética y lesión cerebral traumática; así como enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, paraplejia hereditaria espástica y atrofia de múltiples sistemas. “Tauopatía” como se define aquí significa una enfermedad neurodegenerativa asociada con formas fibrilares de la proteína tau (ovillos) en el cerebro. Estas enfermedades incluyen EA, sin embargo, otras tauopatías incluyen, pero no están limitadas a, demencia frontotemporal incluyendo el subtipo de demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis cerebral supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, enfermedad de gránulos argirofílicos.

#### D.7. Conjugados que comprenden ácidos nucleicos dirigidos a huntingtina

También se divulgan conjugados en donde

- (i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de serotonina-dopamina-norepinefrina (IRSDN) y un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y
- (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica huntingtina o el polipéptido huntingtina

para el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con huntingtina.

El término “enfermedad asociada con huntingtina”, como se usa aquí, se refiere a enfermedades causadas por conformación o agregación o expresión aberrante de proteína huntingtina mutante e incluye, sin limitación, enfermedad de Huntington y variantes de la misma.

La cantidad del agente terapéutico de la presente invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar, bien establecidas en la administración de agentes terapéuticos. La dosis precisa a ser empleada en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y se debe decidir según el juicio del médico y las necesidades del paciente. Los intervalos adecuados de dosis para la administración intracraneal en general son alrededor de 10<sup>3</sup> a 10<sup>15</sup> unidades infecciosas de vector vírico por microlitro administrado en 1 a 3000 microlitros de volumen de inyección individual. Cantidades adicionales de unidades infecciosas de vector por microlitro en general contendrían alrededor de 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup>, 10<sup>12</sup>, 10<sup>13</sup>, 10<sup>14</sup> unidades infecciosas de vector vírico administrado en alrededor de 10, 50, 100, 200, 500, 1000 o 2000 microlitros. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o *in vivo*.

Para la administración intraventricular de los conjugados de la invención, se pueden implantar múltiples catéteres que tengan puertos de acceso en un paciente determinado para una terapia completa. En una forma de realización preferida, hay un sistema de puerto y catéter por hemisferio cerebral o cerebelar y tal vez varios. Una vez un neurocirujano realiza los implantes, el neurólogo del paciente puede realizar un ciclo de terapia que consiste en inyecciones intravenosas rápidas repetidas de los conjugados durante un periodo de semanas o meses, junto con el seguimiento del efecto terapéutico a lo largo del tiempo. Los dispositivos pueden permanecer implantados durante varios meses o años para un ciclo completo de terapia. Después de confirmar la eficacia terapéutica, opcionalmente los puertos de acceso se podrían explantar y los catéteres se pueden sellar y abandonar, o también explantar. El material del dispositivo no debe interferir con el diagnóstico por imagen de resonancia magnética y, por supuesto, las preparaciones de ARN pequeño interferente deben ser compatibles con los materiales del puerto de acceso y los catéteres y cualquier superficie de recubrimiento.

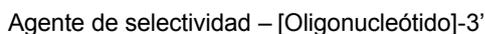
#### *E. Síntesis de los conjugados de la invención*

Los conjugados de la invención típicamente se sintetizan usando procedimientos estándar en síntesis orgánica. El experto en la materia apreciará que los pasos exactos de la síntesis dependerán de la estructura exacta del conjugado que se tiene que sintetizar. Por ejemplo, si el conjugado comprende una sola hebra de ácido nucleico conjugada con el agente de selectividad a través de su extremo 5', entonces normalmente la síntesis se lleva a cabo como se explica posteriormente poniendo en contacto un oligonucleótido aminoactivado y un reactivo de selectividad activado por un reactivo.

En donde el conjugado comprende un ácido nucleico bicatenario, entonces se sintetizan las hebras sentido y antisentido por separado y se hibridan in vitro usando procedimientos estándar de biología molecular. En un conjugado típico, la primera de las hebras del ácido nucleico lleva el agente de selectividad y la segunda hebra de ácido nucleico lleva un grupo protector. En una forma de realización aún más preferida, el agente de selectividad se acopla al extremo 5' de la primera hebra de ácido nucleico y/o el grupo protector se une al extremo 5' de la segunda hebra de ácido nucleico, aunque la unión del agente de selectividad o del grupo protector también se puede llevar a cabo en los extremos 3' de las hebras de ácido nucleico.

La síntesis de los conjugados se puede llevar a cabo como sigue:

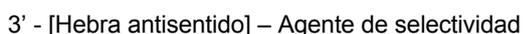
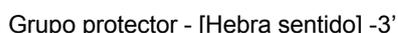
[1] Los conjugados que tienen la estructura



se sintetizan típicamente usando los siguientes pasos:

- (i) Activar el agente de selectividad. Preferiblemente, el grupo de activación en el agente de selectividad es un grupo succinimida o un grupo amino;
- (ii) Activar el oligonucleótido en su extremo 5'. Preferiblemente el grupo de activación en el oligonucleótido es un grupo amino (en donde el agente de selectividad se ha activado por un grupo succinimida) o un grupo carboxilo (en donde el agente de selectividad se ha activado por un grupo amino) y
- (iii) poner en contacto el agente de selectividad activado con el oligonucleótido activado en condiciones adecuadas para la reacción entre los dos grupos de activación.

[2] Los conjugados que tienen la estructura



típicamente se sintetizan usando los siguientes pasos:

- (i) Activar el agente de selectividad. Preferiblemente, el grupo de activación en el agente de selectividad es un grupo succinimida o un grupo amino;
- (ii) Activar la hebra sentido en su extremo 5'. Preferiblemente, el grupo de activación en el oligonucleótido es un grupo amino (en donde el agente de selectividad se ha activado por un grupo succinimida) o un grupo carboxilo (en donde el agente de selectividad se ha activado por un grupo amino),
- (iii) Poner en contacto el agente de selectividad activado con la hebra sentido activada en condiciones adecuadas para la reacción entre los dos grupos de activación
- (iv) Añadir el grupo protector a la hebra antisentido inmovilizada. Este paso preferiblemente se lleva a cabo usando un oligonucleótido cuyos grupos reactivos están bloqueados mediante acetilación o bencilación (los grupos furanosa), 2-cianoetilación (los enlaces fosfodiéster) y Fmoc (los grupos amino exocíclicos).

## (v) Hibridación de las hebras sentido y antisentido

E.1. Síntesis de conjugados que comprenden un ácido nucleico y un ISRS unido al extremo 5'

Los conjugados de la invención se pueden preparar usando técnicas que conocen los expertos en la materia. La síntesis de conjugados puede implicar la protección y desprotección selectiva de grupos funcionales. Los grupos protectores adecuados los conoce bien el experto en la materia. Por ejemplo, se proporciona una revisión general de grupos protectores en química orgánica por Wuts, P.G.M. y Greene T.W. en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (4ª Ed. Wiley-Interscience), y por Kocienski P.J. en *Protecting Groups* (3ª Ed. Georg Thieme Verlag).

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen los significados detallados a continuación:

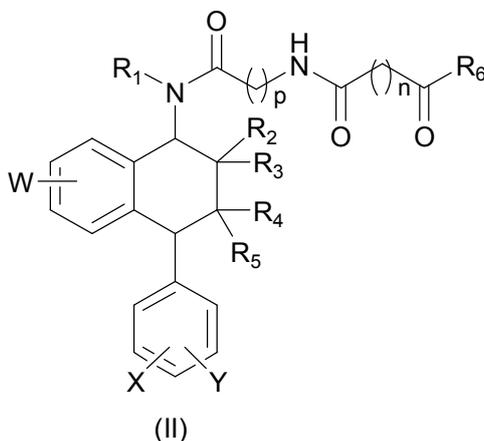
- El término "alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un radical de hidrocarburo lineal o ramificado que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones, que tiene de uno a seis, preferiblemente de uno a tres (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) átomos de carbono y está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. Ejemplos de grupos alquilo incluyen pero no están limitados a grupos alquilo tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo y hexilo. Preferiblemente alquilo se refiere a metilo.
- El término "halógeno" se refiere a bromo, cloro, yodo o flúor.
- El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente en donde al menos un átomo de hidrógeno se ha cambiado por halógeno. Ejemplos de grupos haloalquilo incluyen pero no están limitados a CF<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>, CHF<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>. Preferiblemente haloalquilo se refiere a CF<sub>3</sub>.
- El término "arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>" se refiere a un grupo aromático que tiene entre 6 y 10 átomos de carbono, que comprende 1 ó 2 núcleos aromáticos, unido por medio de un enlace carbono-carbono o fusionado, incluyendo por ejemplo fenilo, naftilo y difenilo. Preferiblemente "arilo" se refiere a fenilo.
- El término "heterociclilo" se refiere a un radical anillo estable de 3 a 10 miembros, preferiblemente un anillo de 5 o 6 miembros, que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre y que puede estar parcial o totalmente saturado o ser aromático ("heteroarilo"). Para los fines de esta invención, el heterociclilo puede ser un sistema de anillo monociclilo, biciclilo o triciclilo, que puede incluir sistemas de anillos fusionados, En una forma de realización particular, el grupo heterociclilo es succinimida.

Los compuestos de la presente invención representados mediante la anteriormente descrita fórmula (I) pueden incluir estereoisómeros dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros únicos, enantiómeros o diastereoisómeros y mezclas de los mismos están en el ámbito de la presente invención.

A menos que se indique de otra manera, se pretende que los compuestos usados en la invención incluyan compuestos que solo se diferencian en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen las estructuras presentes excepto por la sustitución de un hidrógeno por deuterio o tritio o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en <sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C o un nitrógeno enriquecido en <sup>15</sup>N están dentro del ámbito de la invención.

i. Síntesis usando un ácido nucleico amino-derivado y un derivado de sertralina activado

En una primera forma de realización, los conjugados según la invención se pueden obtener acoplando un ácido nucleico amino-derivado a una forma derivada activada de sertralina o análogo de la misma, en donde el derivado activado de un agente de selectividad es un compuesto de fórmula (II):



en donde

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo  $C_1-C_6$ ;

X e Y se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo  $C_1-C_3$ , haloalquilo  $C_1-C_3$ ,  $OR^a$  y  $SR^b$ , en donde  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan independientemente de alquilo  $C_1-C_3$  y arilo  $C_6-C_{10}$ ;

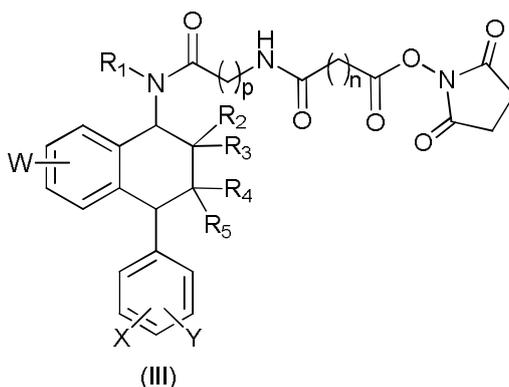
5  $R^6$  es un radical activador de carbonilo;

W se selecciona de hidrógeno, halógeno, CN,  $NO_2$ , alquilo  $C_1-C_3$ , haloalquilo  $C_1-C_3$ ,  $NR^cR^d$ ,  $SO_2NR^eR^f$ ,  $NR^gSO_2R^h$ ,  $CO_2R^i$ , en donde  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^g$ ,  $R^h$  y  $R^i$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo  $C_1-C_3$ ;

n y p se seleccionan de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

10 El término "radical activador de carbonilo" se refiere a un sustituyente de un carbonilo que hace el carbonilo propenso a adición nucleofílica. En una forma de realización particular, forma, junto con el grupo carbonilo, un anhídrido, un haluro de ácido o un grupo éster. En una forma de realización preferida, el radical activador de carbonilo se selecciona de halógeno,  $-CO(O)R$ ,  $-OR'$ ,  $-SR''$ ; en donde R, R' y R'' se seleccionan independientemente de alquilo, haloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo de  $C_1-C_6$ .

15 En una forma de realización particular,  $R^6$  es un grupo succinimidoxi. Por tanto, en otra forma de realización, los conjugados según la invención se pueden obtener acoplado un ácido nucleico amino-derivado a una forma derivada activada de sertralina o un análogo de la misma, en donde el derivado activado de un agente de selectividad es un compuesto de fórmula (III):



en donde

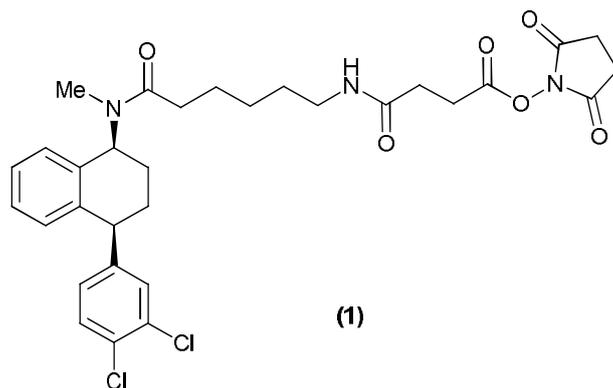
20  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo  $C_1-C_6$ ;

X e Y se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo  $C_1-C_3$ , haloalquilo  $C_1-C_3$ ,  $OR^a$  y  $SR^b$ , en donde  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan independientemente de alquilo  $C_1-C_3$  y arilo  $C_6-C_{10}$ ;

W se selecciona de hidrógeno, halógeno, CN,  $NO_2$ , alquilo  $C_1-C_3$ , haloalquilo  $C_1-C_3$ ,  $NR^cR^d$ ,  $SO_2NR^eR^f$ ,  $NR^gSO_2R^h$ ,  $CO_2R^i$ , en donde  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^g$ ,  $R^h$  y  $R^i$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo  $C_1-C_3$ ;

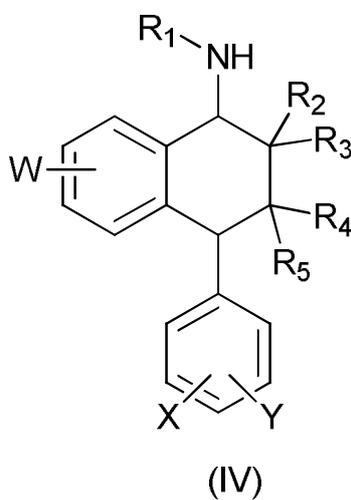
25 n y p se seleccionan de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

Según una forma de realización particular, el compuesto activado de fórmula (III) es el compuesto (1):



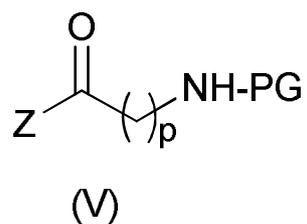
Según una forma de realización, los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar mediante una secuencia que comprende:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV):

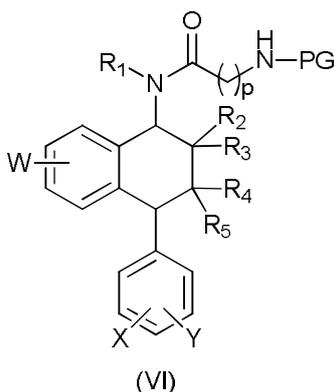


5

y un agente acilante de fórmula (V):



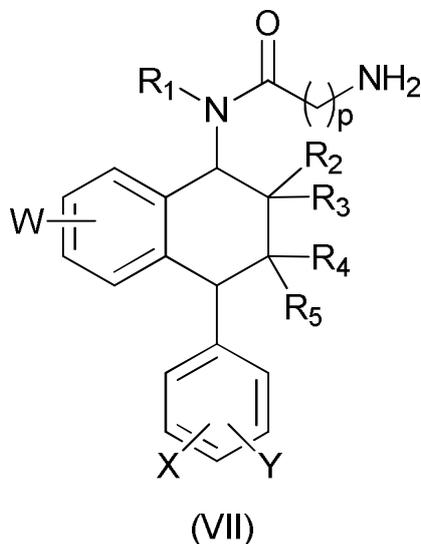
en donde p es como se ha definido anteriormente, Z es halógeno u OH y PG es un grupo protector amino para dar un compuesto de fórmula (VI)



Los grupos protectores normalmente usados para aminas incluyen carbamatos, tales como terc-butil, bencil, 2,2,2-tricloroetil, 2-trimetilsiletil, 9H-fluorenilmetil (Fmoc), alil o nitrofenil carbamatos; amidas, tales como formamidas, acetamidas, trifluoroacetamidas, sulfonamidas, trifluorometanosulfonil amidas o terc-butilsulfonil amidas; y aril o arilalquilaminas, tales como p-metoxifenil, bencil, p-metoxibencil, 3,4-dimetoxibencil, dimetoxitritil o monometoxitritil aminas. En una forma de realización particular, el agente acilante de fórmula (V) es el ácido 9H-fluorenilmetoxicarbonil-6-aminohecanoico.

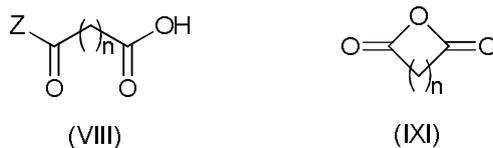
Los compuestos de fórmula (IV) se pueden preparar a su vez por ejemplo como se describe en US6455736. En particular, cuando el compuesto de fórmula (IV) es sertralina, se puede obtener del clorhidrato correspondiente (comercialmente disponible) mediante tratamiento con una base adecuada, incluyendo bases orgánicas e inorgánicas tales como carbonatos o hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos, amoníaco o aminas, tales como trimetilamina, trietilamina, diisopropiletilamina, piperidina, morfolina y similares.

b) desproteger el grupo amino protector en el compuesto de fórmula (IV) para dar un compuesto de fórmula (VII):

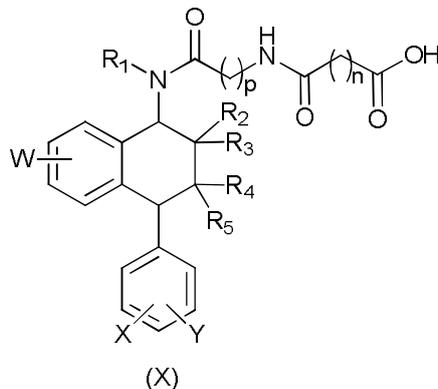


Las condiciones de desprotección las conoce el experto en la materia, por ejemplo en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Wuts, P.G.M. and Greene T.W., 4ª Ed. Wiley-Interscience) y en *Protecting Groups* (Kocienski P.J., 3ª Ed. Georg Thieme Verlag). En una forma de realización particular, el grupo protector se elimina en presencia de una amina, tal como piperidina, morfolina, dicitclohexilamina, diisopropiletilamina o dimetilaminopiridina, preferiblemente en presencia de piperidina.

c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (VII) con un agente acilante de fórmula (VIII) o (IX):



en donde n es como se ha definido anteriormente y Z es halógeno u OH, lo que produce un compuesto de fórmula (X):



En una forma de realización particular, el agente acilante de fórmula (VII) es anhídrido succínico,

5 d) tratar un compuesto de fórmula (X) con un grupo activador de carbonilo.

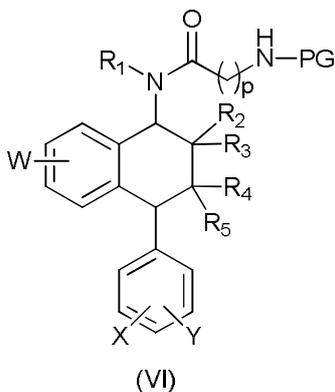
El término “grupo activador de carbonilo” se refiere a un compuesto que convierte el carbonilo de un grupo ácido carboxílico a uno que es más propenso a adición nucleofílica, tal como por ejemplo, anhídridos, haluros de ácido carboxílico, carbodiimidas, agentes de halogenación, disulfuros, etc. En una forma de realización particular, el grupo activador de carbonilo se selecciona de agente de halogenación, R(O)COC(O)R, RC(O)halógeno, R'OH, R''SH, R'''SSR'''; en donde R, R' y R'' se seleccionan independientemente de alquilo, haloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

En una forma de realización particular, el grupo activador de carbonilo es N-hidroxisuccinimida. En este caso, la reacción preferiblemente se realiza en presencia de un grupo activador de carbonilo adicional.

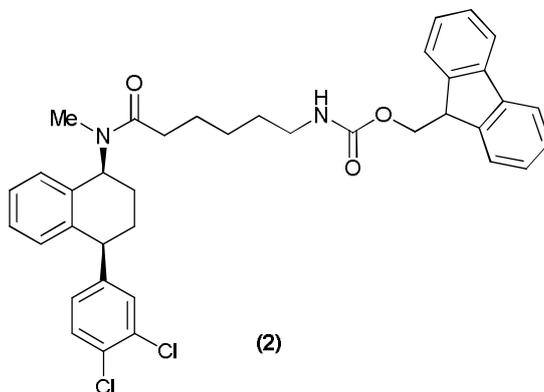
15 Por tanto, en una forma de realización particular, el paso d) comprende tratar un compuesto de fórmula (X) con N-hidroxisuccinimida en presencia de un grupo activador de carbonilo adicional.

Los grupos activadores de carbonilo adecuados para este proceso incluyen carbodiimidas, tales como dicitohexilcarbodiimida (DCC) y diisopropilcarbodiimida (DIC) y triazololes, tales como 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) y 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol (HOAt). En una forma de realización preferida, el compuesto de fórmula (VI) se hace reaccionar con N-hidroxisuccinimida en presencia de diisopropilcarbodiimida para dar el derivado activado de fórmula (II).

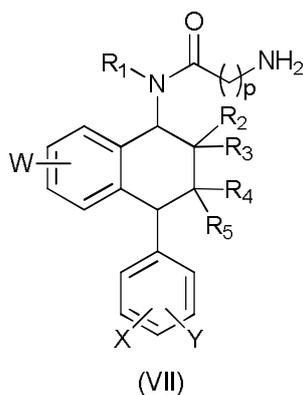
Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (VI),



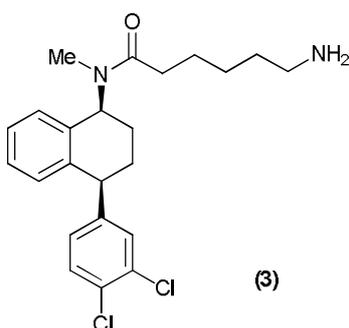
en donde  $R^1-R^5$ , X, Y, W, p y PG son como se ha definido anteriormente. En una forma de realización preferida,  $R^1$  es metilo,  $R^2-R^5$  son hidrógeno, X e Y son cloruro, W es hidrógeno, p es 5 y PG es 9H-fluorenilmetoxicarbonilo. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (VI) es el compuesto (2)



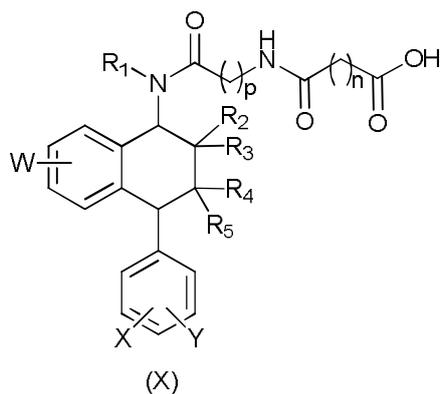
5 Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (VII),



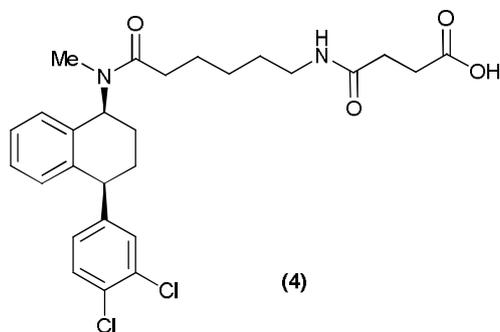
10 en donde  $R^1-R^5$ , X, Y, W y p son como se ha definido anteriormente. En una forma de realización preferida,  $R^1$  es metilo,  $R^2-R^5$  son hidrógeno, X e Y son cloruro, W es hidrógeno y p es 5. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (V) es el compuesto (3)



Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (X)

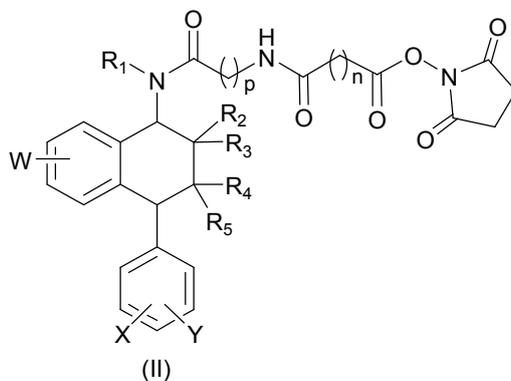


en donde  $R^1$ - $R^5$ , X, Y, W, p y n son como se ha definido anteriormente. En una forma de realización preferida,  $R^1$  es metilo,  $R^2$ - $R^5$  son hidrógeno, X e Y son cloruro, W es hidrógeno, p es 5 y n es 2. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (VIII) es el compuesto (4):



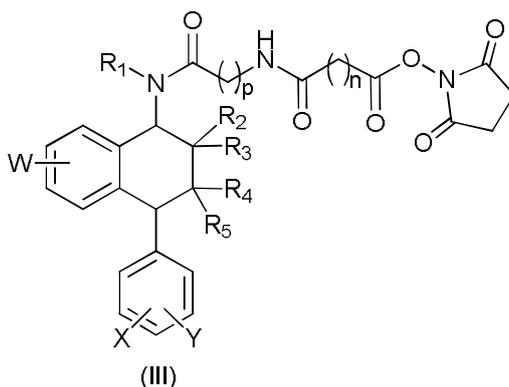
5

Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (II),

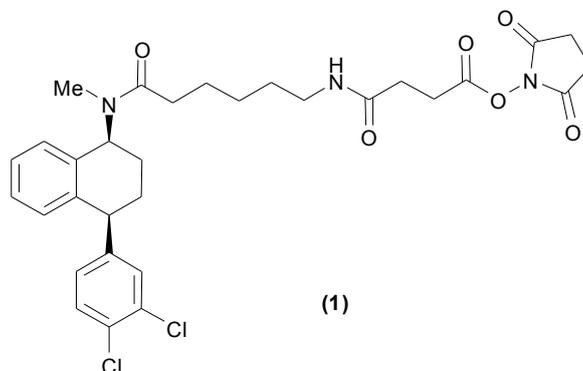


en donde  $R^1$ - $R^6$ , X, Y, W, p y n son como se ha definido anteriormente.

Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (III)



en donde R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup>, X, Y, W, p y n son como se ha definido anteriormente. En una forma de realización preferida, R<sup>1</sup> es metilo, R<sup>2</sup>-R<sup>5</sup> son hidrógeno, X e Y son cloruro, W es hidrógeno, p es 5 y n es 2. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (II) es el compuesto (1):



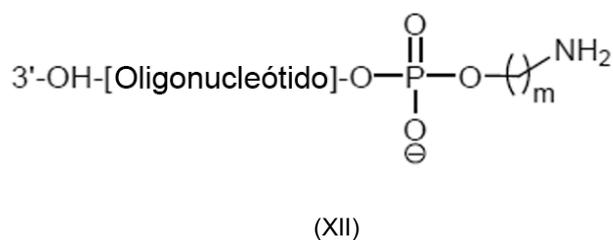
5

La hebra de ARNip que se va a unir al agente de selectividad se forma mediante síntesis de fase sólida paso a paso en un soporte sólido siguiendo el método divulgado en "Oligonucleotide synthesis, a practical approach." editado por M.J. Gait. IRL Press-1985.

10

Para conjugar el ligando de selectividad, el oligonucleótido necesita estar aminoderivado. Esto se puede hacer en el extremo 5' o en el 3'. En una forma de realización preferida el ligando de selectividad se une al extremo 5'.

Según una forma de realización, los conjugados de fórmula (I) se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (II) o (III) como se ha descrito anteriormente y un oligonucleótido amino-modificado de fórmula (XII):



15

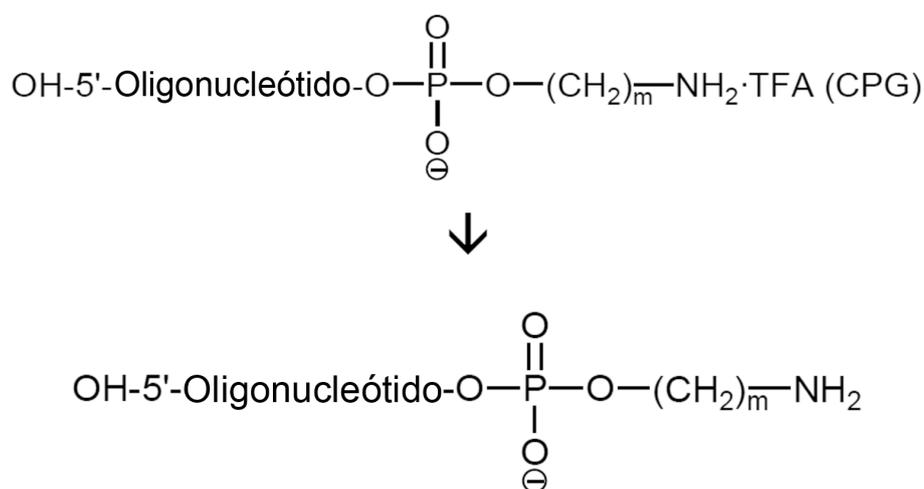
El procedimiento general para activar un oligonucleótido usando un modificador amino enlazador será típicamente según el esquema siguiente:



- (v) eliminar el soporte sólido de la columna y transferirlo a un vial con tapa de rosca y completar la desprotección de 2 pasos.

5 El oligonucleótido aminomodificado se debe desproteger para la conjugación adicional con el agente de selectividad. Para este fin todos los grupos protectores restantes en el oligonucleótido se eliminan como sigue. Se añadieron 500  $\mu$ l de una mezcla que contiene el 20% v/v de metilamina (solución acuosa al 40%) y el 80% v/v de una solución saturada de amoníaco (que contiene  $\text{NH}_3$  del 30-32% peso/volumen) a un tubo Eppendorf con el oligonucleótido (escala 200 nmoles). El tubo se cerró herméticamente y se calentó durante 45 minutos a una temperatura de 65°C. Este procedimiento elimina los grupos protectores en el átomo de fósforo de los nucleótidos (acetilación o benzoilación de la furanosa y la 2-cianometilación de los enlaces fosfodiéster) y los grupos protectores de los grupos amino exocíclicos (Bz, Ac, tBu). La mezcla se enfrió después y se filtró y el sobrenadante se secó. El precipitado residual se hizo reaccionar con trietilamina-HF 1 M durante 3 horas a 65°C para cortar los grupos protectores en 2' de los nucleótidos (2'-t-butil dimetil sililo - TBDMS). Por último, la solución resultante se desaló en una columna de Sephadex, dejando un oligonucleótido 5'-aminomodificado.

15 En el caso de incorporación del enlazador modificador amino en el extremo 3'; se debe usar el soporte polimérico correspondiente (bolas de CPG) y el esquema de síntesis corresponderá al siguiente diagrama:

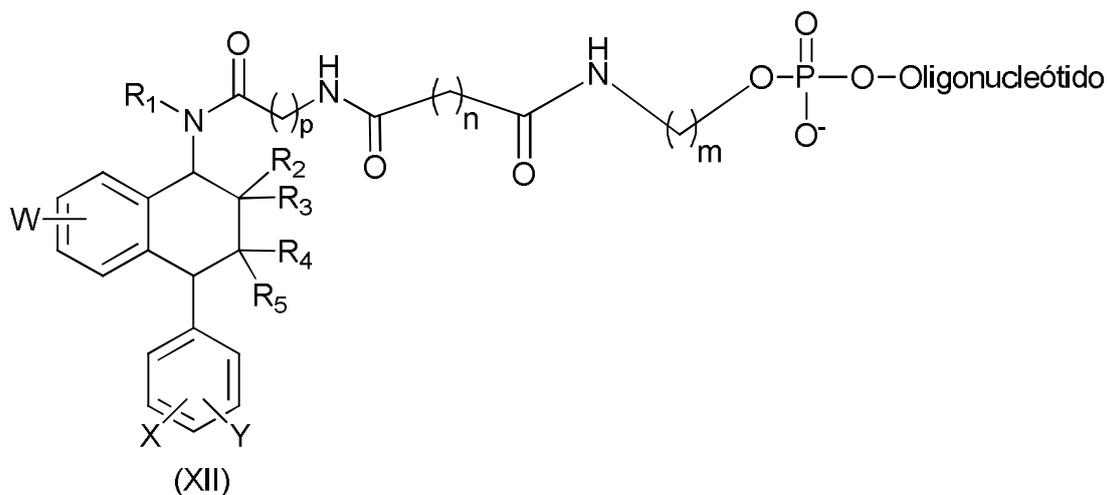


(la hidrólisis se puede hacer usando hidróxido de amonio o reactivo de Beckman) (metilamina:hidróxido de amonio).

20 En ambos casos, el paso de desprotección será idéntico y el planteamiento de conjugación en cada caso también es idéntico pero con diferentes grados de eficacia. En la mayoría de los casos, se alcanzan mejores resultados con la derivación 5'-amino.

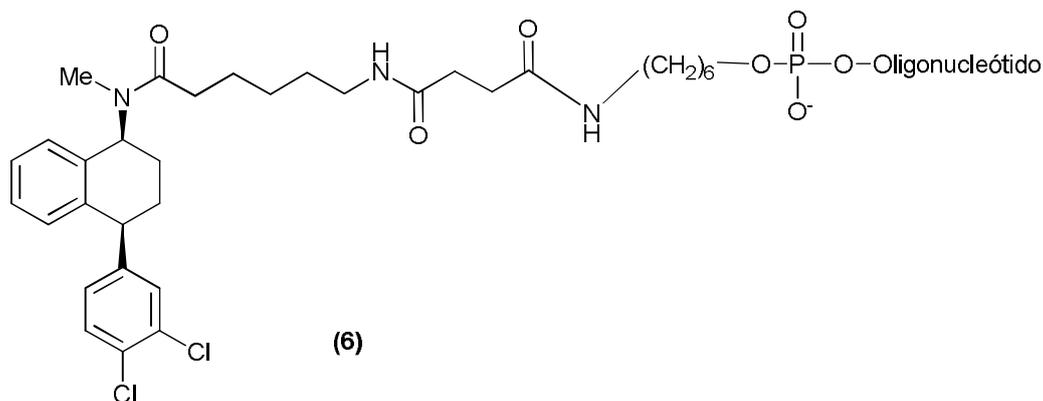
En una forma de realización preferida, el oligonucleótido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 5 a 12.

El oligonucleótido aminoactivado se hace reaccionar después con el derivado activado de un agente de selectividad de fórmula (II) o (III) como se ha definido anteriormente. Se obtiene un conjugado que tiene la estructura



en donde  $R^1$ - $R^5$ , X, Y, W, p y n son como se ha definido anteriormente y m es de 2 a 10.

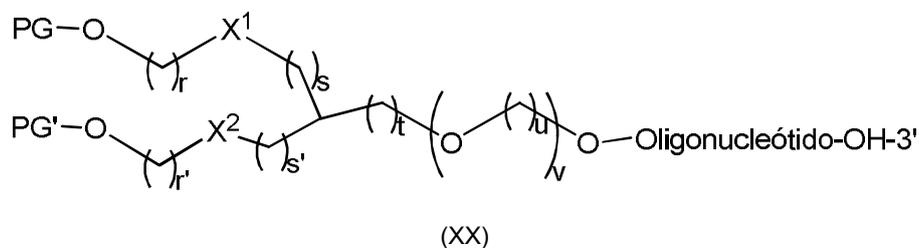
En una forma de realización preferida, el conjugado tiene la estructura

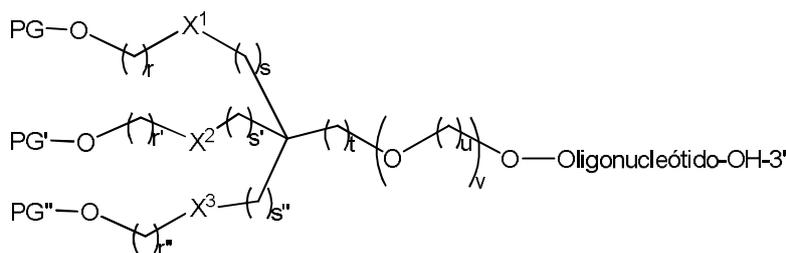


5 En una forma de realización particular, el oligonucleótido se hace reaccionar previamente con una fosforamida bivalente o trivalente. De este modo se puede obtener un compuesto con dos o tres posiciones de acoplamiento de modo que se pueden acoplar al oligonucleótido dos o tres moléculas de agente de selectividad. Dichas dos o tres moléculas de agente de selectividad pueden ser similares o diferentes.

10 En una forma de realización particular se acoplan al oligonucleótido dos o tres moléculas del mismo agente de selectividad. En otra forma de realización, se acoplan al oligonucleótido dos o tres agentes de selectividad diferentes.

En una forma de realización, el oligonucleótido se hace reaccionar con una fosforamida bivalente o trivalente para dar un compuesto de fórmula (XX) o (XXI):





(XXI)

en donde

5 PG, PG'' y PG''' se seleccionan independientemente de H y un grupo protector hidroxilo; r, r', r'', s, s', s'', t y u se seleccionan independientemente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13;

v se selecciona independientemente de 0 y 1; y

X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de CH<sub>2</sub>, O, S, NH, CO, C(O)O y C(O)NH.

10 El experto en la materia conoce grupos protectores hidroxilo, así como las condiciones adecuadas de protección y desprotección, por ejemplo en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Wuts, P.G.M. y Greene T.W., 4<sup>a</sup> Ed. Wiley-Interscience) y en *Protecting Groups* (Kocienski P.J., 3<sup>a</sup> Ed. Georg Thieme Verlag).

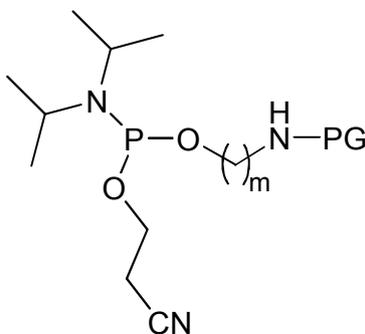
15 En una forma de realización particular, los grupos protectores hidroxilo se seleccionan de éteres, silil éteres, ésteres, sulfonatos, sulfenatos, sulfinatos, carbonatos y carbamatos. En una forma de realización preferida, los grupos protectores hidroxilo se seleccionan de acetilo, benzoilo, bencilo, metoxietoximetil éter (MEM), dimetoxitritilo (DMT), metoximetil éter (MOM), metoxitritilo (MMT), p-metoxibencil éter (PMB), metiltiometil éter, pivaloilo (Piv), tetrahidropirranilo (THP), Tritilo (Tr), 9H-fluorenilmetilo (Fmoc), trimetil sililo (TMS), terc-butildimetilsililo (TBDMS), terc-butildimetilsililoximetilo (TOM) y triisopropilsilil (TIPS) éter. Preferiblemente, PG, PG' y PG'' se seleccionan independientemente de H, DMT y Fmoc.

En una forma de realización particular, los grupos protectores de hidroxilo en el compuesto de fórmula (XX) o (XXI) son diferentes, de modo que se pueden desproteger y acoplar selectivamente, si se desea, con diferentes moléculas.

20 Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XX) en donde r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan C(O)NH y PG<sup>1</sup> y PG<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, DMT y Fmoc. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XX) en donde r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan CH<sub>2</sub> y PG<sup>1</sup> y PG<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H y DMT.

25 Una forma de realización se dirige a un compuesto de fórmula (XXI) en donde r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O y PG<sup>1</sup>, PG<sup>2</sup> y PG<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de H y DMT. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXI) en donde r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O y PG<sup>1</sup>, PG<sup>2</sup> y PG<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de H y DMT.

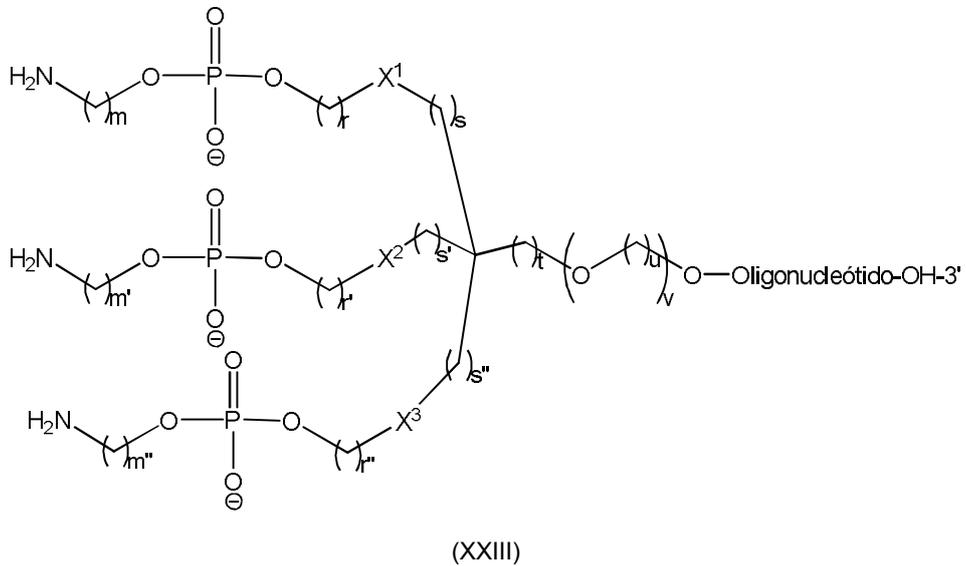
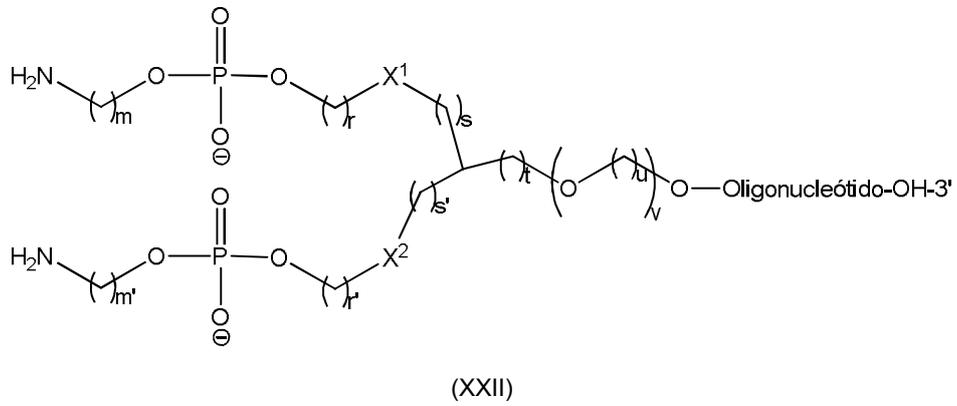
Los compuestos de fórmula (XX) y (XXI) se desprotegen después, si es necesario, y se hacen reaccionar con un aminomodificador de fórmula (XIII):



(XIII)

30

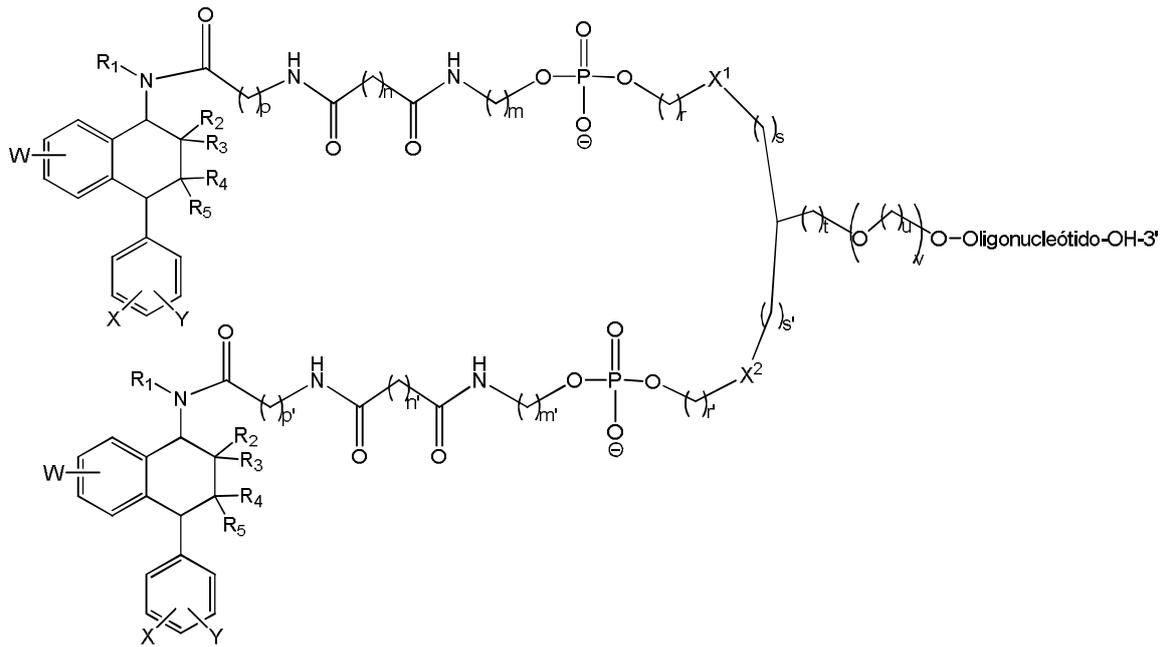
en donde m y PG son como se han definido anteriormente para dar un compuesto de fórmula (XXII) o (XXIII), respectivamente:



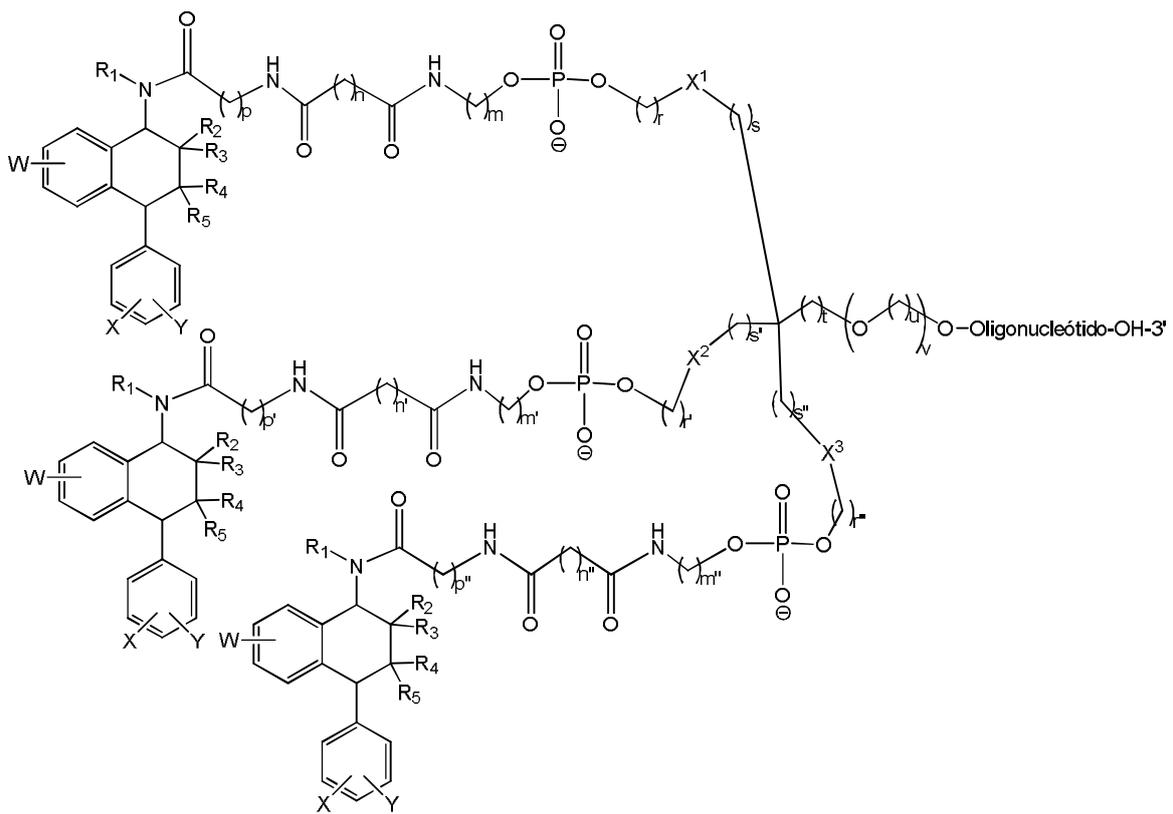
5

en donde m, m', m'', r, r', r'', s, s', s'', t, u, v, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> son como se han definido previamente.

Los compuestos de fórmula (XXII) y (XXIII) se pueden hacer reaccionar adicionalmente con un compuesto de fórmula (II), preferiblemente con un compuesto de fórmula (III), para dar conjugados (XXIV) y (XXV), respectivamente:



(XXIV)



(XXV)

5 en donde

m, m', m'', n, n', n'', p, p', p'', r, r', r'', s, s', s'', t, u, v, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup>, W, X, Y y Z son como se han descrito previamente.

Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXIV) como se define anteriormente.

Otra forma de realización se dirige a un compuesto de fórmula (XXIV) en donde el agente de selectividad es sertralina, p y p' son 5, n y n' son 2, m y m' son 6, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0 y X y X' representan C(O)NH. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXIV) en donde el agente de selectividad es sertralina, p y p' son 5, n y n' son 2, m y m' son 6, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X y X' representan CH<sub>2</sub>.

5 Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXV) como se define anteriormente.

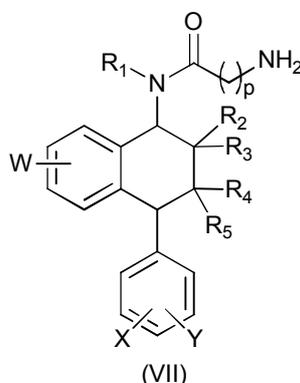
Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXV) en donde el agente de selectividad es sertralina, p, p' y p'' son 5, n, n' y n'' son 2, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X, X' y X'' representan O. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXV) en donde el agente de selectividad es sertralina, p, p' y p'' son 5, n, n' y n'' son 2, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X, X' y X'' representan O.

10

ii. Síntesis usando un ácido nucleico carboxil-derivado y sertralina amino-derivada

En otra forma de realización, el conjugado de la invención se obtiene por la conjugación de un agente de selectividad amino-derivado y un oligonucleótido carboxil-derivado.

En una forma de realización particular, el derivado activado del agente de selectividad es un compuesto de fórmula (VII):



15

en donde

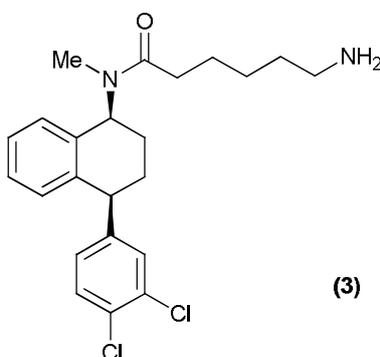
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

X e Y se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, OR<sup>a</sup> y SR<sup>b</sup>, en donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>;

20 W se selecciona de hidrógeno, halógeno, CN, NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>, SO<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>R<sup>f</sup>, NR<sup>g</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>h</sup>, CO<sub>2</sub>R<sup>i</sup>, en donde R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup>, R<sup>f</sup>, R<sup>g</sup>, R<sup>h</sup> y R<sup>i</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

p se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

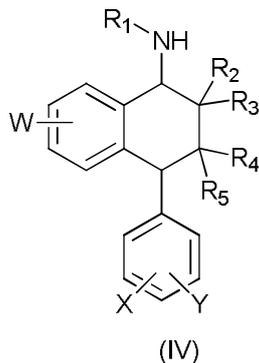
Según una forma de realización particular, el compuesto activado de fórmula (II) es el compuesto (3) como se describe anteriormente:



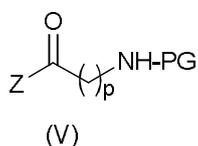
25

Se pueden preparar compuestos de fórmula (VII) como se describe anteriormente por una secuencia de pasos que comprenden:

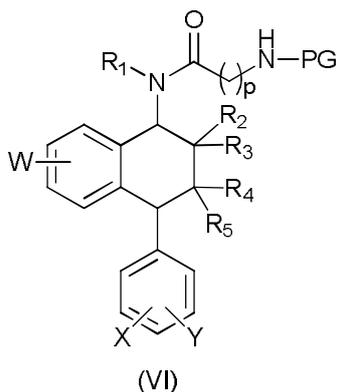
(i) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV)



con un agente acilante de fórmula (V):



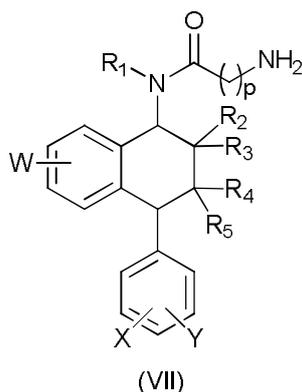
5 en donde p es como se define anteriormente, Z es halógeno u OH y PG es un grupo protector amina para dar un compuesto de fórmula (VI)



10 Grupos protectores comúnmente usados para aminas incluyen carbamatos, tales como carbamatos de terc-butilo, bencilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 9H-fluorenilmetilo (Fmoc), alilo o nitrofenilo; amidas, tales como formamidas, acetamidas, trifluoroacetamidas, sulfonamidas, trifluorometanosulfonil amidas or terc-butilsulfonil amidas; y aril or arilaquilaminas, tales como p-metoxifenil, bencil, p-metoxibencil, 3,4-dimetoxibencil, dimetoxitritil o monometoxitritil aminas. En una forma de realización particular, el agente acilante de fórmula (VII) es ácido 9H-fluorenilmetoxicarbonil-6-aminoheptanoico.

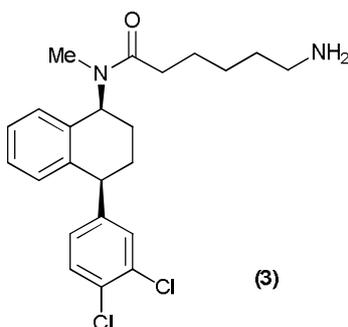
Los compuestos de fórmula (III) se pueden preparar a su vez por ejemplo como se ha descrito anteriormente.

15 (ii) desproteger el grupo protector amino en el compuesto de fórmula (VI) para dar un compuesto de fórmula (VII):



5 El experto en la materia conoce las condiciones adecuadas de desprotección, por ejemplo en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Wuts, P.G.M. y Greene T.W., 4 Ed. Wiley-Interscience) y en *Protecting Groups* (Kocienski P.J., 3 Ed. Georg Thieme Verlag). En una forma de realización particular, el grupo protector se elimina en presencia de una amina, tal como piperidina, morfolina, dicitohexilamina, diisopropiletilamina o dimetilaminopiridina, preferiblemente en presencia de piperidina.

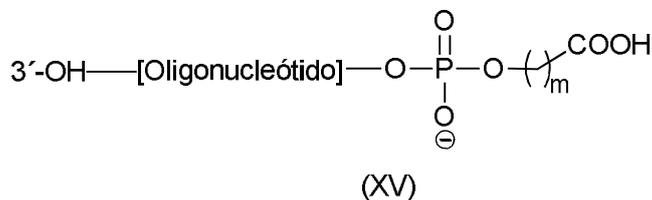
En una forma de realización preferida, el agente de selectividad amino-modificado corresponde al compuesto (3).



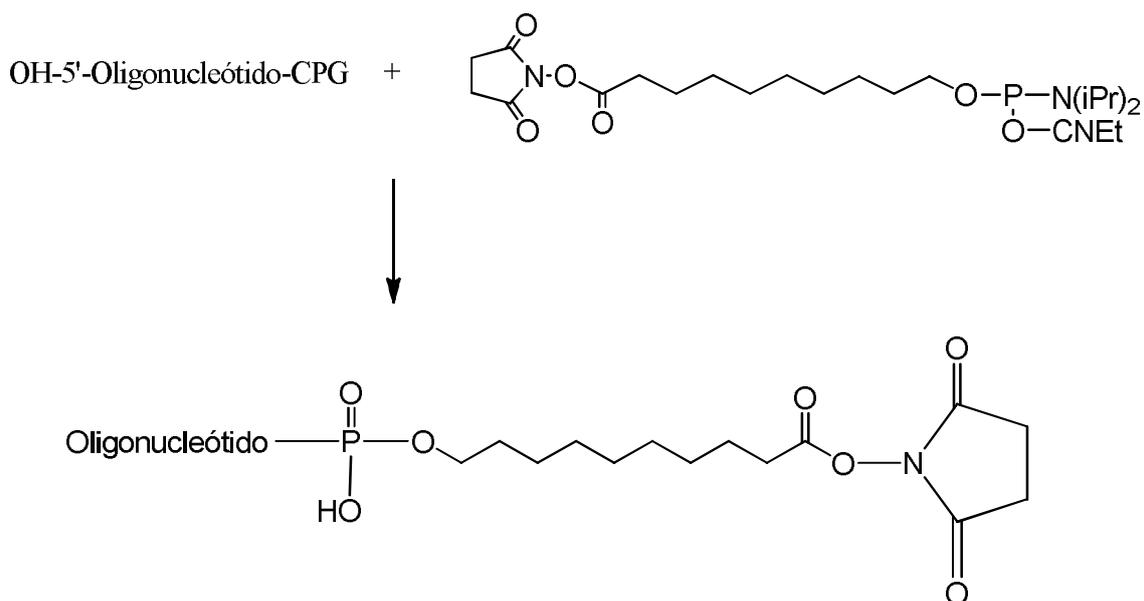
10 La hebra de ARNip que se va a unir al agente de selectividad se forma mediante síntesis de fase sólida paso a paso en un soporte sólido siguiendo el método divulgado en "Oligonucleotide synthesis, a practical approach." editado por M.J. Gait. IRL Press-1985.

Para conjugar el ligando de selectividad, el oligonucleótido necesita estar carboxiderivado. Esto se puede hacer en el extremo 5' o en el 3'. En una forma de realización preferida el ligando de selectividad se une al extremo 5'.

15 Según una forma de realización, los conjugados de fórmula (XIV) se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (VII) como se ha descrito anteriormente y un oligonucleótido carboxi-modificado de fórmula (XV):



El procedimiento general para activar un oligonucleótido usando un enlazador carboxilo un modificador será típicamente según el esquema siguiente:



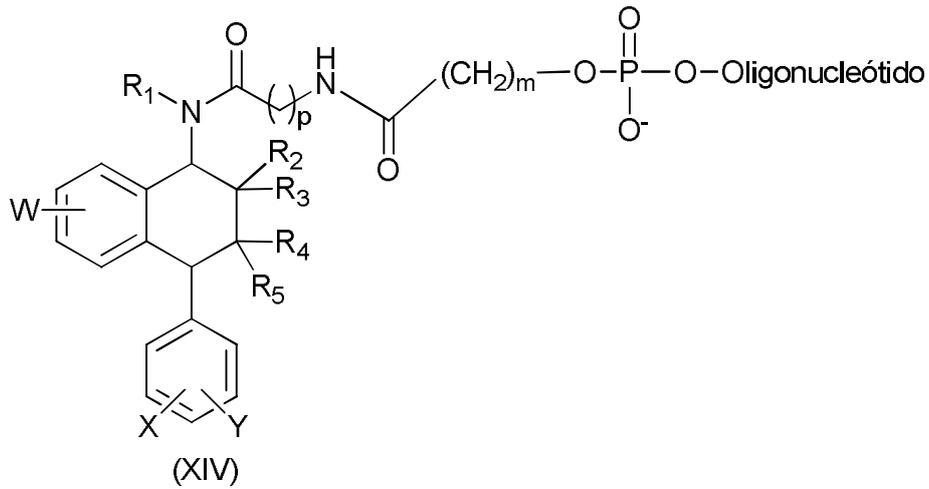
Método general de síntesis del oligonucleótido carboximodificado:

- (i) preparar una solución de molécula modificadora en acetonitrilo anhídrido y colocarla en un depósito extra en el sintetizador (Y)
- 5 (ii) al inicio de la síntesis de la secuencia de oligonucleótido requerida, añadir la base Y en el extremo 5'. Esto permitirá que la molécula enlazadora/modificadora del depósito Y se acople al extremo de la secuencia del oligonucleótido
- (iii) iniciar la síntesis usando el ciclo de acoplamiento adecuado. El mismo ciclo de acoplamiento se usará para llevar a cabo el acoplamiento de la molécula enlazadora/modificadora
- 10 (iv) al final de la síntesis del oligonucleótido, lavar el soporte y por último secar el soporte con gas
- (v) eliminar el soporte sólido de la columna y transferirlo a un vial con tapa de rosca y completar la desprotección de 2 pasos.

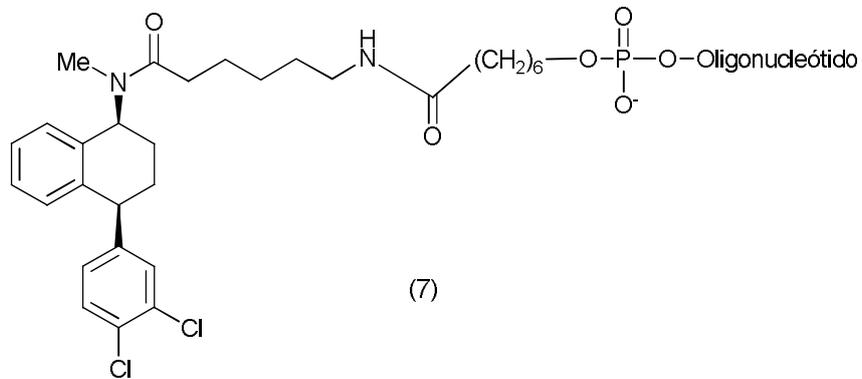
El oligonucleótido carboximodificado se debe desproteger para la conjugación adicional con el agente de selectividad. Para este fin todos los grupos protectores restantes en el oligonucleótido se eliminan como sigue. Se añadieron 500  $\mu$ l de una mezcla que contiene el 20% v/v de metilamina (solución acuosa al 40%) y el 80% v/v de una solución saturada de amoníaco (que contiene del 30-32% peso/volumen de  $\text{NH}_3$ ) a un tubo Eppendorf con el oligonucleótido (escala 200 nmoles). El tubo se cerró herméticamente y se calentó durante 45 minutos a una temperatura de 65°C. Este procedimiento elimina los grupos protectores en el átomo de fósforo de los nucleótidos (acetilación o benzoilación de la furanosa y la 2-cianoetilación de los enlaces fosfodiéster) y los grupos protectores de los grupos amino exocíclicos (Bz, Ac, IBu). La mezcla se enfrió después y se filtró y el sobrenadante se secó. El precipitado residual se hizo reaccionar con trietilamina-HF 1 M durante 3 horas a 65°C para cortar los grupos protectores en 2' de los nucleótidos (2'-t-butil dimetil sililo - TBDMS). Por último, la solución resultante se desaló en una columna de Sephadex, dejando un oligonucleótido 5'-carboximodificado.

En una forma de realización preferida, el oligonucleótido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 5 a 12.

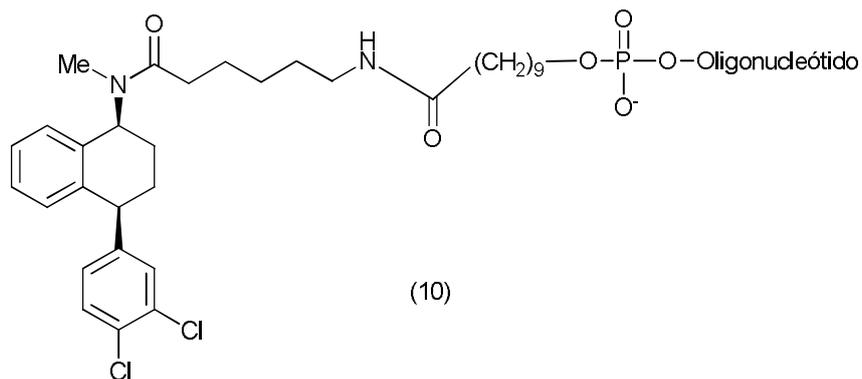
El oligonucleótido carboxil-activado se hace reaccionar después con el derivado activado de un agente de selectividad de fórmula (VII) como se define anteriormente. Se obtiene un compuesto que tiene la fórmula general:



En una forma de realización particular, el conjugado tiene la estructura

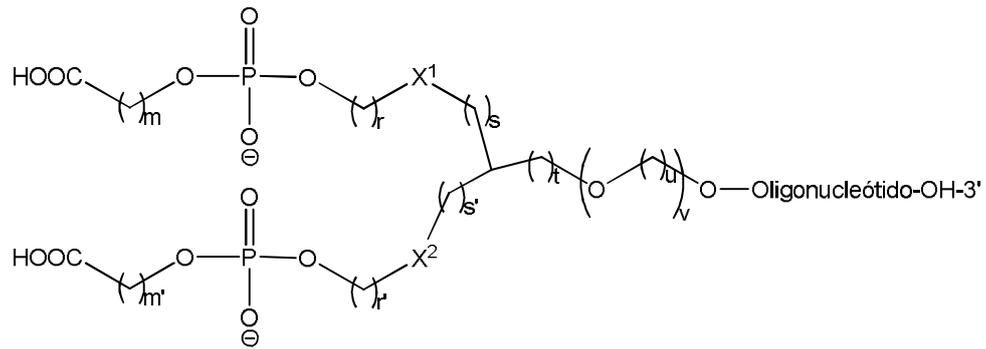


En otra forma de realización particular, el conjugado tiene la estructura

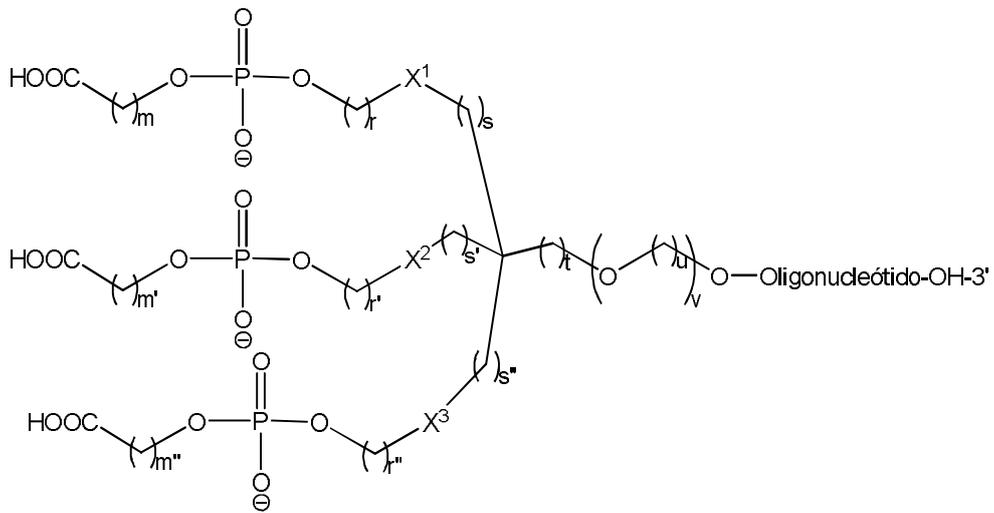


5

En una forma de realización, el oligonucleótido se hace reaccionar primero con una fosforamidita bivalente o trivalente para dar un compuesto de fórmula (XX) o (XXI) como se define previamente. Los compuestos de fórmula (XX) y (XXI) se desprotegen después, si es necesario, y se hacen reaccionar con un modificador carboxi para dar un compuesto de fórmula (XXVI) o (XXVII), respectivamente:



(XXVI)

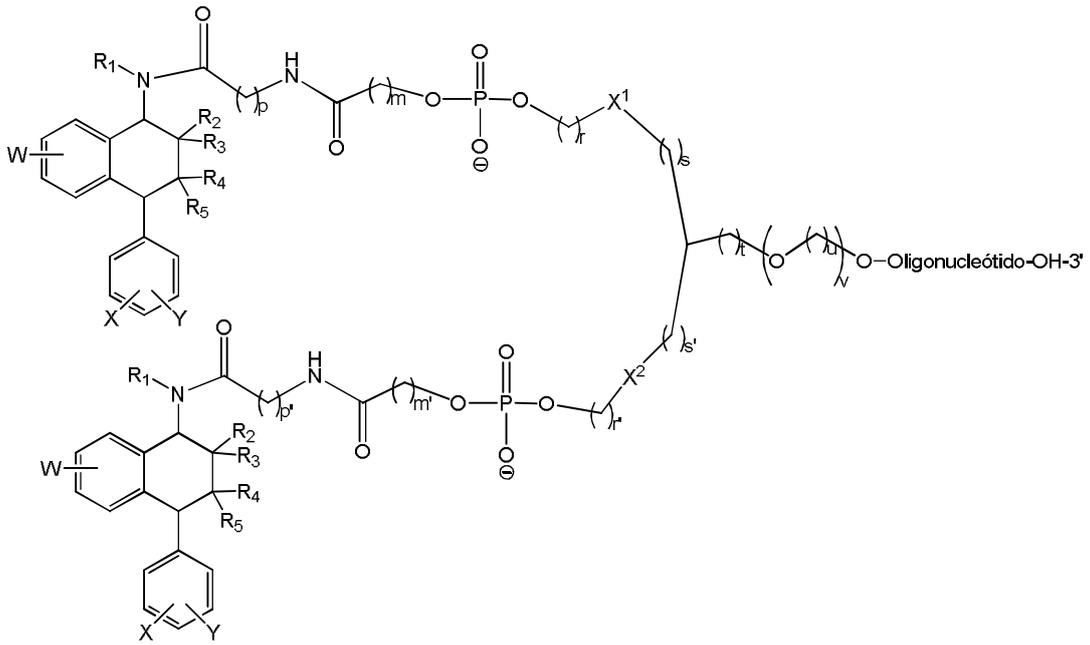


(XXVII)

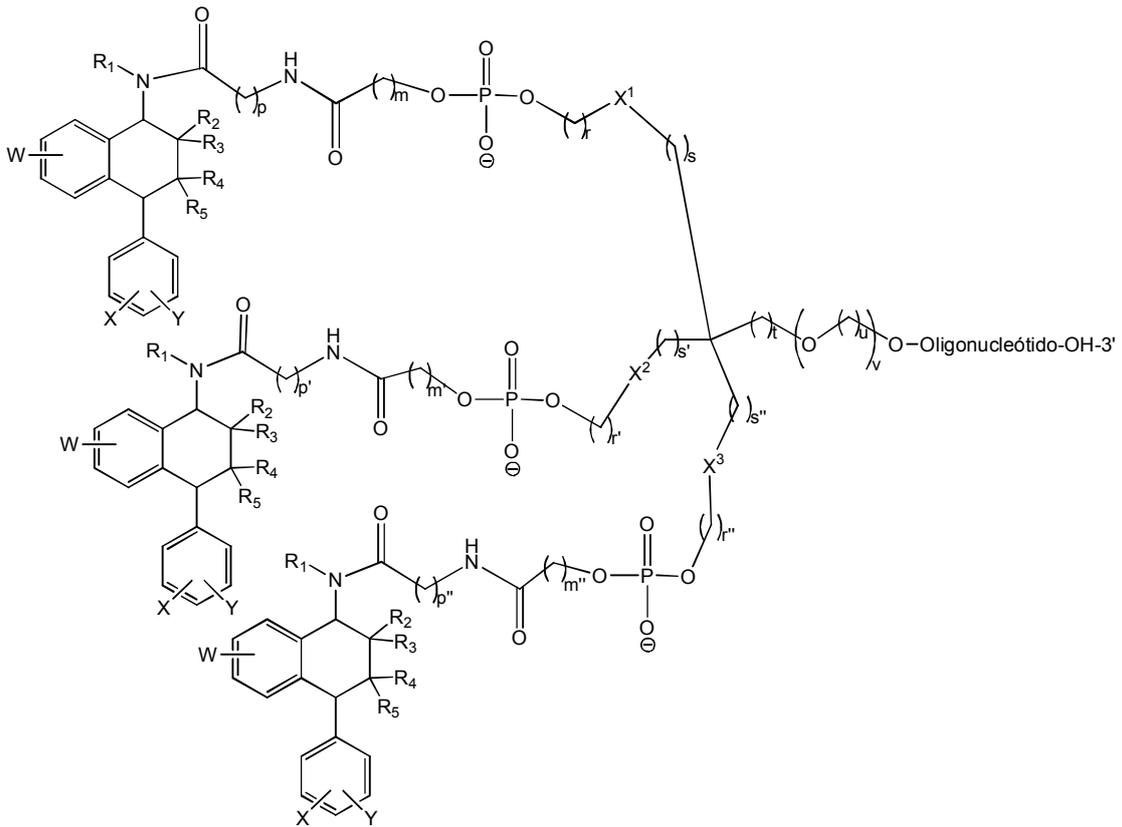
5 en donde

$m$ ,  $m'$ ,  $m''$ ,  $r$ ,  $r'$ ,  $r''$ ,  $s$ ,  $s'$ ,  $s''$ ,  $t$ ,  $u$ ,  $v$ ,  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  son como se han definido previamente.

Los compuestos de fórmula (XXVI) y (XXVII) se pueden hacer reaccionar adicionalmente con un compuesto de fórmula (VII), para dar conjugados (XXVIII) y (XXIX), respectivamente:



(XXVIII)



(XXIX)

5 en donde

$m, m', m'', p, p', p'', r, r', r'', s, s', s'', t, u, v, X^1, X^2, X^3, R^1-R^5, W, X, Y$  y  $Z$  son como se han descrito previamente.

Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXVIII) como se define anteriormente.

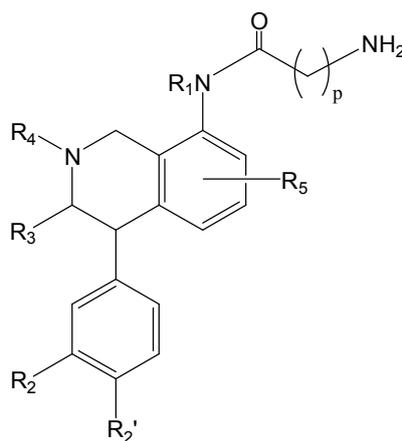
- Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXVIII) en donde el agente de selectividad es sertralina, p y p' son 5, m y m' son 6, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0, X y X' representan C(O)NH. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXVIII) en donde el agente de selectividad es sertralina, p y p' son 5, m y m' son 6, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X y X' representan CH<sub>2</sub>. Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXVIII) en donde el agente de selectividad es sertralina, p y p' son 5, m y m' son 9, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0, X y X' representan C(O)NH. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXVIII) en donde el agente de selectividad es sertralina, p y p' son 5, m y m' son 9, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X y X' representan CH<sub>2</sub>.

Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXIX) como se define anteriormente.

- 10 Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXIX) en donde el agente de selectividad es sertralina, p, p' y p'' son 5, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X, X' y X'' representan O. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXIX) en donde el agente de selectividad es sertralina, p, p' y p'' son 5, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X, X' y X'' representan O.
- 15 Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXIX) en donde el agente de selectividad es sertralina, p, p' y p'' son 5, m, m' y m'' son 9, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X, X' y X'' representan O. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXIX) en donde el agente de selectividad es sertralina, p, p' y p'' son 5, m, m' y m'' son 9, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X, X' y X'' representan O.

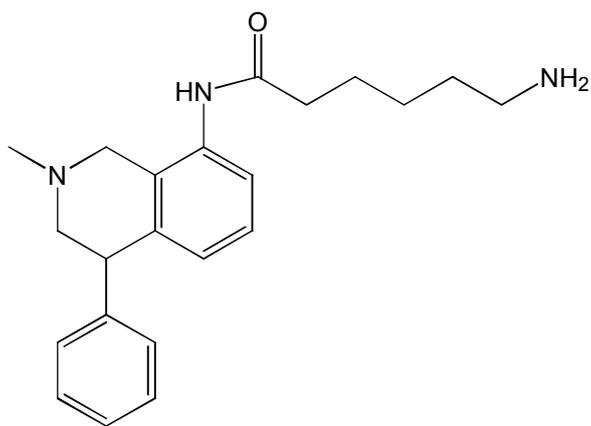
### iii. Síntesis usando un ácido nucleico carboxil-derivado y nomifensina amino-derivada

- 20 La nomifensina y análogos de la misma contienen un grupo amino que se podría usar en principio para acoplar a un oligonucleótido carboxi-modificado. Sin embargo, el grupo amino está directamente acoplado a un anillo aromático, que produce una reactividad disminuida e impedimento estérico. De esta manera, se prepara nomifensina o variante de la misma amino-modificada que tiene la fórmula (XVI)



(XVI)

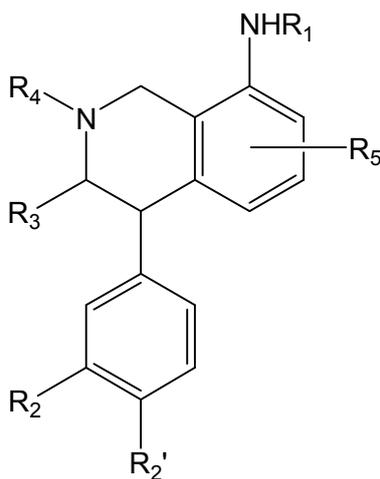
- en donde R<sub>1</sub> representa hidrógeno, un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o un grupo bencilo
- 25 R<sub>2</sub> representa hidrógeno, grupos metilo, cloro o flúor
- R<sub>2</sub>' representa hidrógeno, metilo, metoxi, hidroxilo o átomos de halógeno,
- R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan hidrógeno, un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>
- R<sub>5</sub> representa hidrógeno, cloro o grupo metoxi en la posición 5 o 6 y
- p es 2-6.
- 30 En una forma de realización particular, el derivado activado de un agente de selectividad es un compuesto (5) en donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son H y R<sub>4</sub> es metilo.



(3)

Según una forma de realización, los compuestos de fórmula (XVI) se pueden preparar mediante una secuencia que comprende:

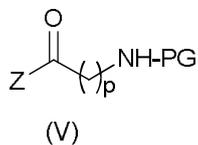
a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (XVII)



(XVII)

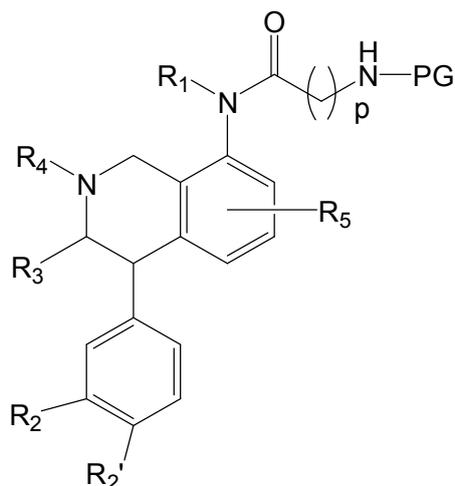
5

y un agente acilante de fórmula (V):



(V)

en donde p es como se ha definido anteriormente, Z es halógeno u OH y PG es un grupo protector amino para dar un compuesto de fórmula (XVIII)

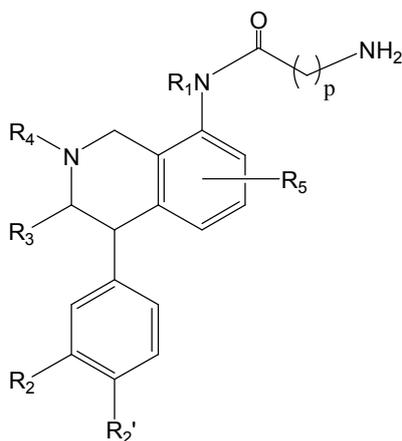


(XVIII)

5 Grupos protectores comúnmente usados para aminas incluyen carbamatos, tales como carbamatos de terc-butilo, bencilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 9H-fluorenilmetilo (Fmoc), alilo o nitrofenilo; amidas, tales como formamidas, acetamidas, trifluoroacetamidas, sulfonamidas, trifluorometanosulfonil amidas or terc-butilsulfonil amidas; y aril or arilaquilaminas, tales como p-metoxifenil, bencil, p-metoxibencil, 3,4-dimetoxibencil, dimetoxitritil o monometoxitritil aminas. En una forma de realización particular, el agente acilante de fórmula (V) es ácido 9H-fluorenilmetoxicarbonil-6-aminohexanoico.

10 Los compuestos de fórmula (XVII) se pueden preparar a su vez por ejemplo como se describe en US4185105. En particular, cuando el compuesto de fórmula (III) es nomifensina, se puede obtener del clorhidrato correspondiente (comercialmente disponible) por tratamiento con una base adecuada, incluyendo bases orgánicas o inorgánicas tales como carbonatos o hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos, amoniaco o aminas, tales como trimetilamina, trietilamina, diisopropiltilamina, piridina, piperidina, morfolina y similares.

b) desproteger el grupo protector amino en el compuesto de fórmula (XVIII) para dar un compuesto de fórmula (XIX):



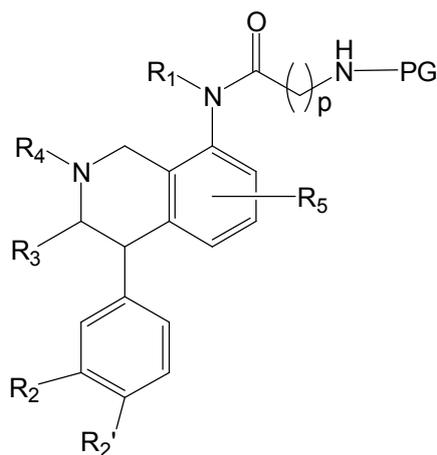
(XVI)

15

El experto en la materia conoce las condiciones adecuadas de desprotección, por ejemplo en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Wuts, P.G.M. y Greene T.W., 4 Ed. Wiley-Interscience) y en *Protecting Groups* (Kocienski P.J., 3 Ed. Georg Thieme Verlag). En una forma de realización particular, el grupo protector se elimina en presencia de una amina, tal como piperidina, morfolina, dicitclohexilamina, diisopropiltilamina o dimetilaminopiridina, preferiblemente en presencia de piperidina.

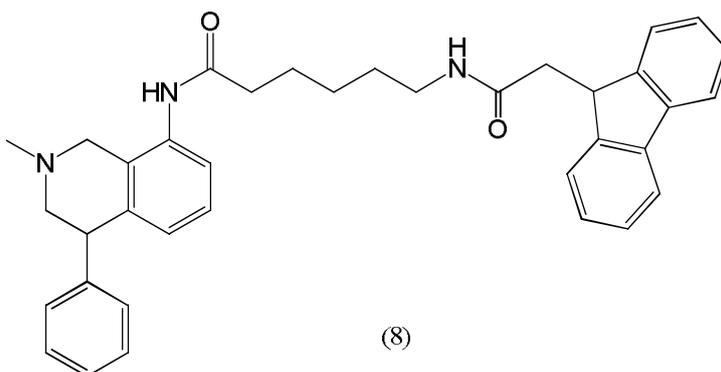
20

Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (XVIII),



(XVIII)

en donde R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup>, X, Y, W, p y PG son como se han definido previamente. En una forma de realización preferida, R<sup>1</sup> es metilo, R<sup>2</sup>-R<sup>5</sup> son hidrógeno, X e Y son cloro, W es hidrógeno, p es 5 y PG es 9H-fluorenilmetoxicarbonilo. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (XVIII) es el compuesto (8)



(8)

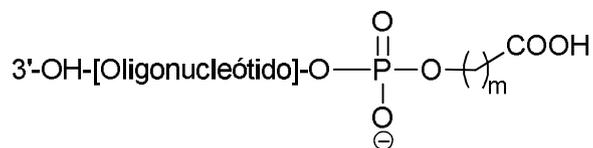
5

El ácido nucleico que se va a unir al agente de selectividad se forma mediante síntesis de fase sólida paso a paso en un soporte sólido siguiendo el método divulgado en "Oligonucleotide synthesis, a practical approach." editado por M.J. Gait. IRL Press-1985.

10

Para conjugar el ligando de selectividad, el oligonucleótido necesita estar carboxiderivado. Esto se puede hacer en el extremo 5' o en el 3'. En una forma de realización preferida el ligando de selectividad se une al extremo 5'.

Según una forma de realización, los conjugados de fórmula (XVI) se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (XIX) como se ha descrito anteriormente y un oligonucleótido amino-modificado de fórmula (XV):



(XV)

en donde m es de 2 a 6.

15

La activación del oligonucleótido usando un grupo carboxi se hace como se ha explicado anteriormente.

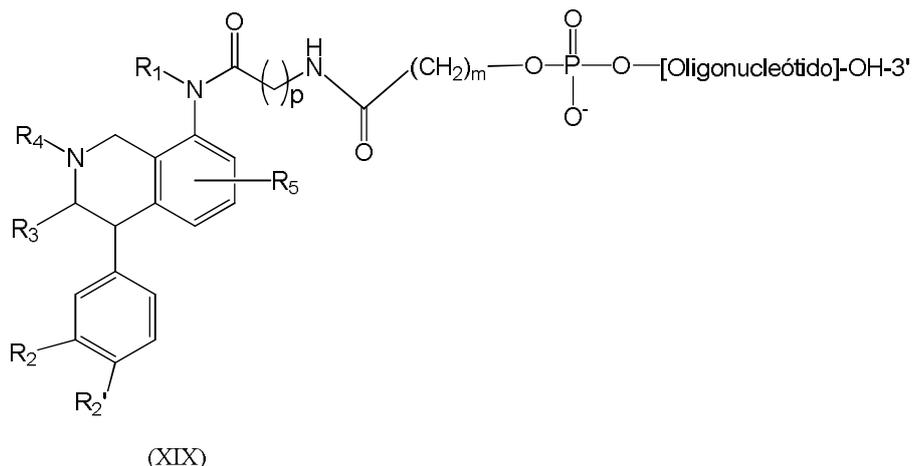
En una forma de realización preferida, el oligonucleótido que se va a acoplar a nomifensina o derivado de la misma se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un ácido nucleico que es complementario a alfa-sinucleína, preferiblemente un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 16-36;

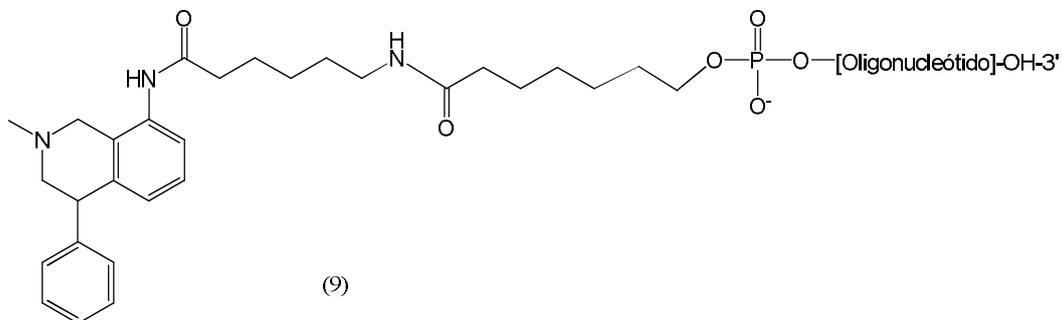
- (ii) un ácido nucleico que es complementario a BAX, preferiblemente un ácido nucleico que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 38;
- (iii) un ácido nucleico que es complementario a tau
- (iv) un ácido nucleico que es complementario a NET y

- 5 (v) un ácido nucleico que es complementario a huntingtina, preferiblemente un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 39-55.

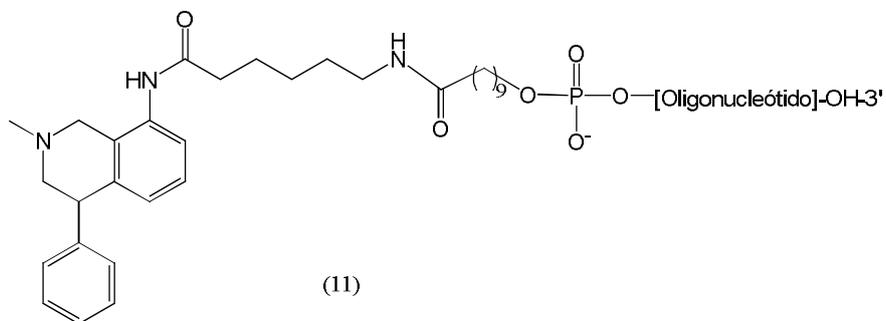
El oligonucleótido carboxil-activado se hace reaccionar después con el derivado activado de un agente de selectividad de fórmula (XVI) como se ha definido anteriormente lo que da un compuesto de estructura general:



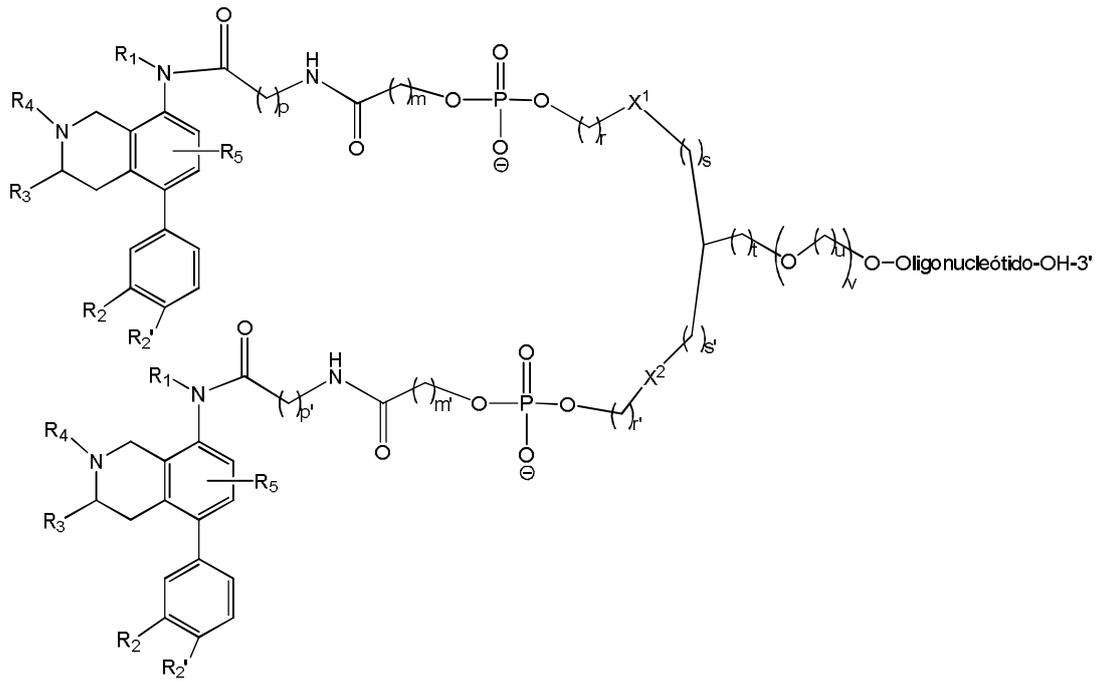
- 10 En una forma de realización preferida, el conjugado tiene la estructura



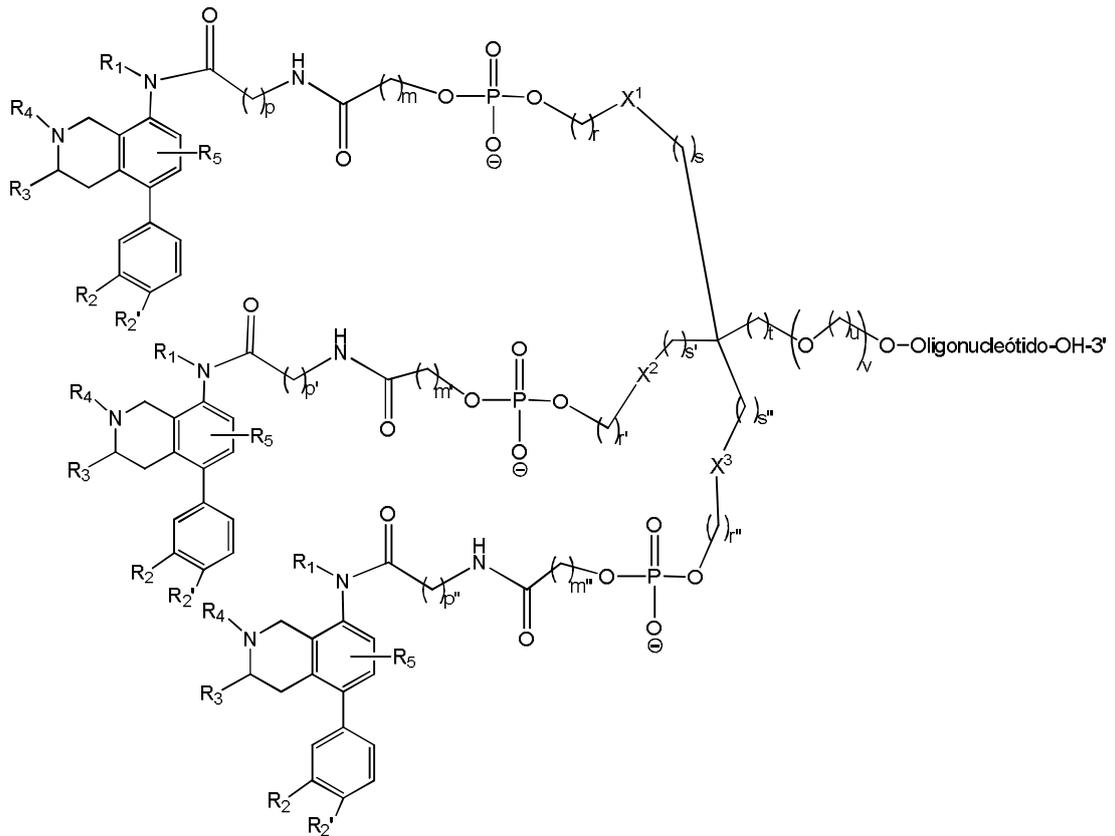
En otra forma de realización preferida, el conjugado tiene la estructura



- 15 En una forma de realización particular, el compuesto de fórmula (XVI) se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (XXVI) o (XXVII), para dar conjugados (XXX) y (XXXI), respectivamente:



(XXX)



(XXXI)

5 en donde

m, m', m'', p, p', p'', r, r', r'', s', s', s'', t, u, v, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup> y R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup> son como se ha descrito previamente.

Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXX) como se define anteriormente.

Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXX) en donde el agente de selectividad es nomifensina, p y p' son 5, m y m' son 6, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0, X y X' representan C(O)NH. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXVIII) en donde el agente de selectividad es nomifensina, p y p' son 5, m y m' son 6, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X y X' representan CH<sub>2</sub>.

5

Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXX) en donde el agente de selectividad es nomifensina, p y p' son 5, m y m' son 9, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0, X y X' representan C(O)NH. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXVIII) en donde el agente de selectividad es nomifensina, p y p' son 5, m y m' son 9, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X y X' representan CH<sub>2</sub>.

10

Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXXI) como se define anteriormente.

Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXXI) en donde el agente de selectividad es nomifensina, p, p' y p'' son 5, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X, X' y X'' representan O. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXXI) en donde el agente de selectividad es nomifensina, p, p' y p'' son 5, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X, X' y X'' representan O. Una forma de realización particular se dirige a un compuesto de fórmula (XXXI) en donde el agente de selectividad es nomifensina, p, p' y p'' son 5, m, m' y m'' son 9, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X, X' y X'' representan O. Otra forma de realización se refiere a un compuesto de fórmula (XXXI) en donde el agente de selectividad es nomifensina, p, p' y p'' son 5, m, m' y m'' son 9, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X, X' y X'' representan O.

15

20

iv. Síntesis de un oligonucleótido doble derivado usando un ácido nucleico carboxil-derivado, un enlazador bifuncional, nomifensina aminoderivada y sertralina aminoderivada

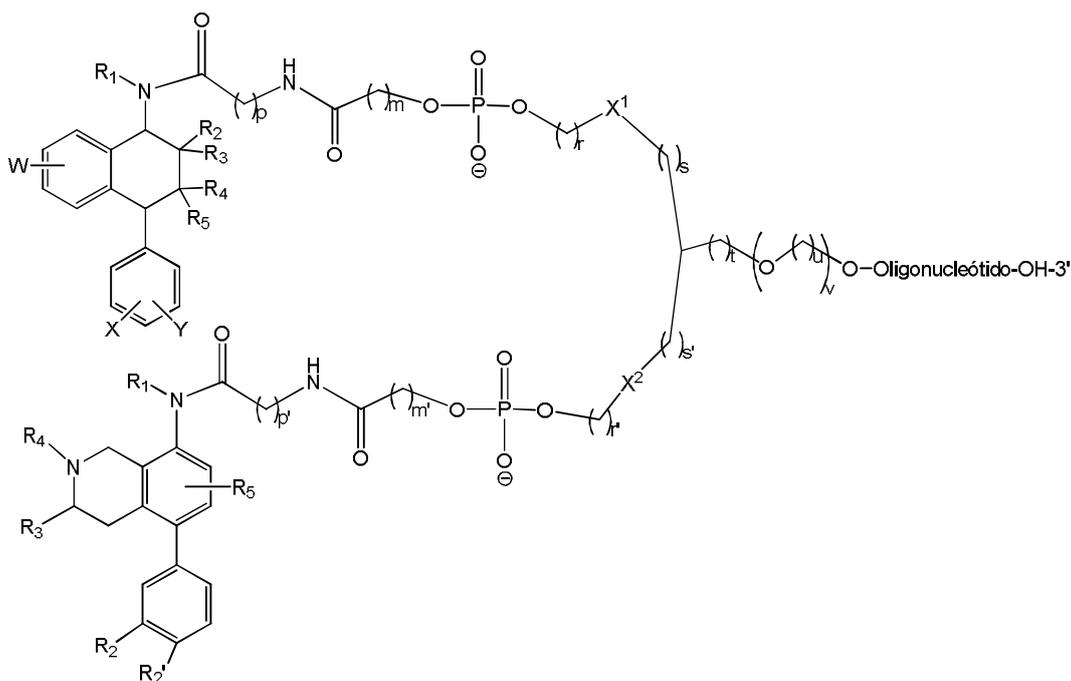
Los grupos protectores de hidroxilo PG, PG' y PG'' en los compuestos de fórmula (XX) y (XXI) pueden ser similares o diferentes.

25

En una forma de realización particular, PG y PG' en el compuesto de fórmula (XX) son diferentes, de modo que se pueden desproteger independientemente y el compuesto de fórmula (XX) se puede acoplar si se desea con dos agentes de selectividad activados diferentes.

En una forma de realización particular, un compuesto de fórmula (XX) en donde PG y PG' son diferentes, se hace reaccionar secuencialmente con un modificador de carboxi y después con un compuesto de fórmula (VII) mientras que la otra posición de acoplamiento se hace reaccionar con un modificador de carboxi y después con un compuesto de fórmula (XVI), para dar un conjugado de fórmula (XXXII)

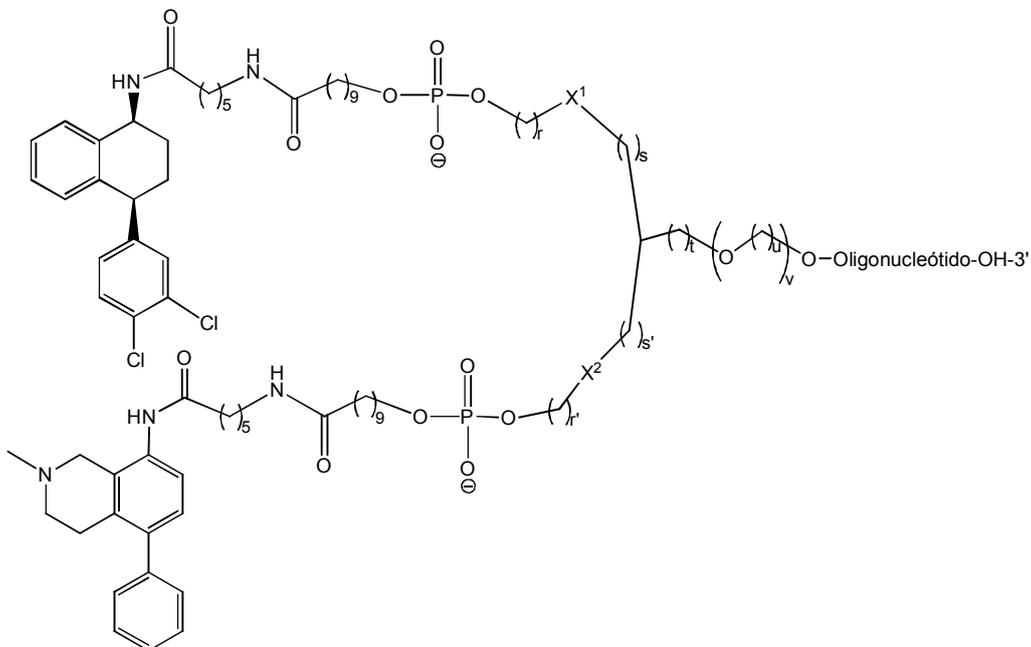
30



(XXXII)

en donde m, m', p, p', r, r', s, s', t, u, v, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup>, X, Y y Z son como se ha descrito previamente.

5 En una forma de realización preferida, el compuesto de fórmula (XX) en donde PG y PG' son diferentes, se hace reaccionar secuencialmente con un modificador de carboxi y después con un compuesto de fórmula (10) mientras que la otra posición de acoplamiento se hace reaccionar con un modificador de carboxi y después con un compuesto de fórmula (11), para dar un conjugado de fórmula (XXXIIa)

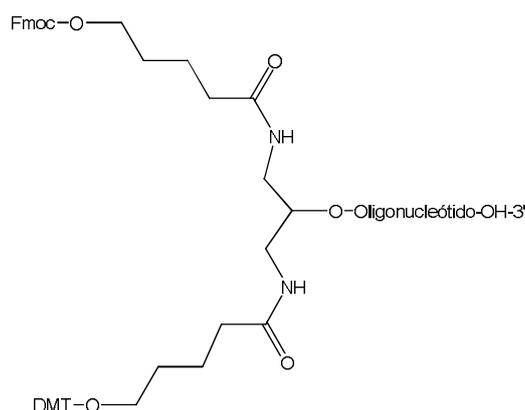


(XXXIIa)

en donde r, r', s, s', t, u, v, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son como se ha descrito previamente.

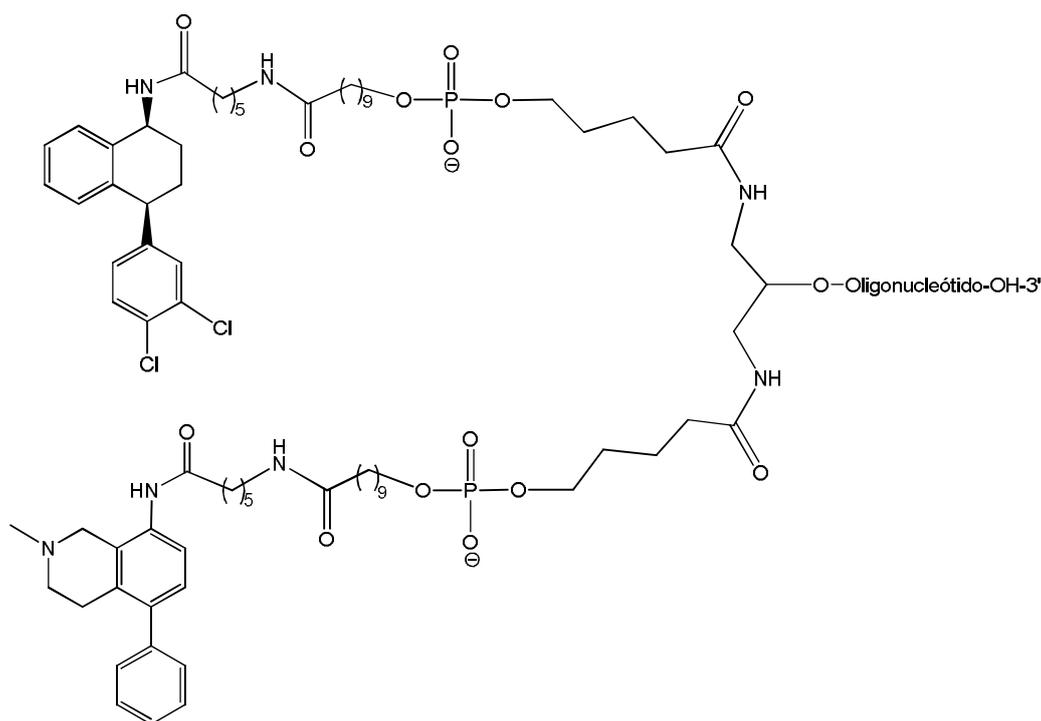
10 En una forma de realización particular, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0 y X y X' representan C(O)NH en los compuestos de fórmula (XXXII) o (XXXIIa).

En una forma de realización particular de la invención, el compuesto de fórmula (XX) en donde PG y PG' son diferentes, es un compuesto de fórmula (XXa)



(XXa)

15 En una forma de realización preferida, el compuesto de fórmula (XXXIIa) tiene la siguiente fórmula



(12)

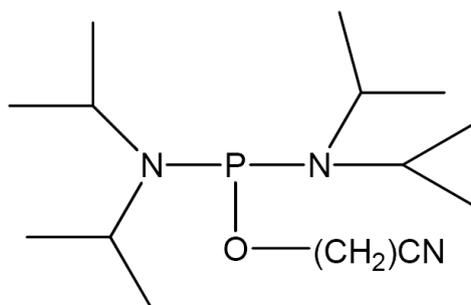
En una forma de realización particular, la invención se dirige a un compuesto de fórmula (XXXII) y (XXXIIa) en donde m, m', p, p', r, r', s, s', t, u, v, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup>, X, Y y Z son como se ha descrito previamente.

- 5 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al compuesto (12) como se define anteriormente.

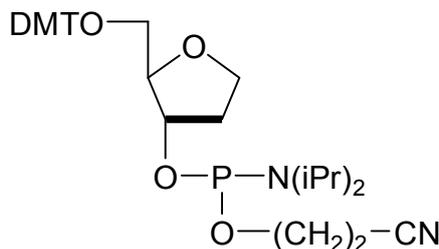
E.2. Síntesis de conjugados que comprenden un ácido nucleico y un grupo protector unido al extremo 5'

La síntesis empieza añadiendo el grupo protector a la primera hebra. En donde el grupo protector está formado por una pluralidad de grupos, los diferentes grupos que forman parte de los grupos protectores se añaden al ácido nucleico usando un planteamiento similar al usado cuando se añaden nucleótidos a un ácido nucleico preexistente, es decir, los grupos a ser añadidos primero se activan para aumentar la reactividad de los grupos hidroxilo libres. Los reactivos adecuados incluyen, sin limitación, un compuesto fosforotioato, un compuesto carbamato, un compuesto metil-fosfonato, un compuesto de guanidinio, un compuesto sulfamato, un compuesto sulfamida, un compuesto formacetal, un compuesto tioformacetal, un compuesto sulfona, un compuesto fosforamidato. En una forma de realización preferida, los grupos del grupo protector se activan con un compuesto fosforamidita y mezclas del mismo.

- 15 Los fosforamidatos típicos adecuados para la activación de grupos OH libres son, por ejemplo, (2-cianoetil)-N,N,N',N'-tetra-diisopropilfosforodiamidita de fórmula:



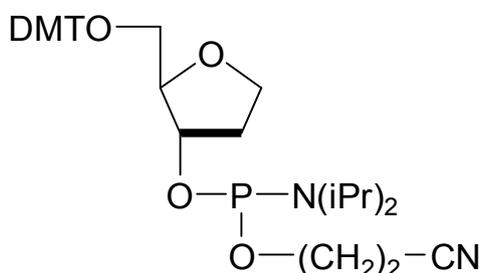
- 20 y (2-cianoetil)-N-diisopropil, N'-alquilaminofosforamidita de fórmula:



en donde n es de 6 a 12.

Una reacción típica implica los siguientes pasos:

- 5 A) Se hace reaccionar una unidad furanosa (la estequiometría adecuada será evidente para el experto en la materia) con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr-Cl) en condiciones que favorecen la reacción solo en posiciones de grupos hidroxilo primarios. Después, los grupos hidroxilo restantes se hacen reaccionar con un grupo protector de acetilación o benzoilación. Típicamente, la furanosa activada tiene la estructura:



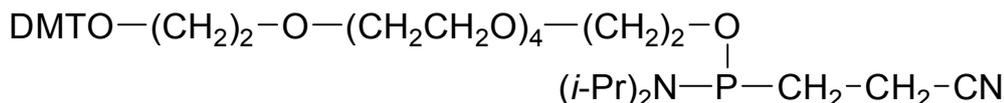
- 10 B) Se forma una hebra de un ARNip (que puede ser la hebra sentido (s) o la hebra antisentido (a)) de interés mediante síntesis en fase sólida paso a paso en un soporte sólido, donde el grupo 5'-OH de la subunidad terminal en la hebra en crecimiento, que normalmente está protegido por dimetoxitritilo (DMT), se coloca en condiciones ácidas para eliminar el grupo protector DMT del 5'-OH, mientras que las bases de purina y pirimidina se mantienen protegidas con (fluoren-9-il)metoxicarbonilo (Fmoc). Otros grupos protectores adecuados son compuestos que tienen un anillo de morfolina de 6 miembros unido a un compuesto fosforamidato, compuestos fosforotioato y grupos O-metil(oxometilo) y O-etil(oxoetilo).
- 15

C) El grupo 5'-OH desprotegido de la hebra de ARNip se hace reaccionar con la furanosa reactiva del paso A), obteniéndose así un oligonucleótido primario conjugado. Por último, se elimina el grupo protector DMT del hidroxilo primario de la furanosa en condiciones ácidas dejando un grupo 5'-OH.

- 20 D) Se forma un monómero de alquilenglicol enlazador reactivo de C<sub>18</sub> miembros (de aquí en adelante C<sub>18</sub>) que tiene 6 monómeros de etilenglicol (12 átomos de carbono y 6 átomos de oxígeno) añadiendo a un grupo OH terminal en condiciones fosfitilantes un compuesto de fosforamidita, tal como el (2-cianoetil)-N,N'-diisopropilfosforamidita descrito anteriormente.

25 Los compuestos de fosforamidita son especialmente útiles para la generación de enlaces fosfodiéster como los presentes en el esqueleto del polinucleótido u oligonucleótido. Otros compuestos adecuados para hacer reactivo el polietilenglicol son compuestos que tienen un anillo de morfolina de 6 miembros unido a un compuesto de fosforamidato, compuestos fosforotioato y grupos O-metil(oxometilo) y O-etil(oxoetilo).

Típicamente, el monómero de alquilenglicol (C<sub>18</sub>) reactivo que tiene 6 monómeros de etilenglicol tiene la estructura



- 30 E) El grupo 5'-OH desprotegido de furanosa-hebra de ARNip se hace reaccionar con el monómero de alquilenglicol (C<sub>18</sub>) reactivo del paso D), obteniéndose así un oligonucleótido secundario conjugado que tiene la fórmula:

DMT-alquilenglicol (C<sub>18</sub>)-fosfodiéster-furanosa-fosfodiéster-hebra de ARN.

F) El grupo protector DMT del hidroxilo primario del alquilenglicol (C<sub>18</sub>) se elimina en condiciones ácidas dejando un grupo 5'-OH.

G) El grupo 5'-OH desprotegido de alquilenglicol (C<sub>18</sub>)-fosfodiéster-furanosa-fosfodiéster-hebra de ARN se hace reaccionar con un segundo monómero de (C<sub>18</sub>) alquilenglicol reactivo como en el paso D), obteniéndose así un tercer oligonucleótido conjugado que tiene la fórmula

DMT-alquilenglicol (C<sub>18</sub>)-fosfodiéster-alquilenglicol (C<sub>18</sub>)-fosfodiéster-furanosa-fosfodiéster- hebra de ARN.

- 5 H) El grupo protector DMT del hidroxilo primario del alquilenglicol (C<sub>18</sub>) final se elimina en condiciones ácidas dejando un grupo 5'-OH para manipulaciones adicionales.

10 Cuando el grupo protector contiene un grupo lipídico, el método para obtener la construcción de oligonucleótido según la invención incluye un paso adicional entre los pasos H) e I), en donde se une un grupo lipídico, preferiblemente en forma de un éster, amina, tiol o ácido activo de un ácido graso al grupo terminal (la furanosa o el alquilenglicol C<sub>18</sub>, según sea el caso). El experto en la materia puede elegir las condiciones, reactivos, etc. apropiados para llevar a cabo dicho paso, dependiendo de la naturaleza del lípido y dicho grupo. Las condiciones preferidas consisten en la derivación de ácidos grasos con química de fosforamidita para crear una molécula activada que se puede condensar mediante un enlace fosfodiéster a la construcción de oligonucleótido mediante el 5'-OH o 3'-OH terminal libre.

15 E.3. Síntesis del ARNip hibridando el conjugado que comprende un primer ácido nucleico y un grupo protector unido al extremo 5' y un conjugado que comprende la hebra complementaria de ácido nucleico y un ISRS unido al 5'

20 La hebra complementaria del ARNip conjugado al ISRS obtenido como se describe anteriormente en E.1. se hibrida con la hebra modificada de ARNip obtenida como se define en E.2. Para este fin todos los grupos protectores restantes en las hebras de ARN se eliminan previamente como sigue. Se añadieron 500 µl de una mezcla que contiene el 20% v/v de metilamina (solución acuosa al 40%) y el 80% v/v de una solución saturada de amoníaco, 30 (que contiene el 30-32% peso/volumen de NH<sub>3</sub>) a un tubo Eppendorf con el ARNip (escala 200 nmoles). El tubo se cerró herméticamente y se calentó durante 45 minutos a una temperatura de 65°C. Este procedimiento elimina los grupos protectores en el átomo de fósforo de los nucleótidos (acetilación o benzoilación de la furanosa y la 2-cianometilación de los enlaces fosfodiéster) y los grupos protectores de los grupos amino exocíclicos (FMOC). La mezcla se enfrió después y se filtró y el sobrenadante se secó. El precipitado residual se hizo reaccionar con trietilamina-HF 1 M durante 3 horas a 65°C para cortar los grupos protectores en 2' de los nucleótidos (2'-t-butil dimetil sililo - TBDMS). Por último, la solución resultante se desaló en una columna de Sephadex.

25 Las condiciones de hibridación de ácido nucleico adecuadas para la formación de tales estructuras bicatenarias se describen por Joseph Sambrook, *et al.*, (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001) y Haymes, B. D., *et al.* (Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C., 1985).

30 La eficacia de las construcciones de oligonucleótidos de la presente invención se ejemplifica posteriormente. El ejemplo 2 demuestra que las secuencias oligonucleotídicas de ARNip de la invención, con un furanosa y dos alquilenglicol C<sub>18</sub> unidas a una hebra del ARNip y una molécula de sertralina unida a la otra hebra a través de un brazo enlazador, bloquearon la expresión del 5-HT<sub>1A</sub>R presináptico diana en un mayor grado que el ARNip correspondiente en su forma desnuda.

35 *F. Conjugados diagnósticos y usos de los mismos*

La posibilidad de distribuir específicamente los compuestos terapéuticos a una célula diana usando agentes de selectividad capaces de unirse con alta afinidad a transportadores de neurotransmisores también se puede aplicar a la distribución de compuestos que se pueden usar para fines diagnósticos. De esta manera, en otra forma de realización, también se divulgan conjugados que comprenden un

- (i) al menos un agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor y
- (ii) un agente de diagnóstico por imágenes.

45 Los términos "agente de selectividad" y "transportador de neurotransmisor" se han descrito en detalle anteriormente y se pueden entender igualmente para los conjugados diagnósticos divulgados aquí.

50 Los términos "agente de diagnóstico por imágenes" y "agente de contraste", se usan aquí de forma intercambiable y se refiere a un compuesto biocompatible cuyo uso facilita la diferenciación de diferentes partes de la imagen aumentando el "contraste" entre esas regiones diferentes de la imagen. El término "agentes de contraste" abarca así agentes que se usan para aumentar la calidad de una imagen que puede generarse no obstante en ausencia de tal agente (como es el caso, por ejemplo, en RM), así como agentes que son prerequisites para la generación de una imagen (como es el caso, por ejemplo, en gammagrafía). Los agentes de contraste adecuados incluyen, sin limitación, agentes de contraste para gammagrafía, para tomografía computerizada, para espectroscopia Raman, para diagnóstico por imágenes de resonancia magnética (RM) y para diagnóstico por imágenes ópticas.

Los agentes de contraste para gammagrafía incluyen radiofármacos que se marcan normalmente con emisores de positrones tales como  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{62}\text{Cu}$  y  $^{68}\text{Ga}$ . Los radiofármacos de SPECT normalmente se marcan con emisores de positrones tales como  $^{94}\text{mTc}$ ,  $^{201}\text{Tl}$  y  $^{67}\text{Ga}$ . Las modalidades de gammagrafía (tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computerizada de emisión de fotón único (SPECT)) son técnicas de diagnóstico por imágenes de secciones transversales que mapean la localización y concentración de radiotrazadores marcados con radionúclidos. Se pueden usar PET y SPECT para localizar y caracterizar un radionúclido midiendo la actividad metabólica. PET y SPECT proporcionan información que está relacionada con información al nivel celular tal como viabilidad celular. En PET, un paciente ingiere o se le inyecta una sustancia ligeramente radioactiva que emite positrones, que se puede seguir según la sustancia se mueve a través del cuerpo. En una aplicación común, por ejemplo, a los pacientes se les da glucosa con emisores de positrones unidos, y se controlan sus cerebros según realizan varias tareas. Puesto que el cerebro usa glucosa cuando funciona, una imagen PET muestra dónde la actividad cerebral es alta. También se divulgan métodos en donde se marca una célula *ex vivo* para diagnóstico por imagen de PET o SPECT *in vivo*. Muy relacionado con PET es la tomografía computerizada de emisión de fotón único o SPECT. La diferencia principal entre las dos es que en lugar de una sustancia emisora de positrones, SPECT usa un trazador radioactivo que emite fotones de baja energía.

Los agentes de contraste para imágenes de TAC incluyen, por ejemplo, medios de contraste yodados o bromados. Los ejemplos de estos agentes incluyen yotalamato, yohexilo, diatrizoato, yopamidol, etiodol y yopanoato. También se han descrito agentes de gadolinio para su uso como agentes de contraste de TAC (véase, por ejemplo, Henson *et al.*, 2004). Por ejemplo, se han usado como agentes de contraste de TAC agentes de gadopentato (discutido en Strunk y Schild, 2004). Se contempla la tomografía computerizada (TAC) como una modalidad de diagnóstico por imágenes en el contexto de la presente invención. Tomando una serie de rayos X, algunas veces más de mil, desde varios ángulos y después combinándolas con un ordenador, TAC hace posible construir una imagen tridimensional de cualquier parte del cuerpo. Se programa un ordenador para que muestre secciones bidimensionales desde cualquier ángulo y a cualquier profundidad. En TAC, la inyección intravenosa de un agente de contraste radioopaco tal como los descritos aquí puede ayudar en la identificación y delineación de masas de tejido blando cuando los escáneres iniciales de TAC no son diagnósticos.

Los agentes de contraste para imágenes ópticas incluyen, por ejemplo, fluoresceína, un derivado de fluoresceína, verde indocianina, verde Oregón, un derivado de verde Oregón, verde rodamina, un derivado de verde rodamina, una eosina, una eritrosina, rojo Texas, un derivado de rojo Texas, verde malaquita, éster sulfosuccinimidílico de nanooro, azul cascada, un derivado de cumarina, un naftaleno, un derivado de piridiloxazol, colorante amarillo cascada, colorante dapoxilo y varios otros compuestos fluorescentes divulgados aquí.

El agente de contraste es un compuesto que es capaz de ser transformado en imagen por un aparato de resonancia magnética. Los agentes de contraste que pueden ser transformados en imagen por un aparato de resonancia magnética se diferencian de los usados en otras técnicas de diagnóstico por imagen. Su propósito es ayudar a distinguir entre componentes tisulares con características de señal idénticas y acortar los tiempos de relajación (que producirá una señal más fuerte en las imágenes de RM de eco del espín potenciada en T1 y una señal menos intensa en imágenes potenciadas en T2). Los ejemplos de agentes de contraste para RM incluyen quelatos de gadolinio, quelatos de manganeso, quelatos de cromo y partículas de hierro. En otra forma de realización particular el agente de contraste de RM es  $^{19}\text{F}$ . Tanto TAC como RM proporcionan información anatómica que ayuda a distinguir límites de tejidos. Comparada con TAC, las desventajas de la RM incluyen tolerancia menor de los pacientes, contraindicaciones en marcapasos y algunos otros dispositivos metálicos implantados, y artefactos relaciones con múltiples causas, no siendo la menor el movimiento. TAC, por otro lado, es rápida, bien tolerada y fácilmente disponible pero tiene menor resolución de contraste que la RM y requiere contraste yodado y radiación ionizante. Una desventaja tanto de TAC como de RM es que ninguna modalidad de imágenes proporciona información funcional al nivel celular. Por ejemplo, ninguna modalidad proporciona información respecto a la viabilidad celular. El diagnóstico por imágenes de resonancia magnética (RM) es una modalidad de diagnóstico por imágenes que es más nueva que TAC y usa un imán de alta potencia y señales de radiofrecuencia para producir imágenes. La especie molecular más abundante en los tejidos biológicos es agua. Es el "espín" mecánico cuántico de los núcleos de protones del agua el que por último da lugar a la señal en experimentos de imágenes. En RM, la muestra que se va a transformar en imágenes se coloca en un campo magnético estático fuerte (1-2 Tesla) y los espines se excitan con un pulso de radiación de radiofrecuencia (RF) para producir una magnetización neta en la muestra. Varios gradientes de campo magnético y otros pulsos de RF actúan en los espines para codificar información espacial en las señales registradas. Recogiendo y analizando estas señales, es posible calcular una imagen tridimensional que, como la imagen de TAC, normalmente se muestra en secciones bidimensionales.

Los agentes de contraste de RM incluyen complejos de metales seleccionados del grupo que consiste en cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), yterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III). En una forma de realización preferida, el compuesto que se puede transformar en imagen por un aparato de resonancia magnética es un compuesto basado en gadolinio.

El término "compuesto basado en gadolinio", como se usa aquí, significa, donde se usa con respecto a diagnóstico por imágenes, cualquier sustancia que contiene gadolinio administrable a un sujeto que produce un aumento intravascular.

En otra forma de realización, el agente de contraste que contiene gadolinio se selecciona del grupo que consiste en gadolinio, pentato de gadolinio y gadodiamida.

5 La cantidad de agente de contraste que contiene gadolinio a ser administrada varía en una cantidad de alrededor de 10 mg por kg de peso corporal. En otra forma de realización, la segunda imagen de resonancia magnética se adquiere alrededor de 45 minutos después de administrar el agente de contraste que contiene gadolinio. También se divulga el método descrito anteriormente que comprende además el paso de administrar por vía intraperitoneal una solución salina (por ejemplo, solución de Ringer) al sujeto, administración que sigue al paso (c) o al paso (d).

También se divulga el uso de un conjugado definido anteriormente como agente diagnóstico y métodos para la detección de células que expresan el transportador del neurotransmisor en su superficie.

10 Dependiendo del tipo de célula de la que se tiene que hacer la imagen, los conjugados incorporarán uno o más agentes de selectividad. La siguiente tabla describe los agentes de selectividad que se pueden usar dependiendo del tipo de célula del que se deben obtener imágenes.

Transportador de neurotransmisor expresado	Agente de selectividad
SERT	IRSI (sertralina)
DAT, SERT o NET	IRSDN (Triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)
DAT, SERT o NET	DAT, SERT o NET IRSDN (Triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)
DAT, SERT o NET	IRSDN (Triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)
NET	NRI (Reboxetine)
NET	NRI (Reboxetine), SDNRI, DNRI
DAT, SERT o NET	IRSDN (Triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)
DAT, SERT o NET	IRSDN (Triple bloqueador) o IRDN (Nomifensina)

15 También se divulgan métodos de diagnóstico por imágenes multimodales. También se divulgan métodos de diagnóstico por imágenes a un sujeto o sitio en un sujeto usando múltiples modalidades de diagnóstico por imagen que implican medir señales múltiples. Las señales múltiples provienen de un único marcador sobre o en una célula. Como se ha explicado anteriormente, se puede aplicar cualquier modalidad de diagnóstico por imagen que conozca el experto en la materia en estas formas de realización de los presentes métodos de diagnóstico por imagen.

20 Las modalidades de diagnóstico por imagen se realizan a cualquier tiempo durante o después de la administración de la composición marcada, por ejemplo, célula marcada. Por ejemplo, los estudios por imágenes se pueden realizar durante la administración de la célula marcada, es decir, para ayudar a guiar la distribución a una localización específica, o a cualquier tiempo después.

25 Se pueden realizar modalidades de diagnóstico por imagen adicionales de forma concurrente con la primera modalidad de diagnóstico por imagen, o a cualquier tiempo después de la primera modalidad de diagnóstico por imagen. Por ejemplo, se pueden realizar modalidades de diagnóstico por imagen adicionales alrededor de 1 segundo, alrededor de 1 hora, alrededor de 1 día, o cualquier periodo más largo después de terminar la primera modalidad de diagnóstico por imagen, o a cualquier tiempo entre cualquiera de estos tiempos consignados. También se divulgan métodos donde se realizan múltiples modalidades de diagnóstico por imagen concurrentemente de modo que empiezan al mismo tiempo

después de la administración de la célula o agente marcado. El experto en la materia estará familiarizado con la realización de las varias modalidades de diagnóstico por imagen divulgadas aquí.

5 También se divulgan métodos por imágenes en donde se usa el mismo dispositivo de imágenes para realizar una primera modalidad de diagnóstico por imagen y una segunda modalidad de diagnóstico por imagen. En otras formas de realización, se usan diferentes dispositivos de diagnóstico por imagen para realizar las diferentes modalidades de diagnóstico por imagen. El experto en la materia estará familiarizado con los dispositivos de diagnóstico por imagen disponibles para realizar las modalidades de diagnóstico por la imagen descritas aquí.

10 También se divulgan métodos para imágenes de células usando una o más modalidades de imágenes. En algunas formas de realización las células se marcan con múltiples agentes de diagnóstico por imagen y en otros aspectos las células se marcan con un único agente de marcaje. El agente de marcaje único puede ser un agente detectable de multimodo.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

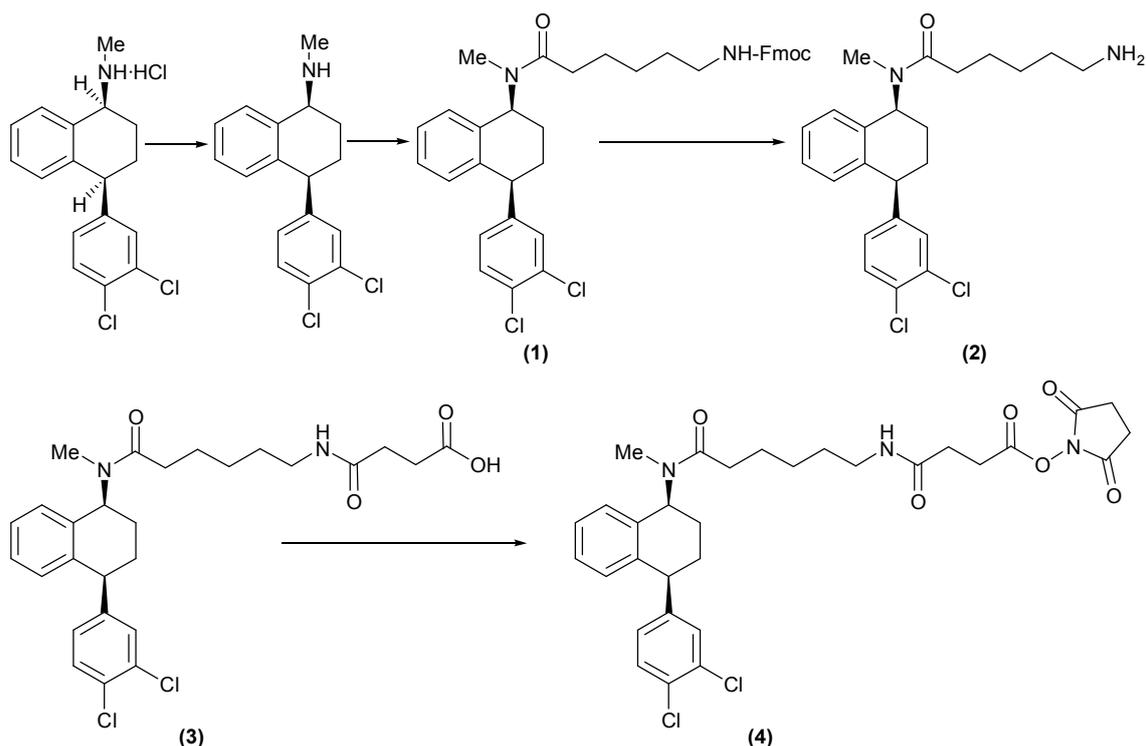
#### EJEMPLOS

#### 15 EJEMPLO 1

##### Síntesis del conjugado de la invención que comprende sertralina y un oligonucleótido

##### *Síntesis de sertralina activada (4)*

Se preparó sertralina activada como se muestra en el siguiente esquema.



#### 20 A.1. Síntesis del compuesto (1)

Se agitó una mezcla de clorhidrato de sertralina (comercialmente disponible, 34 mg), ácido 9H-fluorenilmetoxicarbonil-6-amino-hexanoico (Fmoc-ACA, 49 mg), DMF (2 ml), N-metil-morfolina (22  $\mu$ l) y tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU, 68 mg) a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se siguió por TLC (CH<sub>3</sub>OH al 10%/CHCl<sub>3</sub>). La mezcla se evaporó para producir un aceite espeso que se lavó adicionalmente con 3x5 ml de Pet-éter. Se añadieron 2 ml de agua al compuesto oleaginoso, el precipitado resultante se lavó con 2x10 ml de agua de nuevo. El precipitado se disolvió con 20 ml de cloruro de metileno (DCM) y se desarrolló con 20 ml de solución de NaCl, después se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La solución se evaporó a sequedad y después se secó en una bomba mecánica para dar un sólido (129 mg de producto crudo). EL producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con metanol al 1%/DCM, al 2%, después al 5%. Las fracciones se combinaron y se evaporaron a sequedad. El producto se secó al vacío durante 6 horas para dar 90 mg del compuesto (1) puro.

## A.2. Síntesis del compuesto (2)

Se disolvió el compuesto (1) (90 mg) en 3 ml de piperidina al 20% en DCM durante 1 hora. La reacción se siguió por TLC (metanol al 10%/CHCl<sub>3</sub>). La mezcla se evaporó para dar un aceite que se lavó 3x10 ml con Per-éter. El compuesto crudo resultante (54 mg) era lo suficiente puro para la siguiente reacción sin purificación adicional.

## 5 A.3. Síntesis del compuesto (3)

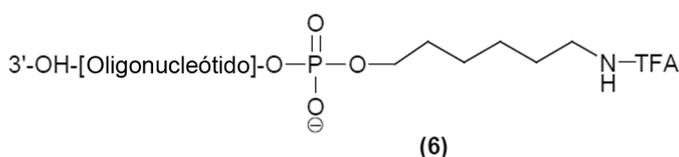
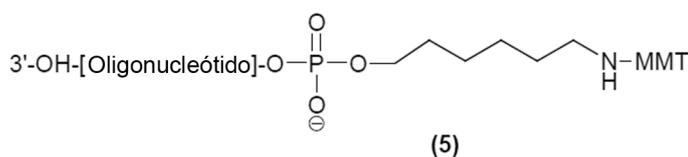
Se agitó una mezcla del compuesto (2) (54 mg), piridina (3 ml), anhídrido succínico (16 mg) y N,N-dimetilaminopiridina (DMAP, 18 mg) a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se siguió por TLC (DCM:metanol:ácido acético=85:10:5). Se añadieron 10 ml de agua a la reacción. La mezcla de reacción se concentró a goma, después se resuspendió en 10 ml de DCM. La fase orgánica se lavó 2x10 ml con una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 5%, 10 ml de solución de ácido cítrico al 5% y 10 ml de solución de salmuera. La solución se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó para dar el compuesto (3) como una espuma blanca (46 mg).

## A.4. Síntesis del compuesto (4)

Se agitó una mezcla del compuesto (3) (46 mg), hidroxisuccinimida (13 mg), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 60 µl) y DCM (4 ml) a temperatura ambiente durante la noche y se siguió por TLC (metanol al 10%/CHCl<sub>3</sub>). La solución se evaporó a sequedad para dar 150 mg de sólido crudo. El compuesto crudo se purificó mediante TLC preparativa (espesor de 2 mm, 20X20 cm), la TLC se desarrolló con metanol al 7%/CHCl<sub>3</sub> que contenía ácido acético al 1%. Se cortó la banda adecuada y se colocó en un embudo de filtración. Después de eluir con metanol al 15%/CHCl<sub>3</sub>, la solución se evaporó a sequedad para dar 35 mg del compuesto (4) (HPLC puro al 98%).

## B. Síntesis de los oligonucleótidos aminomodificados (5) y (6)

20 La síntesis se realizó en un sintetizador automatizado, usando enlazadores amino comercialmente disponibles 6-(4-monometoxitritilamino)hexil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (5'-MMT-C6-aminomodificador-CEP) y 6-(trifluoroacetilamino)hexil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (5'-TFA-C6-aminomodificador-CEP), respectivamente.



25 Se siguieron los pasos siguientes:

1. Se disolvieron los amino-enlazadores-CEP en acetonitrilo anhídrido (100 µM en 1 ml) en una atmósfera inerte (argón o nitrógeno). La solución se colocó en un depósito limpio extra (posición 5-9 en el sintetizador Expedite 8900 o puerto sobrante en cualquier otro sintetizador). La línea se cebó manualmente durante unos pocos segundos o usando el programa de cebado de modo que el tubo de distribución se llenara con este reactivo.
- 30 2. Se escribió la secuencia deseada; el extremo 5' tenía la posición de base sobrante (5-9) de modo que el reactivo modificador se incorporó en el último paso de la síntesis por el instrumento.
3. Se verificó la secuencia, teniendo la opción DMT para el programa de síntesis ya que el oligonucleótido necesita purificación por HPLC.
4. Se inició la síntesis usando un programa de acoplamiento de escala apropiada (0,2-1,0 µM) en el instrumento.
- 35 5. Al final de la síntesis, la columna se separó del instrumento y el soporte se lavó con etanol (3 x 1 ml) usando una jeringuilla para eliminar el ácido (de los pasos de destritolación) y yodo (de los pasos de oxidación) residuales.

## C. Desprotección y eliminación de oligonucleótidos de los soportes

Se realizaron los siguientes pasos:

1. El soporte seco del paso previo se transfirió a un vial con tapa de rosca (1,5-2 ml).

2. Se añadieron 500 µL (escala 0,2 µM) de una solución concentrada de NH<sub>4</sub>OH (30%).
3. La tapa se cerró herméticamente y la suspensión se incubó a 55°C durante al menos 8 horas hasta toda la noche (se debe dar un tiempo mayor para secuencias ricas en G).
4. El sobrenadante se enfrió a 0°C y se transfirió a otro tubo de microcentrifuga.
5. El soporte se enjuagó con la misma cantidad de agua destilada y este lavado se añadió al sobrenadante de amoniaco. La solución de amoniaco resultante contenía el oligonucleótido de longitud total con un grupo aminohexilo libre en el extremo 5' (en el caso de N-TFA-aminohexil fosforamidita incorporado) u oligonucleótido unido a aminohexilo protegido junto con material no nucleosídico y secuencias cortas.

La purificación de los oligonucleótidos con enlazadores aminohexilo libres se pudo lograr mediante HPLC de intercambio aniónico, precipitación con etanol o electroforesis en gel de acrilamida (PAGE).

#### *D. Incorporación de la sertralina activada en la amina primaria libre*

El marcaje de los oligonucleótidos unidos a amino en el extremo 5' obtenidos en los pasos B y C con derivados de éster de hidroxisuccinimida obtenidos en el paso A se llevó a cabo en fase en solución según el siguiente procedimiento:

#### A.- Incorporación de marcador.

1. El oligonucleótido unido a amino parcial o totalmente purificado del paso previo (20-25 UDO A260 ~700 µg) se disolvió en 250 µL de una mezcla de NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0 M (pH 9,0). Se comprobó el pH de la solución resultante para estar seguro de que era básico.
2. Se añadieron 500 µL de una solución del derivado activado de la fase A (5-6 mg) en una mezcla de tampón NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0 M pH=9,0:DMF:agua (5:2:3 v/v).
3. La mezcla se agitó bien y el tubo Eppendorf se envolvió con papel de aluminio para prevenir la exposición a la luz.
4. Después de 20 horas de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se extinguió con una solución de TEEA 1 M.

#### B.- Eliminación del exceso de marcador usando una columna de Sephadex G-25

1. Se aplicó la muestra del derivado activado a la columna.
2. La columna se eluyó con agua y se recogieron fracciones de 1,0 ml en tubos Eppendorf. El producto deseado empezó a eluir después del volumen de vacío, la mayoría del producto deseado eluyó en las fracciones 3-9.
3. Se mezclaron y concentraron las fracciones que contenían la mayoría del material.
4. Normalmente se obtienen 12-15 UDO A260 (70%) que está libre de exceso de molécula de colorante/marcador. Si es necesario, el producto se puede purificar adicionalmente por electroforesis (PAGE al 20%) o RP-HPLC.

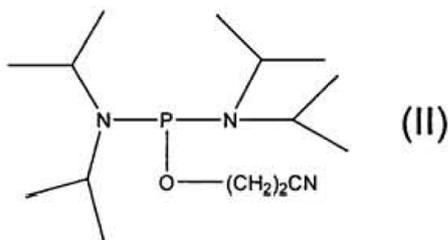
#### EJEMPLO 2

Síntesis de un ARNip que comprende un oligonucleótido sentido conjugado a sertralina y un oligonucleótido antisentido que comprende un grupo protector de fórmula C18-L3-C18-L2-furanosa-L1-[oligonucleótido]-3' en donde L1, L2 y L3 son enlaces fosfodiéster

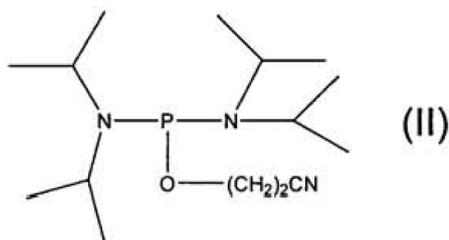
La síntesis se llevó cabo usando los siguientes pasos:

- (a) El oligonucleótido de ARN se forma mediante síntesis en fase sólida paso a paso en un soporte sólido, donde el grupo 5'-OH de la subunidad terminal en la hebra creciente, que normalmente está protegida por dimetoxitritilo (DMT), se pone en condiciones ácidas para eliminar el grupo protector DMT del 5'-OH, mientras que las bases de purina y pirimidina permanecen protegidas con (fluoren-9-il)metoxicarbonilo (FMOc).
- (b) Se hace reaccionar una unidad de furanosa, tal como una D-ribosa o una D-(-)-fructofuranosa con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr-Cl) en condiciones que favorecen la reacción sólo en las posiciones de grupo hidroxilo primario. Después, los grupos hidroxilo restantes se hacen reaccionar con un grupo protector de acetilación o bencilación. Por último, en condiciones ácidas se elimina el grupo protector DMT del hidroxilo primario. Dicho grupo hidroxilo desprotegido de la furanosa se hace reaccionar con el grupo 5'-OH desprotegido de la hebra de ARNip obtenida en el paso (a) obteniéndose así un oligonucleótido conjugado primario.
- (c) Se formó un polietilenglicol reactivo que tenía 6 monómeros de polietilenglicol (PEG) dando un espaciador de 18 unidades de enlace covalente (espaciador C18) añadiendo a un grupo OH terminal en condiciones

fosfitilantes un compuesto de fosforamidato, tal como el (2-cianoetil)-N,N'-diisopropilfosforamidita de fórmula (II)



- 5 (d) Se hace reaccionar el grupo 5'-OH desprotegido de la furanosa con el polietilenglicol reactivo del paso (c), obteniéndose así una hebra de ARNip que tiene la estructura:
- OH-C18-L2-furanosa-L1-[oligonucleótido]-3'
- en donde L1 y L2 son enlaces fosfodiéster.
- 10 (e) Se formó un segundo polietilenglicol reactivo que tenía 6 monómeros de polietilenglicol (PEG) dando un espaciador de 18 unidades de enlace covalente (espaciador C18) añadiendo a un grupo OH terminal en condiciones fosfitilantes un compuesto de fosforamidato, tal como el (2-cianoetil)-N,N'-diisopropilfosforamidita de fórmula (II)



- 15 (f) Se hace reaccionar el grupo 5'-OH desprotegido del C18 con el segundo polietilenglicol C18 reactivo del paso (e), obteniéndose así una hebra de ARNip que tiene la estructura:
- C18-L3-C18-L2-furanosa-L1-[oligonucleótido]-3'
- en donde L1, L2 y L3 son enlaces fosfodiéster.
- 20 (g) Se hibrida la hebra complementaria del ARNip conjugado a sertralina descrita en el ejemplo 1 con la hebra del ARNip modificado del paso (f). Para este fin, se eliminan previamente todos los grupos protectores restantes en las hebras de ARN como sigue. Se añadieron 500 µl de una mezcla que contiene el 20% v/v de metilamina (solución acuosa al 40% p/v) y el 80% v/v de una solución saturada de amoníaco, 30 (que contiene el 30-32% v/v de NH<sub>3</sub>) a un tubo Eppendorf con el ARNip (escala 200 nmoles). El tubo se cerró herméticamente y se calentó durante 45 minutos a una temperatura de 65°C. Este procedimiento elimina los grupos protectores en el átomo de fósforo de los nucleótidos (acetilación o benzoilación de la furanosa y la 2-cianoetilación de los enlaces fosfodiéster) y los grupos protectores de los grupos amino exocíclicos (Fmoc). La mezcla se enfrió después y se filtró y el sobrenadante se secó. El precipitado residual se hizo reaccionar con trietilamina-HF 1 M durante 3 horas a 65°C para cortar los grupos protectores en 2' de los nucleótidos (2'-t-butil dimetil sililo - TBDMS). Por último, la solución resultante se desaló en una columna de Sephadex.

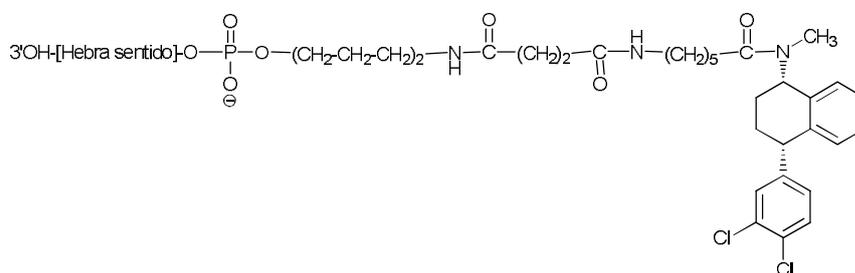
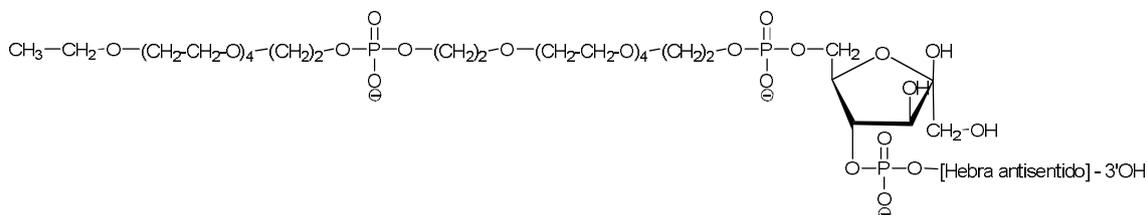
### EJEMPLO 3

- 30 Ensayo de eficacia de un ARNip dirigido a 5-HT<sub>1A</sub>R conjugado a un grupo de fórmula (I) y un agente de direccionamiento (de aquí en adelante ARNip-NLF) y un ARNip dirigido a 5-HT<sub>1A</sub>R desnudo (de aquí en adelante ARNip desnudo) mediante infusión local *in vivo* en el núcleo dorsal del rafe (NDR) de ratones

Este ejemplo muestra que un ARNip-NLF y un ARNip desnudo presentan eficacia similar para silenciar 5-HT<sub>1A</sub>R presináptico, medido mediante la disminución en el nivel de proteína y su función, cuando se aplica localmente en los núcleos dorsales del rafe donde se localiza el cuerpo de las neuronas serotoninérgicas. Esto indica que el grupo de

fórmula (I) y el agente de direccionamiento usados en las construcciones de esta invención no interfieren con la eficacia del oligonucleótido de interferencia.

Se sintetizaron un conjunto de compuestos que tenían la estructura de los ejemplos 1 y 2 como se ha divulgado anteriormente y tenían la siguiente estructura.



5

10

15

Los ARNip se diseñaron para dirigirse a las siguientes regiones de la secuencia del receptor de serotonina 5-HT de tipo 1A (5-HT<sub>1A</sub>R) de *Mus Musculus* (ratón, número de acceso de GenBank: NM\_008308): 633-651, 852-870, 1889-1907 y 2167-2185. Las hebras antisentido y sentido de cada ARNip se sintetizaron químicamente (SEQ ID NO: 5-10, tabla 1) y se hibridaron en un tampón de hibridación de ARN isotónico (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH: 7,4, acetato de magnesio 2 mM), combinando una solución 50 µM de cada hebra. La solución se incubó luego durante 1 minuto a 90°C, se centrifugó durante 15 segundos y después se incubó durante 1 hora a 37°C. La solución hibridada se purifica por HPLC y se liofilizan fracciones seleccionadas de ARNip. Se prepararon soluciones madre del ARNip resuspendiendo el producto liofilizado en agua sin RNasa y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Antes de usar, todas las soluciones madre de ARNip se diluyeron hasta una concentración final en LCRa (NaCl 125 mM, KCl 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> 1,26 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,18 mM y glucosa al 5%), un vehículo apropiado para aplicación cerebral (aplicaciones local e i.c.v.)

Tabla 2

Identificación del oligonucleótido de ARN (s: hebra sentido), (a: hebra antisentido), (ip: interferente pequeño)	Secuencia (dirección 5'-3')
ARNip-A-s (SEQ ID NO: 5)	GGAAGAGUGUAGGGCUUAC
ARNip -A-a (SEQ ID NO: 6)	GUAAGCCCUACACUCUUC
ARNip -B-s (SEQ ID NO: 7)	CGAUACUGGCCUCUCCAAC
ARNip -B-a (SEQ ID NO: 8)	GUUGGAGAGGCCAGUAUCG
ARNip -C-s (SEQ ID NO: 9)	GGUGCUCACAAGUGGACU
ARNip -C-a (SEQ ID NO: 10)	AGUCCACUUGUUGAGCACC
ARNip -D-s (SEQ ID NO: 11)	CGAUGGAAGUUUAAACCUC
ARNip -D-a (SEQ ID NO: 12)	GAGGUUUAAACUCCAUCG

Todas estas secuencias de ARNip incluyen las secuencias antisentido complementarias al ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, siendo capaces así de detener dicho ARNm y bloquear su expresión. Se empleó un cóctel equimolar de estas secuencias para todos los experimentos.

5 Como control, se infundió una secuencia ARNip sin sentido (ARNip ss). Este ARNip ss no es complementario a ningún gen de ratón cuando se compara en un algoritmo de alineamiento Blast al transcriptoma completo de ratón. Los ARNip ss tenían la siguiente secuencia:

ARNip-s ss                                    AGUACUGCUUACGAUACGG        SEQ ID NO:56

ARNip-a ss                                    CCGUAUCGUAAGCAGUACU        SEQ ID NO:57

10 Todas las secuencias tienen dímeros terminales de ADN de nucleótidos que contienen al menos una timina (T), no mostrado, para evitar la interferencia con las proteínas que regulan el ARNm de procesos normales en la célula. El experto en la materia conoce bien esta técnica. Con estos dímeros terminales los oligonucleótidos tienen 21-23 pares de bases, lo que permite un mecanismo eficaz de ARNi.

Se usaron para los experimentos las secuencias de ARNip de la tabla 1, conjugadas a un grupo de fórmula (I) y a un agente de direccionamiento como se ha descrito anteriormente (ARNip-NLF), el ARNip sin sentido conjugado a un grupo de fórmula (I) y un agente de direccionamiento (ARNip-NLF ss) y los oligonucleótidos desnudos sin modificaciones (ARNip desnudos de la tabla 1 o ARNip ss desnudo).

15 Para la infusión de los ARNip, se implantó un sistema de microcánula usando métodos estereotáxicos estándar como se ha descrito previamente en la técnica. La microcánula de entrada ensartada mediante tubos del calibre 25 consistía en tubos capilares de silicona fusionada de un DE de 110 µm y un DI de 40 µm. La longitud predeterminada de las microcánulas se decide en base a la profundidad de la región cerebral diana (es decir, 1 mm para los núcleos dorsales del rafe).

20 Se implantó una microcánula en los núcleos dorsales del rafe (NDR) de ratones macho C57BL/6J (21-29 g de 9 a 12 semanas de edad, machos). Las coordenadas estereotáxicas (en mm) fueron AP: -4,5, L: -1,0, DV: -4,4, con un ángulo lateral de 20° desde el bregma y la parte superior del cráneo según Franklin y Paxinos (1997). La microcánula se aseguró al cráneo con cemento dental y dos tornillos de 2 mm de longitud y 0,95 mm de diámetro. Los experimentos de microinfusión se realizaron 20-24 horas después de la cirugía en ratones despiertos. La microcánula de inyección se conectó a través de un tubo de polietileno a una jeringuilla operada por una bomba de precisión a una velocidad de 0,5 µl/min.

30 Para probar una medida funcional de la actividad presináptica de 5-HT<sub>1A</sub>R, se evaluó la respuesta hipotérmica inducida por bromhidrato de (*R*)-(+)-8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT, un agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub>R) 24 horas después de la infusión de una mezcla de ARNip desnudos o ARNip-NLF en el núcleo dorsal del rafe (NDR, 0,3 µg (0,02 nmoles)/1 µl/2 días). Los grupos control recibieron la misma cantidad de vehículo (LCRa: NaCl 125 mM, KCl 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> 1,26 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,18 mM y glucosa al 5%), ARNip ss desnudo y ARNip-NLF ss. Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales en un laboratorio experimental a temperatura estable de 22°C 1 hora antes del experimento. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 10:00 a.m. y las 14:00 p.m. La temperatura corporal se midió insertando una sonda lubricada en el recto 5 minutos antes de leer la temperatura mientras que los ratones se movían libremente. Las lecturas se obtuvieron con un termómetro digital. Se midió un valor basal 5 minutos antes y 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de 8-OH-DPAT. Se disolvió 8-OH-DPAT en solución salina y se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) a 1 mg/kg en un volumen de 5 ml/kg. La dosis elegida de 8-OH-DPAT para inducir hipotermia se basó en trabajos previos. La temperatura corporal se evaluó 24 horas después de la última aplicación de los ARNip dirigidos a 5-HT<sub>1A</sub> en el NDR en diferentes grupos de ratones y en sus respectivos controles. Se realizaron experimentos adicionales midiendo rectalmente la temperatura corporal de ratones 5-HT<sub>1A</sub>R KO (ratones sin 5-HT<sub>1A</sub>R) para evaluar la ausencia de hipotermia inducida por 8-OH-DPAT.

Como se puede ver en la figura 1, el silenciamiento de 5-HT<sub>1A</sub>R por infusión local de ARNip muestra una falta de respuesta hipotérmica inducida por 8-OH-DPAT similar a los ratones 5-HT<sub>1A</sub>R KO.

45 Después de este ensayo, los ratones se mataron por decapitación y los cerebros se retiraron rápidamente, se congelaron en nieve carbónica y se almacenaron a -20°C. Se cortaron secciones de tejidos de 14 µm de espesor usando un microtomo-cristato, se montaron descongeladas en portaobjetos recubiertos de APTS (3-aminopropiltrietoxisilano) y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

50 Para ensayar la densidad de proteína 5-HT<sub>1A</sub>R se usó [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT para la visualización radiográfica de los sitios del receptor 5-HT<sub>1A</sub>R. Las condiciones experimentales de incubación para [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT se han descrito previamente en el estado de la técnica. Brevemente, se descongelaron y secaron las secciones de tejido congelado, se preincubaron en Tris-HCl 170 mM pH 7,6, CaCl<sub>2</sub> 4 mM y ácido ascórbico al 0,01% durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después se incubaron en el mismo tampón, incluyendo [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT (234,0 Ci/mmol) 1 nM y pargilina 10<sup>-5</sup> M durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se definió la unión no específica como la restante en presencia de 5-HT 10<sup>-5</sup> M. Después de incubar y lavar las secciones de tejido se mojaron en agua destilada helada y se secaron rápidamente en

una corriente de aire frío. Los tejidos se expusieron a película sensible a tritio junto con patrones de  $^3\text{H}$  de plástico durante 60 días a  $4^\circ\text{C}$ .

Se usaron las secciones tisulares del NDR en 3 coordinadas antero-posteriores (AP) diferentes en los núcleos de rafe del mesencéfalo de ratón (aproximadamente AP -4,84, -4,60 y -4,24 mm) desde el bregma (Franklin y Paxinos, 1997) para la cuantificación de los sitios del receptor y se procesaron simultáneamente en las mismas condiciones experimentales. El análisis cuantitativo de los autorradiogramas se hizo con un sistema de análisis de imagen computerizado AIS<sup>R</sup>.

Como se puede ver en la figura 2, hay un descenso en las densidades de proteína 5-HT<sub>1A</sub>R en los grupos de ARNip desnudo y ARNip-NLF de aproximadamente el 40-50% de los grupos control (vehículo, ARNip desnudo ss y ARNip-NLF ss). Este cambio es paralelo a la supresión de la respuesta hipotérmica descrita en la figura 1.

Estos experimentos muestran que las modificaciones químicas del ARNip-NLF en ambas hebras no reduce la capacidad del ARNip de silenciar el gen diana cuando se compara con el ARNip desnudo. Además, la aplicación local de ARNip específicos del receptor 5-HT<sub>1A</sub> a los NDR mediante infusión produce la disminución del ARNm diana, independientemente de si el ARNip está desnudo o acoplado a un grupo de direccionamiento. Esto se puede explicar porque el método de administración lleva a la transferencia directa del ARNip al cuerpo neuronal por medio de la presión física ejercida durante la aplicación y por tanto, no se requiere translocación a través de la membrana neuronal.

En los siguientes ejemplos, se mostrará que los ARNip desnudos específicos para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> no son capaces de silenciar el ARNm diana mediante aplicación intracerebroventricular (i.c.v.) o intranasal y que la presencia de una molécula de direccionamiento unida al ARNip permite el silenciamiento eficaz del ARNm diana.

#### EJEMPLO 4

Selectividad diferencial a neuronas serotoninérgicas en los núcleos del rafe del mesencéfalo y ensayo de eficacia de una construcción ARNip-NLF de esta invención contra ARNip desnudo mediante infusión intracerebroventricular (i.c.v.) *in vivo* en el 3<sup>er</sup> ventrículo dorsal (D3V) de ratones

Este ejemplo muestra que una construcción ARNip-NLF y un ARNip desnudo muestran diferente selectividad para neuronas serotoninérgicas y eficacia para silenciar el 5-HT<sub>1A</sub>R cuando se aplican en el 3<sup>er</sup> ventrículo dorsal (D3V) que da acceso al cerebro completo a través del líquido cefalorraquídeo (LCR). Esto se evaluó mediante la medida de la reducción de los niveles de expresión de su ARNm, descenso en el nivel de proteína, cambios funcionales y potenciación farmacológica antidepresiva.

Se infundieron un conjunto de moléculas (grupos vehículo, ARNip desnudo ss, ARNip-NLF ss, ARNip desnudo y ARNip-NLF), como se describe en el ejemplo 3, a  $30\ \mu\text{g}/2,5\ \mu\text{l}/1\ \text{día}$  (2,3 nmoles) en el 3<sup>er</sup> ventrículo dorsal (D3V) en las siguientes coordenadas estereotáxicas (en mm: AP: -2,0, L: 0, DV: -2,1) usando una cepa de ratones y sistema de infusión similares al ejemplo 2. Para determinar el nivel de expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R se realizaron ensayos de hibridación *in situ* usando simultáneamente cuatro sondas de oligodesoxirribonucleótidos para 5-HT<sub>1A</sub>R, complementarias a las bases 82-122, 123-171, 558-933 y 1341-1389. Cada oligonucleótido del receptor 5-HT<sub>1A</sub> se marcó individualmente (2 pmol) en su extremo 3' con [ $^{33}\text{P}$ ]-dATP (>2500 Ci/mmol) usando desoxinucleotidiltransferasa terminal, se purificó mediante centrifugación usando el kit de eliminación de nucleótidos QIAquick. Los protocolos para hibridación *in situ* con marcador individual se basaron en procedimientos previamente descritos. Brevemente, primero se llevaron las secciones de tejido congelado, como se describe en el ejemplo 2, a temperatura ambiente, se fijaron durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$  en paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, NaCl 136 mM, KCl 2,6 mM), se lavaron durante 5 minutos en PBS 3X a temperatura ambiente, dos veces durante 5 minutos cada una en PBS 1X y se incubaron durante 2 minutos a  $21^\circ\text{C}$  en una solución de pronasa predigerida a una concentración final de 24 U/ml en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM. La actividad enzimática se paró mediante inmersión durante 30 segundos en glicina 2 mg/ml en PBS 1X. Los tejidos se lavaron por último en PBS 1X y se deshidrataron a través de una serie graduada de etanol. Para la hibridación, las sondas marcadas radioactivamente se diluyeron en una solución que contenía formamida al 50%, SSC 4X (SSC 1X: NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM), solución de Denhardt 1X (ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, seroalbúmina bovina al 0,02%), sulfato de dextrano al 10%, sarcosil al 1%, tampón fosfato 20 mM pH 7,0, ARNt de levadura 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y ADN de esperma de salmón 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las concentraciones finales de las sondas radioactivas en el tampón de hibridación estaban en el mismo intervalo (1,5 nM). Se cubrieron las secciones de tejido con la solución de hibridación que contenía las sondas marcadas, se recubrieron con cubreobjetos Nescofilm y se incubaron durante la noche a  $42^\circ\text{C}$  en cajas húmedas. Las secciones se lavaron después cuatro veces (15 minutos cada una) en SSC 1X a  $60^\circ\text{C}$  y una vez en SSC 1X a temperatura ambiente durante 30 minutos, se deshidrataron y se expusieron a películas durante 3-4 semanas. Las densidades ópticas de la película se semicuantificaron con sistema de análisis de imagen computerizado AIS<sup>R</sup>.

Para el mismo grupo de ratones usados para la hibridación *in situ*, se evaluó la densidad de proteína 5-HT<sub>1A</sub>R usando [ $^3\text{H}$ ]8-OH-DPAT para la visualización autorradiográfica de los sitios del receptor 5-HT<sub>1A</sub> como se describió en el ejemplo 2.

Las proteínas 5-HT<sub>1A</sub>R se expresan mucho presinápticamente en neuronas de serotonina (núcleos del rafe del mesencéfalo) y en neuronas postsinápticamente localizadas en las terminales nerviosas de 5-HT, principalmente en las áreas cortico-límbicas (es decir, el hipocampo).

5 Como se puede ver en la figura 3 A y B, sólo las moléculas de ARNip-NLF indujeron un silenciamiento específico del nivel del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R en tres coordinadas anteroposteriores diferentes en los núcleos del rafe del mesencéfalo de ratón, donde se localizan los cuerpos de las neuronas serotoninérgicas.

10 Como se puede ver en la figura 3 C, la cuantificación densitométrica de las medidas de granos positivos de ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R en películas en el núcleo dorsal del rafe mostró una reducción del 50% en el nivel de expresión en el grupo de ARNip-NLF comparado con los otros grupos ensayados. Las diferencias en la expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R se aprecian principalmente en el área del NDR.

15 Como se puede ver en la figura 4, sólo las moléculas de ARNip-NLF indujeron una reducción específica del nivel de proteína de 5-HT<sub>1A</sub>R (alrededor del 50%) en áreas cerebrales presinápticas (núcleo dorsal del rafe) pero no postsinápticas (hipocampo o corteza prefrontal), determinado mediante ensayos de unión en sitios del receptor 5-HT<sub>1A</sub> usando [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT. Las diferencias en la expresión del ARNm y proteína de 5-HT<sub>1A</sub>R se aprecian principalmente en el área del NDR.

Estos resultados indicaban que el ARNip-NLF dirige selectivamente los oligonucleótidos que realizan interferencia del ARNm a neuronas serotoninérgicas específicas localizadas en el núcleo dorsal del rafe aumentando así la eficacia de dicha interferencia de ARN con la expresión de los receptores neuronales diana.

20 Para comprobar si el silenciamiento específico del receptor 5-HT<sub>1A</sub> podría influenciar la expresión de proteínas relacionadas con 5-HT como el transportador de serotonina (5-HTT o SERT) o el receptor 5-HT<sub>1B</sub>, se determinaron en NDR la densidad de la proteína transportadora de serotonina y del receptor 5-HT<sub>1B</sub>.

25 Para ensayar la densidad de proteína transportadora de serotonina se usó [<sup>3</sup>H]citalopram para la visualización autorradiográfica de los sitios 5-HTT. Brevemente, se descongelaron y secaron secciones de tejido congelado, se preincubaron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 a 25°C) que contenía NaCl 120 mM y KCl 5 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se incubaron en el mismo tampón que contenía [<sup>3</sup>H]citalopram (70.0 Ci/mmol) 1,5 nM durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se definió la unión no específica como la restante en presencia de fluoxetina 1 µM. Después de incubar y lavar las secciones de tejido se mojaron en agua destilada helada y se secaron rápidamente en una corriente de aire frío. Los tejidos se expusieron a película sensible a tritio junto con patrones de <sup>3</sup>H de plástico durante 40 días a 4°C.

30 Se usaron las secciones tisulares del NDR en 3 coordinadas antero-posteriores (AP) diferentes en los núcleos de rafe del mesencéfalo de ratón (aproximadamente AP -4,84/-4,96, -4,60/-4,36 y -4,24 mm) desde el bregma (Franklin y Paxinos, 1997) para la cuantificación de los sitios 5-HTT y se procesaron simultáneamente en las mismas condiciones experimentales. El análisis cuantitativo de los autorradiogramas se hizo con un sistema de análisis de imagen computerizado AIS<sup>R</sup>. Como se puede ver en la figura 5A, los grupos vehículo, ARNip desnudo y ARNip-NLF no muestran ninguna reducción o cambio en 5-HTT (transportador de serotonina, SERT) a nivel de proteína en el núcleo dorsal del rafe.

35 Para ensayar la densidad de la proteína receptora de 5-HT<sub>1B</sub> (5-HT<sub>1B</sub>R) se usó [<sup>125</sup>I]yodocianopindolol para la visualización de los sitios de 5-HT<sub>1B</sub>R. Las secciones se preincubaron en tampón Tris-HCl 170 mM (pH 7,4) que contenía NaCl 150 mM y después se incubaron durante 2 horas en el mismo tampón suplementado con [<sup>125</sup>I]yodocianopindolol ([<sup>125</sup>I]CYP, 2000 Ci/mmol) 10 pM y 8-OH-DPAT 100 nM para bloquear los sitios 5-HT<sub>1A</sub>R e isoprenalina 30 µM para bloquear los sitios β-adrenérgicos. La unión no específica se determinó en secciones adyacentes incubadas en las mismas condiciones pero en presencia de 5-HT 10 µM. Las secciones se lavaron dos veces en el mismo tampón, se mojaron rápidamente en agua destilada a 4°C, se secaron en aire frío y se expusieron a película sensible (Hyperfilm-<sup>3</sup>H) a 4°C durante un día. Las densidades ópticas de las películas se semicuantificaron con un sistema de análisis de imagen computerizado AIS<sup>R</sup>. Como se puede ver en la figura 5B, los grupos vehículo, ARNip desnudo y ARNip-NLF no muestran ninguna reducción o cambio en el receptor 5-HT<sub>1B</sub> a nivel de proteína en el núcleo dorsal del rafe.

40 Para evaluar el efecto de ARNip-NLF en las características funcionales de 5-HT<sub>1A</sub>R se ensayó la respuesta hipotérmica inducida por 8-OH-DPAT y liberación de 5-HT en la corteza prefrontal medial (CPFm). Se evaluó la respuesta hipotérmica inducida por 8-OH-DPAT 24 horas después de infundir una mezcla de ARNip desnudos o ARNip-NLF (como se describe en el ejemplo 2) en el 3<sup>er</sup> ventrículo dorsal (D3V, 30 µg/2,5 µl/1 día). Como se puede ver en la figura 6, sólo el silenciamiento de 5-HT<sub>1A</sub>R por ARNip-NLF infundido mostró falta de respuesta hipotérmica inducida por 8-OH-DPAT similar a la de los ratones 5-HT<sub>1A</sub>R KO. Otros grupos de ARNip desnudos y control (vehículo, ARNip desnudo ss y ARNip-NLF ss) no mostraron efecto de silenciamiento (como se vio en la figura 4 y 5) y fue paralelo con una curva típica en la respuesta hipotérmica inducida por 8-OH-DPAT.

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de 5-HT<sub>1A</sub>R localizado en neuronas serotoninérgicas, mediante agonista endógeno 5-HT (neurotransmisor serotonina) o agonistas selectivos (es decir, 8-OH-DPAT) suprime la descarga celular y la liberación de 5-HT dependiente de impulso en los núcleos del rafe del mesencéfalo y en áreas cerebrales de proyecciones terminales como la corteza prefrontal medial, hipocampo, etc., produciendo niveles menores de 5-HT (efecto de 8-OH-DPAT). Para evaluar la liberación de 5-HT, se usó un procedimiento de microdiálisis intracerebral como se ha descrito en el estado de la técnica. Brevemente, el eje de la sonda se hizo de tubo de acero inoxidable de hasta 15 mm de longitud, calibre 25 (DE 501 µm, DI 300 µm). Los tubos de entrada y salida ensartados mediante tubos del calibre 25 consistían en tubos capilares de silicona fusionada de un DE de 110 µm y un DI de 40 µm. Los extremos superiores expuestos de tubo de sílice se insertaron en un tubo de acero inoxidable de 7 mm de longitud, calibre 27 (DE 410 µm, DI 220 µm). Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y se colocaron en un marco estereotáxico. A cada ratón se le implantó una sonda de diálisis equipada con una membrana de cuprofan (2 mm de longitud; corte de peso molecular 5000 Da) en la corteza prefrontal medial (CPFM) (en mm: AP +2,2, L -0,2, DV -3,4 a partir del bregma, según el atlas de Franklin y Paxinos, 1997).

Los experimentos de microdiálisis se realizaron 48-72 horas después de la cirugía en ratones que se movían libremente, mediante perfusión continua de sondas con LCRa (NaCl 125 mM, KCl 2,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,26 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,18 mM) a una velocidad de 2,0 µl/min con una bomba jeringuilla WPI modelo sp220i unida a un pivote líquido saliente. Se recogieron muestras de dializado de 60 µl cada 30 minutos en viales de microcentrífuga.

Después de un periodo inicial de estabilización de 60 minutos, se recogieron cuatro muestras basales antes de la administración sistémica de 8-OH-DPAT (0,5 mg/kg i.p.) y después se recogieron muestras sucesivas de dializado. Al final de los experimentos de diálisis, los ratones se sacrificaron y los cerebros se retiraron inmediatamente y se congelaron a -70°C. Después de ello se cortaron cortes frontales (50 µm) del cerebro en un criostato y se tiñeron con violeta de cresilo según procedimientos estándar, para la localización de los sitios de perfusión. Solo se usaron los datos obtenidos de animales con emplazamientos de las sondas histológicamente correctos para el posterior análisis estadístico.

Se determinó la concentración de 5-HT en las muestras dializadas mediante HPLC usando una columna de 3 µm de octadecilsilíce (ODS) (7,5 cm x 0,46 cm) y se detectó amperométricamente con un detector Hewlett-Packard 1049 ajustado a un potencial de oxidación de 0,6 V. La fase consistió en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,15 M, sulfato de octilo sodio 1,8 mM, EDTA 0,2 mM (pH 2,8 ajustado con ácido fosfórico) y metanol al 30% y se bombeó a 0,7 ml/min. El tiempo de retención para 5-HT fue de 3,5-4 minutos y el límite de detección fue de 2 fmol/muestra.

Como se puede ver en la figura 7 había una ausencia de efecto de 8-OH-DPAT en liberación prefrontal de serotonina en el grupo de ratones tratados con ARNip-NLF comparado con los ratones del grupo ARNip-NLF ss. Esto evidencia que se puede evaluar funcionalmente un silenciamiento de 5-HT<sub>1A</sub>R en neuronas serotoninérgicas mediante la reducción de los efectos del agonista 8-OH-DPAT en la cantidad de 5-HT en áreas cerebrales terminales.

#### EJEMPLO 5

Ensayos competitivos de ligando de selectividad libre (sertralina) y la construcción ARNip-NLF según la invención midiendo parámetros funcionales de las neuronas serotoninérgicas en ratones pretratados con ligando en una dosis seguido por infusión intracerebroventricular (i.c.v.) *in vivo* del ARNip-NLF

Para determinar si el ligando de selectividad conjugado al ARNip en los ARNip-NLF es un componente clave de la distribución a las células del núcleo dorsal del rafe (principalmente neuronas serotoninérgicas), se realizaron algunos ensayos competitivos. Los ratones recibieron una inyección en una dosis de ligando selectivo libre, el inhibidor de 5-HTT sertralina (20 mg/kg i.p.) 3 horas antes de la infusión de ARNip en D3V (30 µg/2,5 µl/1 día, i.c.v.). Además, un grupo de ratones recibieron vehículo i.p. y vehículo en D3V.

Los experimentos de microdiálisis se realizaron 24 horas después de las administraciones i.c.v. de vehículo o ARNip. Como se puede ver en la figura 8A, la inyección en una dosis de sertralina (20 mg/kg i.p.) evitó el silenciamiento del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> mediante ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R conjugado y la administración de una dosis de 8-OH-DPAT (agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub>R, 0,5 mg/kg i.p.) redujo los niveles de 5-HT en la corteza prefrontal medial como los grupos control.

También se evaluó el efecto de la administración de 8-OH-DPAT (1 mg/kg i.p.) en la temperatura corporal en ratones ARNip-NLF previamente tratados con el inhibidor selectivo de 5-HTT, sertralina (20 mg/kg i.p.) en ratones eran similares a los usados en la figura 8A. La figura 8B muestra que la sertralina compite eficazmente con los ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R produciendo así una respuesta hipotérmica similar a los grupos control, lo que indica la ausencia de transfección y silenciamiento del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>R.

Estos resultados demuestran que una administración en una dosis del ligando de selectividad libre (sertralina) bloquea o compite con los ARNip conjugados a sertralina (ARNip-NLF) por el mismo punto de entrada a las neuronas diana (es decir, 5-HTT, transportador de serotonina). En principio, la sertralina tiene gran especificidad y afinidad (en el intervalo nanomolar) por el transportador de 5-HT y al conjugarla con un ARNip como en los ARNip-NLF, el nuevo conjugado

mantiene la afinidad por este transportador de 5-HT. Por otra parte, el transportador de 5-HT se expresa solo en neuronas 5-HT y esta combinación de alta afinidad por el transportador y expresión específica de tipo celular determina la naturaleza selectiva de los ARNip-NLF que tiene conjugado una sertralina o ligando ISRS.

#### EJEMPLO 6

5 Potenciación del aumento de los niveles de 5-HT en corteza prefrontal después de aplicación de una dosis de antidepresivo (es decir, fluoxetina) en infusión intracerebroventricular (i.c.v.) *in vivo* del ARNip-NLF en el 3<sup>er</sup> ventrículo dorsal (D3V) de ratones comparados con grupos control

10 En condiciones fisiológicas, los ISRS (es decir, fluoxetina) causan un aumento marcado de la concentración extracelular de serotonina en los núcleos del rafe del mesencéfalo y el prosencéfalo. El aumento de 5-HT extracelular producido por el bloqueo de la recaptación del transportador de serotonina (SERT) activa los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> en los núcleos del rafe del mesencéfalo, suprimiendo la descarga celular y liberación terminal, un efecto que atenúa el aumento extracelular de 5-HT producido por el bloqueo de la recaptación. Por consiguiente, la activación de los receptores postsinápticos de serotonina responsable del efecto terapéutico es menor del esperado. Se sabe que el bloqueo de estos mecanismos de retroalimentación negativa con antagonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (es decir, pindolol) potencia el aumento de 5-HT producido por los ISRS y, por lo tanto, podría servir para acelerar los efectos clínicos de los ISRS.

15 Como se puede ver en la figura 9, la concentración de serotonina en el dializado en la corteza prefrontal medial fue alrededor del 50% mayor que la basal después de la administración sistémica de fluoxetina en el grupo de ratones ARNip-NLF sin sentido (ARNip-NLF ss), donde se esperaba que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> fuera completamente funcional como se ha mostrado anteriormente. En el grupo de ratones ARNip-NLF, el silenciamiento del receptor 5-HT<sub>1A</sub> presináptico potencia el efecto de la administración sistémica de fluoxetina hasta el 150% de los niveles terminales de 5-HT basales en la corteza prefrontal medial.

20 Estos resultados demuestran claramente que las secuencias de oligonucleótidos de la invención (ARNip-NLF), acopladas a una molécula de sertralina, bloquearon la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> silenciando el transcrito de ARNm correspondiente que se iba a traducir. Las secuencias de oligonucleótidos de la invención (ARNip-NLF) silenciaron dicha expresión en un índice mayor que el ARNip correspondiente en forma desnuda (ARNip desnudo). Por lo tanto, los oligonucleótidos de la invención son más eficaces que cantidades equivalentes de las mismas secuencias de ARNip, en las que no se realiza modificación (ARNip desnudo).

25 Estas observaciones permiten deducir que el grupo de fórmula (I) no interfiere en el silenciamiento de la expresión del receptor. Además, la presencia de la molécula adicional de conjugación aumenta la eficacia de la inhibición realizada por el mecanismo de ARNi.

#### EJEMPLO 7

Estudio del comportamiento antidepresivo y ansiolítico en respuesta a la infusión intracerebroventricular (i.c.v.) *in vivo* de ARNip-NLF y comparación con los ratones deficientes en 5-HT<sub>1A</sub>R (KO)

35 Para evaluar el potencial efecto antidepresivo de silenciar el receptor 5-HT<sub>1A</sub> presináptico, se realizaron análisis de comportamiento en ratones adultos de 9 a 12 semanas de edad. Se realizaron en el siguiente orden, con al menos 1 día entre las pruebas: laberinto en cruz elevado y prueba de suspensión de la cola. El laberinto en cruz elevado se realizó usando un laberinto en cruz con brazos de 30 cm de longitud y 5 cm de anchura, elevado 31 cm del suelo en una habitación débilmente iluminada (50 lux). Los animales se introdujeron en la parte media del laberinto, enfrentados a un brazo abierto y se les dejó explorar libremente durante 5 minutos. Se midieron el tiempo pasado y la distancia recorrida en los brazos abiertos y cerrados mediante un sistema de videoseguimiento. El aparato se limpió con etanol al 70% y se dejó secar entre ratones. Todas las pruebas se realizaron entre las 11:00 a.m. y las 4:00 p.m. Los días de las pruebas, los animales se transportaron al laboratorio de comportamiento débilmente iluminado y se dejaron tranquilos durante al menos 1 hora antes de la prueba. En la prueba de suspensión de la cola los ratones se suspendieron por la cola y se utilizó cinta para asegurarlos a una barra horizontal. Los animales se suspendieron durante 6 minutos y se evaluó la inmovilidad durante este periodo usando un paquete de software de videoseguimiento automatizado.

40 Como se puede ver en la figura 10, no se observaron cambios en el comportamiento similar a ansiedad, sino una respuesta alterada en una prueba de respuesta relacionada a estrés/depresión en ratones con autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> silenciado. La potencial capacidad antidepresiva del ARNip-NLF se sitúa entre el ratón KO y el ratón control de tipo salvaje. Sugiere que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> podría convertirse en una nueva diana para el tratamiento de la depresión. Hay alrededor de un 40% de pacientes depresivos que no responden a tratamientos con ISRS convencionales y podrían convertirse en los primeros candidatos para un nuevo planteamiento terapéutico a la enfermedad.

#### EJEMPLO 8

Eficacia diferencial de la disminución por ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R contra ARNip-NLF sin sentido en medidas serotoninérgicas funcionales mediante aplicación intranasal (i.n.) *in vivo* en ratones

Para validar la vía intranasal de aplicación como potencial administración terapéutica, se ensayaron vehículo y ARNip-NLF para comprobar la respuesta hipotérmica, los niveles de ARNm en el núcleo dorsal del rafe y dializado de 5-HT en la corteza prefrontal.

5 Los ratones se anestesiaron con pentobarbital 40 mg/kg i.p y se colocaron sobre sus lomos. Se dejó caer PBS o ARNip-NLF lenta y suavemente en narinas alternativas con una punta de micropipeta en alícuotas de 5 µl.

10 Como se puede ver en la figura 11, la aplicación intranasal de los ARNip-NLF o vehículo produjo un descenso en el ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> determinado mediante hibridación *in situ* y un descenso en el receptor 5-HT<sub>1A</sub> determinado mediante ensayos de unión de ligandos que es similar a los resultados observados después de la aplicación i.c.v. En particular, la disminución presináptica fue del 30% (comparado con la disminución del 50% cuando el ARNip-NLF se aplicó por vía intraventricular) (véase la figura 11). Además, la aplicación intranasal de los ARNip-NLF produjo un descenso en la respuesta hipotérmica después de la administración de 8-OH-DPAT (véase la figura 12A) y un descenso en la reducción de nivel dializado de 5-HT en la corteza prefrontal después de la aplicación en una dosis de 8-OH-DPAT (figura 12B).

15 Además, se evaluó el potencial efecto antidepresivo de ARNip-NLF-5-HT<sub>1A</sub>R usando la prueba de suspensión de la cola como se describe en el ejemplo 7. Además, se evaluó el comportamiento similar a ansiedad por el laberinto en cruz elevado. Como se puede ver en la figura 13, los experimentos mostraron que no se observaron cambios en el comportamiento similar a ansiedad (figura 13A) pero se indujo un tiempo de inmovilidad disminuido en una prueba relacionada con estrés/depresión en ratones con el autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> disminuido (figura 13B) y un tiempo de inmovilidad disminuido en una prueba de natación forzada (figura 13C).

20 EJEMPLO 9

Ensayo de eficacia de un ARNip dirigido a 5-HTT (ARNip del transportador de serotonina) conjugado a un grupo de fórmula (I) y un agente de direccionamiento (de aquí en adelante ARNip-NLF-5-HTT) a dosis de 10 ó 30 µg/ratón y vehículo como grupo control mediante aplicación intranasal *in vivo* en ratones

25 Se sintetizaron un conjunto de compuestos que tienen la estructura de los ejemplos 1 y 2 como se ha divulgado anteriormente. El ARNip se diseñó dirigido a la siguiente región de la secuencia del transportador de serotonina (5-HTT) de *Mus Musculus* (ratón, número de acceso de GenBank: NM\_010484): 1230-1250. Las hebras sentido y antisentido del ARNip se sintetizaron químicamente (SEQ ID NO 1-2, tabla 2) y se hibridaron en un tampón de hibridación de ARN isotónico (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH: 7,4, acetato de magnesio 2 mM) combinando una solución 50 µM de cada hebra. La solución se incubó después durante 1 minuto a 90°C, se centrifugó durante 15 segundos y después se incubó durante 1 hora a 37°C. La solución hibridada se purificó por HPLC y se liofilizaron fracciones seleccionadas del ARNip. Se prepararon soluciones madre del ARNip resuspendiendo el producto liofilizado en agua sin RNasa y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Antes de usar, todas las soluciones madre de ARNip se diluyeron a una concentración final en tampón PBS un vehículo apropiado para la aplicación intranasal.

Identificación del oligonucleótido de ARN	Secuencia (dirección 5'-3')	SEQ ID NO:
ARNip-A-s (sentido)	GCUAGCUACAACAAGUUCATT	14
ARNip-A-a (antisentido)	UGAACUUGUUGUAGCUAGCTT	15

35 La secuencia ARNip incluye las secuencias antisentido complementarias al ARNm del transportador de 5-HT (5-HTT), que por lo tanto puede detener dicho ARNm y bloquear su expresión.

40 Todas las secuencias tienen dímeros terminales de ADN de nucleótidos que contienen al menos una timina (T), no mostrado, para evitar la interferencia con las proteínas que regulan el ARNm de procesos normales en la célula. El experto en la materia conoce bien esta técnica. Con estos dímeros terminales los oligonucleótidos tienen 21-23 pares de bases, lo que permite un mecanismo eficaz de ARNi.

Se usaron para los experimentos las secuencias ARNip de la tabla 2, conjugadas a un grupo de fórmula (I) y un agente de direccionamiento como se describe anteriormente (ARNip-NLF-5-HTT).

EJEMPLO 10

45 Eficacia diferencial de disminución mediante ensayos de medidas funcionales de ARNip-NLF-5-HTT a 2 dosis (10 y 30 µg/ratón) mediante aplicación intranasal (i.n) *in vivo* en ratones

Se anestesiaron ratones macho C57BL/6J (21-29 g, de 9 a 12 semanas de edad, machos) con pentobarbital 40 mg/kg i.p y se colocaron sobre los lomos. Se dejó caer PBS o ARNip-NLF-5-HTT lenta y suavemente en narinas alternativas con una punta de micropipeta en alícuotas de 5 µl. Las dosis evaluadas de ARNip-NLF-5-HTT fueron: 5 µg/5 µl y 15 µg/5 µl en cada narina (dosis total de ARNip-NLF: 10 y 30 µg/ratón durante un día).

5 Veinticuatro horas después del tratamiento los ratones se mataron por decapitación y los cerebros se retiraron rápidamente, se congelaron en nieve carbónica y se almacenaron a -20°C. Se cortaron secciones de tejido, de 14 µm de espesor, usando un microtomo-criostato, se montaron descongeladas en portaobjetos recubiertos con APTS (3-aminopropiltriethoxisilano) y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

10 Para determinar el nivel de expresión del ARNm de 5-HTT se realizaron ensayos de hibridación *in situ* usando una sonda de oligodesoxirribonucleótidos específica para 5-HTT, complementaria a las bases 820-863 (ratón, número de acceso de GenBank: NM\_010484). El oligonucleótido de 5-HTT se marcó individualmente (2 pmol) en su extremo 3' con [<sup>33</sup>P]-dATP (>2500 Ci/mmol) usando desoxinucleotidiltransferasa terminal, se purificó mediante centrifugación usando el kit de eliminación de nucleótidos QIAquick. Los protocolos para hibridación *in situ* con marcador individual se basaron en procedimientos previamente descritos. Brevemente, primero se llevaron las secciones de tejido congelado, como se describe en el ejemplo 2, a temperatura ambiente, se fijaron durante 20 minutos a 4°C en paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, NaCl 136 mM, KCl 2,6 mM), se lavaron durante 5 minutos en PBS 3X a temperatura ambiente, dos veces durante 5 minutos cada una en PBS 1X y se incubaron durante 2 minutos a 21°C en una solución de pronasa predigerida a una concentración final de 24 U/ml en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM. La actividad enzimática se paró mediante inmersión durante 30 segundos en glicina 2 mg/ml en PBS 1X. Los tejidos se lavaron por último en PBS 1X y se deshidrataron a través de una serie graduada de etanol. Para la hibridación, la sonda marcada radioactivamente se diluyó en una solución que contenía formamida al 50%, SSC 4X (SSC 1X: NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM), solución de Denhardt 1X (ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, seroalbúmina bovina al 0,02%), sulfato de dextrano al 10%, sarcosil al 1%, tampón fosfato 20 mM pH 7,0, ARNt de levadura 250 µg/ml y ADN de esperma de salmón 500 µg/ml. La concentración final de la sonda radioactiva en el tampón de hibridación estaba en el mismo intervalo (1,5 nM). Se cubrieron las secciones de tejido con la solución de hibridación que contenía la sonda marcada, se recubrieron con cubreobjetos Nescofilm y se incubaron durante la noche a 42°C en cajas húmedas. Las secciones se lavaron después cuatro veces (15 minutos cada una) en SSC 1X a 60°C y una vez en SSC 1X a temperatura ambiente durante 30 minutos, se deshidrataron y se expusieron a películas durante 1-3 días. Las densidades ópticas de la película se semicuantificaron con sistema de análisis de imagen computerizado AIS<sup>R</sup>.

Como se puede ver en la figura 14A, ambas dosis de las moléculas de ARNip-NLF-5-HTT indujeron una disminución específica del ARNm de 5-HTT en los núcleos dorsales del rafe en tres coordenadas antero-posteriores diferentes.

35 Como se puede ver en la figura 14B, la cuantificación densitométrica de las medidas de granos positivos del ARNm de 5-HTT en películas en el núcleo del rafe del mesencéfalo mostró una reducción del 30% en el nivel de expresión en el grupo de ARNip-NLF comparado con el grupo de vehículo.

Estos resultados indicaron que el ARNip-NLF selectivamente dirige los oligonucleótidos que realizan la interferencia del ARNm a neuronas serotoninérgicas específicas localizadas en los núcleos del rafe del mesencéfalo.

40 Se ensayó la densidad de proteína transportadora de serotonina como se describe en el ejemplo 4 usando [<sup>3</sup>H]citalopram para la visualización autorradiográfica de sitios 5-HTT. 24-48 horas después de la administración intranasal de ARNip-NLF, los ratones se sacrificaron y sus cerebros se retiraron y se obtuvieron cortes frontales en serie de 14 µm de espesor en las siguientes coordenadas AP, en mm, relativo al bregma (Franklin y Paxinos, 1997): 2,2 (corteza prefrontal – CPF), de 1,1 a 0,6 (putamen caudado, CPu, núcleos del tabique lateral y medial – Sep, pálido ventral, PV), de -1,5 a -1,8 (hipocampo – HPC, hipotálamo – Hip) y de -4,24 a -4,96 (núcleo dorsal del rafe – DR y núcleo mediano del rafe – MnR). Brevemente, se descongelaron y seccionaron secciones congeladas de tejido, se preincubaron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 a 25°C) que contenía NaCl 120 mM y KCl 5 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se incubaron en el mismo tampón que contenía [<sup>3</sup>H]citalopram (70,0 Ci/mmol) 1,5 nM durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se definió la unión no específica como lo que queda en presencia de fluoxetina 1 µM. Después de incubar y lavar, las secciones de tejido se sumergieron en agua destilada helada y se secaron rápidamente en una corriente de aire. Los tejidos se expusieron a película sensible a tritio junto con estándar de <sup>3</sup>H plásticos durante 40 días a 4°C. El análisis cuantitativo de los autorradiogramas se hizo con un sistema de análisis de imagen computerizado AIS. Usando datos calibrados de tejido de los estándares radiactivos coexpuestos, los valores de DO de los autorradiogramas se transformaron a niveles de radiactividad unida (nCi/mg de proteína tisular) a regiones específicas del cerebro en secciones de tejido.

55 Como se puede ver en la figura 15, la aplicación intranasal de ARNip-NLF-5-HTT indujo una reducción de los niveles del transportador de serotonina en las diferentes áreas cerebrales comparado con la administración intranasal de vehículo o ARNip-NLF-ss determinado por ensayos de unión autorradiográficos.

EJEMPLO 11

Aumento en los niveles de 5-HT en corteza prefrontal en ratones tratados mediante aplicación intranasal (i.n.) *in vivo* de dosis de 10 y 30 µg/ratón de ARNip-NLF-5-HTT comparado con grupos control

5 Para evaluar los efectos de ARNip-NLF en las propiedades funcionales de 5-HTT, se evaluaron los efectos neuroquímicos de inhibidores selectivos del transportador de 5-HT en los niveles de 5-HT en el cuerpo estriado dorsal en respuesta a ARNip-NLF-5-HTT. Para este fin, se anestesiaron ratones macho C57BL/6J (21-29 g, de 9 a 12 semanas de edad machos) con pentobarbital 40 mg/kg, i.p. y se colocaron en un marco estereotáxico. A cada ratón se le implantó una sonda de diálisis equipada con una membrana de cuprofan (1,5 mm de longitud; corte de peso molecular 5000 Da) en el cuerpo estriado dorsal (CPFm) (en mm: AP +0,5, L -1,7, DV -4,5 a partir del bregma, según el atlas de Franklin y Paxinos, 1997).

10 Los experimentos de microdiálisis se realizaron 24-72 horas después de la cirugía en ratones que se movían libremente, mediante perfusión continua de sondas con LCRa (NaCl 125 mM, KCl 2,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,26 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,18 mM) a una velocidad de 2,0 µl/min con una bomba jeringuilla WPI modelo sp220i unida a un pivote líquido saliente. Se recogieron muestras de dializado de 60 µl cada 30 minutos en viales de microcentrífuga.

15 Después de un periodo inicial de estabilización de 60 minutos, se recogieron de cuatro a seis muestras basales antes de la administración local de citalopram (1-10-50 µM) o sistémica de fluoxetina (20 mg/kg i.p.) y después se recogieron muestras de dializado sucesivas. Al final de los experimentos de diálisis, los ratones se sacrificaron y los cerebros se retiraron inmediatamente y se congelaron a -70°C. Después de ello se cortaron cortes frontales (50 µm) del cerebro en un criostato y se tiñeron con violeta de cresilo según procedimientos estándar, para la localización de los sitios de perfusión. Solo se usaron los datos obtenidos de animales con emplazamientos de las sondas histológicamente correctos para el posterior análisis estadístico.

20 Se determinó la concentración de 5-HT en las muestras dializadas mediante HPLC usando una columna 3 µm de octadecilsilíce (ODS) (7,5 cm x 0,46 cm) y se detectó amperométricamente con un detector Hewlett-Packard 1049 ajustado a un potencial de oxidación de 0,6 V. La fase móvil consistió en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,15 M, sulfato de octilo sodio 1,8 mM, EDTA 0,2 mM (pH 2,8 ajustado con ácido fosfórico) y metanol al 30% y se bombeó a 0,7 ml/min. El tiempo de retención para 5-HT fue de 3,5-4 minutos y el límite de detección fue de 2 fmol/muestra.

25 Como se puede ver en la figura 16 había una ausencia o descenso de respuesta de 5-HTT a inhibidores selectivos de 5-HTT, incluyendo fluoxetina y citalopram en los niveles de serotonina en cuerpo estriado dorsal en el grupo de ratones tratados con ARNip-NLF-5-HTT comparado con el grupo vehículo. Esto evidencia que el silenciamiento de 5-HTT en neuronas serotoninérgicas se puede evaluar funcionalmente mediante la reducción de efectos de inhibidores selectivos del transportador en la cantidad de 5-HT en áreas terminales del cerebro.

30 Estos resultados demuestran que la administración de ARNip conjugados a sertralina (ARNip-NLF) se dirige a las neuronas serotoninérgicas interaccionando selectivamente con el 5-HTT, además de la secuencia del componente ácido nucleico (ARNip).

35 Los ejemplos 3 a 8 muestran que un ARNip-NLF dirigido contra un 5-HT<sub>1A</sub>R es capaz de silenciar el gen diana específicamente en neuronas 5-HT localizadas en el núcleo dorsal del rafe. Este efecto se observa tanto después de aplicación intracerebroventricular como intranasal.

40 Los ejemplos 10 y 11 muestran que los ARNip-NLF específicos contra el 5-HTT también son capaces de silenciar el gen diana, en este caso, el ARNm de 5-HTT. La capacidad de direccionamiento de la construcción ARNip-NLF de esta invención se ha observado tanto después de aplicación cerebroventricular en el tercer ventrículo (D3V) como mediante aplicación intranasal a una dosis de 0,3 a 1 mg/kg (10 a 30 µg de moléculas ARNip por ratón). Este es un intervalo terapéutico común aceptado para terapias de ARNip y con potencial de aumentar para tratamientos humanos. La aplicación intranasal no invasora también aumenta la viabilidad de las moléculas de ARNip-NLF para evolucionar como agente terapéutico.

#### EJEMPLO 12

45 Validación de direccionamiento de un ARNip conjugado a nomifensina (ARNip-NLF-SS) por infusión intracerebroventricular *in vivo* en el ventrículo lateral derecho

Este ejemplo muestra que un ARNip-NLF ss infundido por vía intracerebroventricular es capaz de alcanzar neuronas específicas en el cerebro localizadas en la sustancia negra y locu cerúleo. Estas células se tiñen positivamente para tirosina hidroxilasa, es decir, son neuronas dopaminérgicas o noradrenérgicas.

50 La secuencia usada fue un ANRip sin sentido (ss) sin homología con ningún gen humano, de ratón o rata:

ARNip-s AGUACUGCUUACGAUACGG SEQ ID NO:69

ARNip-a CCGUAUCGUAAGCAGUACU SEQ ID NO:70

- 5 La secuencia tiene dímeros terminales de ADN de nucleótidos que contienen al menos una timina (T), no mostrado, para evitar la interferencia con las proteínas que regulan el ARNm de procesos normales en la célula. El experto en la materia conoce bien esta técnica. Con estos dímeros terminales los oligonucleótidos tienen 21 pares de bases, lo que permite un mecanismo eficaz de ARNi. La secuencia antisentido (a) también tiene una molécula de Cy3 para permitir su visión en microscopía confocal.
- 10 Para la infusión de los ARNip, ratones C57B1/6NcrI machos se anestesiaron profundamente con isoflurano y se colocaron en un adaptador de ratones (Stoelting, ref. 51625) unido a un marco estereotáxico con lectura con indicador digital (David Kopf Instruments, modelo 940). Después de realizar un agujero en el cráneo con una aguja estéril de 21 G x 38,1 mm, la jeringuilla de inyección (Hamilton de 10 µl) administró 2 µl de la solución de ARNip ARNip-NLF-SS-Cy3 en agua destilada (dosis total 100 µg) o vehículo en el ventrículo lateral derecho (desde el bregma AP +0,26, L -0,75 DV -2,5) por medio de una bomba de jeringuilla (KD Scientific, KDS 310) a una velocidad de flujo constante de 0,5 µl/min (n=2 para cada punto temporal). La aguja se dejó en el lugar durante 3 minutos para evitar flujo hacia arriba de la solución de ARNip.
- 15 Los ratones se perfundieron con PFA al 4% a dos puntos temporales diferentes, 1 y 3 horas después de la administración del ARNip. Los cerebros se disecaron y se posfijaron en una solución de PFA al 4% durante 24 horas a 4°C. Después los cerebros se colocaron en una solución de sacarosa al 30% durante 48 horas a 4°C. Los cerebros se congelaron en 2-metilbutano de -30 a -40°C y se almacenaron a -80°C. Los cerebros se seccionaron en un criostato Leica CM3050 S (30 mm). Las secciones en flotación libre se lavaron y almacenaron a 4°C en PBS 0,1 M y azida sódica al 0,001%.
- 20 Las secciones se lavaron en PBS, se bloquearon con suero de cabra al 2% y Triton al 0,1% y se incubaron con anticuerpo anti-TH (1:800, ratón) durante la noche a 4°C. Después de lavar, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 647 (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, las secciones se montaron con medio de montaje de fluorescencia de Dako y se analizaron usando un microscopio confocal espectral (FV1000 Olympus). Se generaron fotos usando FV10-ASW 1.7 Viewer.
- 25 Como se puede ver en las figuras 17 y 18, después de 1 hora de infusión icv, algunas células positivas para TH en la pars compacta de la sustancia negra y el locu cerúleo también eran positivas para Cy3. No todas las células positivas para TH fueron positivas para Cy3, pero un gran porcentaje de ellas tenía fluorescencia de Cy3 en el interior lo que indica que la molécula de ARNip-NLF-SS-Cy3 se incorporó en algunas neuronas positivas para TH.

#### EJEMPLO 13

- 30 Validación de direccionamiento de un gapmero 2-O'-metilmodificado sin sentido marcado con Cy3 conjugado a sertralina a neuronas serotoninérgicas por administración intraventricular
- 35 Se sintetizó un conjugado que comprende un gapmero que comprendía alas de ARN de 3 nucleótidos conteniendo cada una 2-O'-metil y una región gap sin sentido de 10 nucleótidos de longitud con una secuencia no específica (sin sentido). El gapmero se conjuga a sertralina a través de su extremo 5' y a Cy3 a través de su extremo 3'. Los ratones recibieron una única infusión intracerebroventricular (30 µg) del conjugado de Cy3 en el tercer ventrículo dorsal y se sacrificaron 24 horas después de la infusión (n=2 ratones). La localización del marcaje de Cy3 se determinó después por microscopía láser confocal. El experimento muestra (figura 19) que el gapmero se localiza específicamente a neuronas serotoninérgicas.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	nLife Therapeutics S.L.	
5	<120>	COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA DISTRIBUCIÓN SELECTIVA DE MOLÉCULAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA TIPOS ESPECÍFICOS DE NEURONAS	
	<130>	P5518PC00	
10	<150>	EP10382087	
	<151>	19-04-2010	
	<150>	EP11382031	
15	<151>	09-02-2011	
	<150>	US61/325515	
	<151>	19-04-2010	
	<160>	70	
20	<170>	PatentIn versión 3.5	
	<210>	1	
	<211>	70	
25	<212>	ARN	
	<213>	Mus musculus	
	<400>	1	
30		ggugguagug gugguauag ugguggugau ggagaaggaa gaaguggagg aagaguguag	60
		ggcuuacagg	70
	<210>	2	
35	<211>	110	
	<212>	ARN	
	<213>	Mus musculus	
	<400>	2	
40		caacaccaca acgucccugg agcccuucgg gacagggcgc aacgauacug gccucuccaa	60
		cgugaccuuc agcuaccaag ugaucaccuc ucuuuugcug gggacgcuca	110
45	<210>	3	
	<211>	110	
	<212>	ARN	
	<213>	Mus musculus	
50	<400>	3	
		gcccauggcu gcucuguacc aggugcucaa caaguggacu cugggucagg ucaccuguga	60
		ccguuuuauc gcccggaug ugcugugcug cacuucgucc auccugcacc	110
55	<210>	4	
	<211>	2321	
	<212>	ARN	
	<213>	Mus musculus	
60	<400>	4	
		ugauaguugc aauaaccucc ucucuauucg aaaucccau ucuucacgau ggaaguuuuaa	60
		accucggcga uucaaggaag aaaacccaaa cagaaaauau aaacuguaug gacaucuacc	120

ES 2 638 309 T3

	augccacua ggacugccac ccucugcccu auaucuggaa cuuugagguu caagacugcu	180
5	cugucucucc cuccucuuug cucuagaaac aucuguucc uuuggguguc aauguacacu	240
	gcugauucug gucuccaugc acucacggcu ggucugggaa aguuggaacu acuuuggguu	300
	auggugcccu ggaauuguuu gccuugcuga auagcaaaag aucccuucc ccaaugcaca	360
10	gcaccacuu ucuguauuuu guuuguuuu uuguuuuac ucaaaauca gugacaaaga	420
	ugucugcugg aguggacuua uaagcaagaa gccaggccca aaaggaagag ccaagaaggc	480
15	cugcggaugu uuuccugucc uggugucagc acucaccaa gaaauugaca aucagacuau	540
	uuggaaggaa gaguuuuuu ccuguaguuu guuggcuuuu cuguaaguuc uggaaaggcc	600
	uuggugacug cagaaggcgc ccacugcugg ccaggagggg cucauugagg gugcugagau	660
20	gcccgggaur gcucaccuca ccucaguuu cuuuucuagg agugagcuau gccagagcag	720
	cucaccuuga guuugcagcc uccggguucc uccacucacc ucucacagua uccaggagcu	780
25	aguagagaag uuugaguuu ugcaagaggu uggagacuua gaauuucuaa ggaagugugg	840
	gugugaggca cguagaggag guaaggagca aaagggcucc uaagugcuuc caacuccugc	900
	ggcgugccca gggggugggg gugaccuaaa ggggcauuu uaagcauagg augcaaagu	960
30	ucucaauca ccccuuccc cuuuaagga acagcauuu guagcauuuc cuaaaaaugc	1020
	ccggauuuu ucuccgggac auucugugcu cacacaaau ucgcagacu cugggcucuc	1080
35	auugugaagg guaucaacac cucaccuua ccuaccuagg aucuugacu cagagaccua	1140
	aaagagagag cgaucucugu ggagucccag ccaagucagc ccccaauuc ugaggguaaa	1200
	accaguuuug uguccucuca auuuuuaaag cauuuuucuc cguagggggu uuuuuuccug	1260
40	cuguuuuuu ugcuguccca cccccaccuc agagaagaaa auuuuuuagg ugcuuuuuu	1320
	gaauguacau uucuagcuua gugagagggc aucaauuggu uuugcguuu aucugaacuu	1380
45	cgaauuuuc guugaauuu gguuuccuuu ucaagcauu auacggagau uuuuuuacc	1440
	ccccauccc uucagcugua uuuuucau gucugcaccu gcuguuuuga aaaccgugc	1500
	ugcauuuuu uuuuuuuugc caaaguugcu ggugagacu ccccuugug uuuuuuaca	1560
50	gggagaaagg acugccugc cacaugaagc cauuguuuu auuuuuuuu cugagcaaag	1620
	uuuuuuugc ucuacucua agugggaaug aguauuacag ucccuugca cagagccauu	1680
55	ucagaauua agccuguagg guguccacac cugagagacu gacagggggu ucuguggaga	1740
	agacgcacug ggcugggcu cuccaguaca aacaguacu guuuuuuuu uuagcuugcu	1800
	uuuuuuuuu guuuuuuuu uuuuuuuaca caaaaugaa guagaacuau augccaaau	1860
60	aaauuuuuu uguauucuu acuuuuuuu gaccagauca uuuuuuuuu auuuuuuuu	1920
	uuuuuuuuu auuuuuuuu cccuuuuuuu cagauguuuu auuuuuuuu aagaccucua	1980
	acuuccaguu cucuguuuu uuuuuuuucc auuuuuuuu guuuuuuuu gauggggggag	2040

ES 2 638 309 T3

	gggc <u>auugcu</u> cuuguuacuu ugagaaagag acuuuaaaca agacuggaaa gggggcacc	2100
5	agcuggaaua uauugccaa guaa <u>uagagc</u> aaucagagaa cuaagugcaa caugccgcac	2160
	agcucuaaag aaccc <u>ugau</u> gcuuguuuua uuuuaaaaua cuuguauuac aguaaaaugu	2220
	uaaugcauca aaauuggccu ucacuuuucc uugugauauu aaaggacuuu aguaauggca	2280
10	augcuguaau aaacuaagac caguaaccua uauguaccuu u	2321
	<210> 5	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Cadena sentido de un ARNip específico de 5-HT1A de ratón	
	<400> 5	
	ggaagagugu agggcuuac	19
25	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Cadena antisentido de un ARNip específico de 5-HT1A de ratón	
	<400> 6	
35	guaagccua cacucuucc	19
	<210> 7	
	<211> 19	
40	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cadena sentido de un ARNip específico de 5-HT1A de ratón	
45	<400> 7	
	cgauacuggc cucuccaac	19
50	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Cadena antisentido de un ARNip específico de 5-HT1A de ratón	
	<400> 8	
	guuggagagg ccaguaucg	19
60	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	

ES 2 638 309 T3

	<220>		
	<223>	Cadena sentido de un ARNip específico de 5-HT1A de ratón	
5	<400>	9 ggugcucaac aaguggacu	19
10	<210>	10	
	<211>	19	
	<212>	ARN	
	<213>	Artificial	
15	<220>		
	<223>	Cadena antisentido de un ARNip específico de 5-HT1A de ratón	
	<400>	10 aguccacuug uugagcacc	19
20	<210>	11	
	<211>	19	
	<212>	ARN	
	<213>	Artificial	
25	<220>		
	<223>	Cadena sentido de un ARNip específico de 5-HT1A de ratón	
30	<400>	11 cgauggaagu uuaaaccuc	19
35	<210>	12	
	<211>	19	
	<212>	ARN	
	<213>	Artificial	
40	<220>		
	<223>	Cadena antisentido de un ARNip específico de 5-HT1A de ratón	
	<400>	12 gagguuuaaa cuuccaucg	19
45	<210>	13	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	Cadena sentido para un ARNip específico de SERT	
55	<400>	13 cuccuggaac acuggcaact t	21
60	<210>	14	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Cadena sentido para un ARNip específico de sinucleico	

	<400> 14 gcuagcuaca acaaguucat t	21
5	<210> 15 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cadena antisentido para un ARNip específico de SERT	
15	<400> 15 ugaacuuguu guagcuagct t	21
20	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip de alfa-sinucleína	
30	<400> 16 ggaaagacaa aagaggugtt	20
35	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip de alfa-sinucleína	
45	<400> 17 ggaaagacaa aagaggugtt	20
50	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> ARNip de alfa-sinucleína	
60	<400> 18 ggaggaauuu uagaagaggt t	21
	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip de alfa-sinucleína	
	<400> 19 uguuggagga gcaguggugt t	21

ES 2 638 309 T3

	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> GGACCAGUUGGGCAAGAAUTT	
	<400> 20	
10	ggaccaguug ggcaagaaut t	21
	<210> 21	
	<211> 63	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> antisentido de horquillas de alfa-sinucleína	
20	<400> 21	
	gatccccgga ccagttgggc aagaattca agagaattct tgccaactgg tccttttgg	60
	aaa	63
25		
	<210> 22	
	<211> 64	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> antisentido de horquilla de alfa-sinucleína	
35	<400> 22	
	ctagttcca aaaaggacca gttgggcaag aattctctg aaattcttgc ccaactggtc	60
	cggg	64
40		
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> ARNip de sinucleína	
	<400> 23	
50	gguguggcaa caguggcuga g	21
	<210> 24	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip de sinucleína	
60	<400> 24	
	aacaguggcu gagaagacca a	21

5	<210> 25 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip de sinucleína	
10	<400> 25 auugcagcag ccacuggcuu u	21
15	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip de sinucleína	
	<400> 26 aagugacaaa uguuggagga g	21
25	<210> 27 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> ARNip de sinucleína	
35	<400> 27 gaagaaggag cccacagga a	21
40	<210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> ARNip de sinucleína	
	<400> 28 cgggugugac agcaguagct t	21
50	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> ARNip de sinucleína	
	<400> 29 uccugacaa u gaggcuuaut t	21
60	<210> 30 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	

	<220>		
	<223>	ARNip de sinucleína	
5	<400>	30 uccugacaau gaggcuuaut t	21
10	<210>	31	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
15	<220>		
	<223>	ARNip de sinucleína	
	<400>	31 cuacgaaccu gaagccuaat t	21
20	<210>	32	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
25	<220>		
	<223>	ARNip de sinucleína	
30	<400>	32 cuacgaaccu gaagccuaat t	21
35	<210>	33	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
40	<220>		
	<223>	ARNip de sinucleína	
	<400>	33 cuacgaaccu gaagccuaat t	21
45	<210>	34	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	ARNip de sinucleína	
	<400>	34 cuauuguaga guggcuuaut t	21
55	<210>	35	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
60	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	ARNip de sinucleína	

ES 2 638 309 T3

	<400> 35 cuaugagccu gaagcuaatt	20
5	<210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip de sinucleína	
15	<400> 36 cuaugagccu gaagccuaat t	21
20	<210> 37 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip de dopamina beta-hidroxilasa	
30	<400> 37 gaccacguac uggugcuaca uta	23
35	<210> 38 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip de BAX	
45	<400> 38 ucgauccugg augaaaccct g	21
50	<210> 39 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> ARNip de tau	
60	<400> 39 aatcacaccc aacgtgcaga a	21
	<210> 40 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip de tau	
	<400> 40 aactggcagt tctggagcaa a	21

	<210> 41	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> ARNip de tau (sentido)	
	<400> 41	
10	tcgaagtgat ggaagatcac gc	22
	<210> 42	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip de tau (antisentido)	
20	<400> 42	
	cttcactacc ttctagtgcg ac	22
	<210> 43	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> ARNip de tau (sentido)	
	<400> 43	
35	cagccgggag tcggcaaggt gc	22
	<210> 44	
	<211> 22	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip de tau (antisentido)	
45	<400> 44	
	cggccctcag ccctccacg tc	22
	<210> 45	
50	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> ARNip de tau (sentido)	
	<400> 45	
	acgtcctcgg cggcggcagt gtgc	24
60	<210> 46	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

	<220>		
	<223>	ARNip de tau (antisentido)	
5	<400>	46 caggcgctg cggcgtcaca cgtt	24
	<210>	47	
10	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
15	<223>	ARNip de tau (sentido)	
	<400>	47 acgtctccat gccatctcag c	21
20	<210>	48	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
25	<220>		
	<223>	ARNip de tau antisentido	
	<400>	48 ttgctgagat gccatggaga c	21
30	<210>	49	
	<211>	22	
35	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	ARNip de tau (sentido)	
40	<400>	49 gtggccagat ggaagtaaaa tc	22
45	<210>	50	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	ARNip de tau (antisentido)	
	<400>	50 ccggtctacc tcattttag ac	22
55	<210>	51	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
60	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	ARNip de tau (sentido)	

ES 2 638 309 T3

	<400> 51 gtggccagat gcaagtaaaa tc	22
5	<210> 52 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip de tau (antisentido)	
15	<400> 52 ccggctctacg ttcattttag ac	22
20	<210> 53 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip de tau	
25	<400> 53 ggttcagcca tgctgctca aagcc	25
30	<210> 54 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> ARNip de tau	
40	<400> 54 tgataatcga caggaggcga ggaca	25
45	<210> 55 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> ARNip de Huntingtina	
50	<400> 55 aagaggagga ggccgacgcc c	21
55	<210> 56 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> ARNip sin sentido	
60	<400> 56 aguacugcuu acgauacgg	19

ES 2 638 309 T3

5	<210> 57 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip sin sentido	
10	<400> 57 ccguaucgua agcaguacu	19
15	<210> 58 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip específico de nNOS	
20	<400> 58 caaagagatc gacaccatc	19
25	<210> 59 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> ARNip específico de nNOS	
35	<400> 59 gatggtgctg atctcttgt t	21
40	<210> 60 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip específico de nNOS	
45	<400> 60 cacgcatgctc tggaaaggc	19
50	<210> 61 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip específico de nNOS	
55	<400> 61 gccttccag acatgcgtgt t	21
60	<210> 62 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	

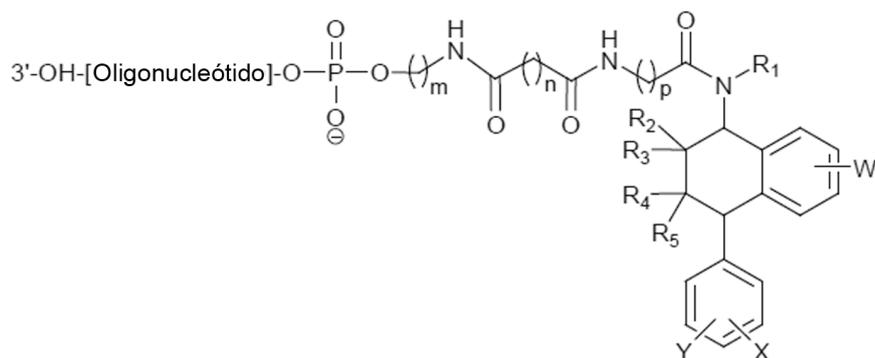
	<220>		
	<223>	ARNip específico de nNOS	
5	<400>	62 ggctatcca atgtccaca	19
10	<210>	63	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
15	<220>		
	<223>	ARNip específico de nNOS	
	<400>	63 tgtggacatt gtagacct t	21
20	<210>	64	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
25	<220>		
	<223>	ARNip específico de iNOS	
30	<400>	64 ccaccagtat gcaatgaat	19
35	<210>	65	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
40	<220>		
	<223>	ARNip específico de iNOS	
	<400>	65 acaacaggaa ccuaccagct t	21
45	<210>	66	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	ARNip específico de iNOS	
	<400>	66 gcugguaggu uccuguugut t	21
55	<210>	67	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
60	<220>		
	<223>	antisentido específico de iNOS	
	<400>	67	

# ES 2 638 309 T3

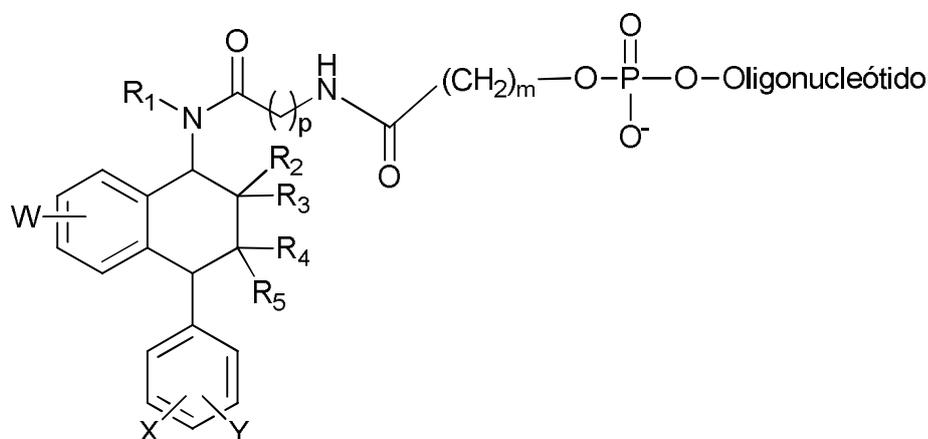
	acagctcagt ccctcacca a	21
5	<210> 68 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> antisentido específico de iNOS	
	<400> 68 ttgccttat actgttc	18
15	<210> 69 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip sin sentido	
25	<400> 69 aguacugcuu acgauacgg	19
30	<210> 70 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> ARNip sin sentido	
	<400> 70 ccguaucgua agcaguacu	19

**REIVINDICACIONES**

1. Un conjugado que comprende:
- 5 i) al menos un agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor, en donde el agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), un inhibidor de la recaptación de noradrenalina (IRN), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND) y
- 10 ii) al menos un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador de neurotransmisor,
- donde la unión del ácido nucleico a la molécula diana produce la inhibición de la actividad de la molécula diana.
2. El conjugado según 1 en donde la secuencia de ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador del neurotransmisor se selecciona del grupo que consiste en un oligonucleótido ARN bicatenario de interferencia, un oligonucleótido antisentido, un gámpero, un APN, un LNA, una ribozima y un aptámero.
- 15 3. Un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde el agente de selectividad se conjuga al extremo 5' del oligonucleótido.
4. Un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el agente de selectividad y el oligonucleótido están unidos por un grupo enlazador.
- 20 5. Un conjugado como se define en la reivindicación 4 que comprende además una segunda secuencia de oligonucleótido que es complementaria a la primera secuencia de oligonucleótido.
6. Un conjugado como se define en la reivindicación 2 en donde el ARN de interferencia es un ARNip.
7. Un conjugado como se define en la reivindicación 6 que comprende además un grupo protector que está unido al extremo 5' del segundo oligonucleótido.
- 25 8. Un conjugado como se define en la reivindicación 7 en donde el grupo protector unido al extremo 5' del segundo oligonucleótido tiene la estructura
- $$M-L1_d-[(A-L2)_a-(B-L3)_b]_c-$$
- en donde:
- M es H o un grupo lipídico
- 30 A y B representan unidades monoméricas seleccionadas independientemente del grupo que consiste en un monosacárido y un alquilenglicol (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>);
- a y b son números enteros que varían de 0 a 50;
- c es un número entero que varía de 0 a 30;
- 35 L1, L2 y L3 son compuestos enlazadores independientemente seleccionados del grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, carbamato, metilfosfonato, guanidinio, sulfamato, sulfamida, formacetal, tioformacetal, sulfona, amida y mezclas de los mismos;
- d es 0 ó 1.
9. El conjugado según la reivindicación 8 en donde el monosacárido se selecciona del grupo que consiste en furanosa, fructosa, furanosa, glucosa, galactosa, manosa, un monosacárido modificado, ácido siálico y eritrosa.
- 40 10. El conjugado según la reivindicación 8 o la reivindicación 9 en donde el alquilenglicol (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>) se selecciona del grupo que consiste en etilenglicol, propilenglicol y mezclas de los mismos.
11. El conjugado según la reivindicación 10, en donde M es H, A es una furanosa; B es un etilenglicol de C<sub>18</sub>; a, b y c son 1, d es 0 y L2 y L3 son enlaces fosfodiéster.
- 45 12. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en la estructura (I) o (II)



(I)



(II)

5 en donde

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo de  $C_1$ - $C_6$ ;

X e Y se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo de  $C_1$ - $C_3$ , haloalquilo de  $C_1$ - $C_3$ ,  $OR^a$  y  $SR^b$ , en donde  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan independientemente de alquilo de  $C_1$ - $C_3$  y arilo de  $C_6$ - $C_{10}$ ;

10 W se selecciona de hidrógeno, halógeno, CN,  $NO_2$ , alquilo de  $C_1$ - $C_3$ , haloalquilo de  $C_1$ - $C_3$ ,  $NR^cR^d$ ,  $SO_2NR^eR^f$ ,  $NR^gSO_2R^h$ ,  $CO_2R^i$ , en donde  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^g$ ,  $R^h$  y  $R^i$  se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo de  $C_1$ - $C_3$ ;

m, n y p se seleccionan de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, en donde la suma de  $m+n+p$  es un número entero seleccionado de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

13. Un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 seleccionado del grupo de:

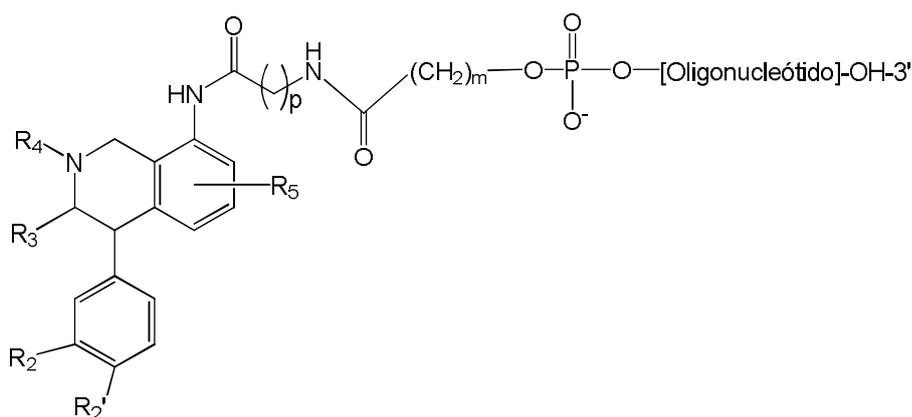
15 (i) un conjugado en donde el agente de selectividad es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) y la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en el receptor de serotonina de tipo 1A ( $5-HT_{1A}$ ), el ARNm que codifica el receptor de serotonina de tipo 1A ( $5-HT_{1A}$ ), la proteína transportadora de serotonina y el ARNm que codifica el transportador de serotonina;

20 (ii) un conjugado en donde el agente de selectividad se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND) y la molécula diana es alfa-sinucleína o el ARNm que codifica alfa-sinucleína;

25 (iii) un conjugado en donde el agente de selectividad es un inhibidor de la recaptación de norepinefrina (IRN) y en donde la molécula diana es la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa o el ARNm que codifica la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa;

- (iv) un conjugado en donde el agente de selectividad se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND) y la molécula diana es BAX o el ARNm que codifica BAX;
- (v) un conjugado en donde el agente de selectividad se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND) y la molécula diana es tau o el ARNm que codifica tau; y
- (vi) un conjugado en donde el agente de selectividad se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND) y la molécula diana es huntingtina o el ARNm que codifica huntingtina.

10 14. Un conjugado según la reivindicación 13 en donde el conjugado tiene la estructura



15. Un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en medicina.

16. Un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde

(i) el agente de selectividad es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), y

15 (ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana seleccionada del grupo del ARNm que codifica el receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT1A), el ARNm que codifica el transportador de serotonina, el receptor de serotonina de tipo 1A (5-HT1A) y el transportador de serotonina

para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno relacionado con depresión.

20 17. Un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde

(i) el agente de selectividad se selecciona del grupo de un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND) y un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND) y

(ii) el oligonucleótido es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que es el ARNm que codifica la alfa-sinucleína o el polipéptido alfa-sinucleína

25 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy.

18. Un conjugado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 en donde el conjugado se administra por vía intracerebroventricular o intranasal.

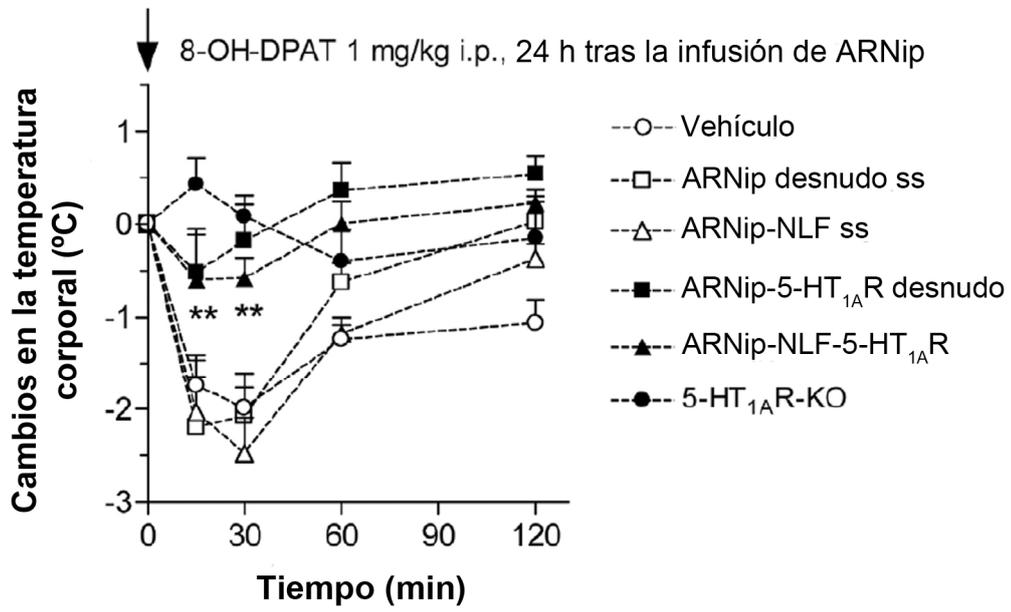


FIGURA 1

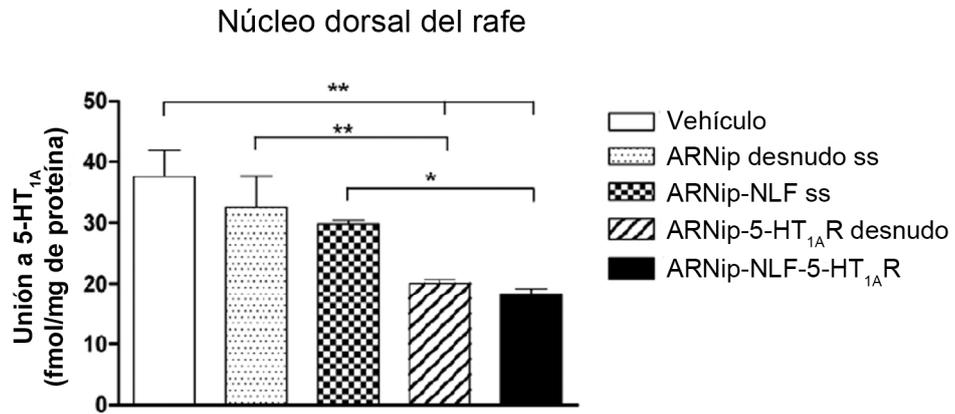


FIGURA 2

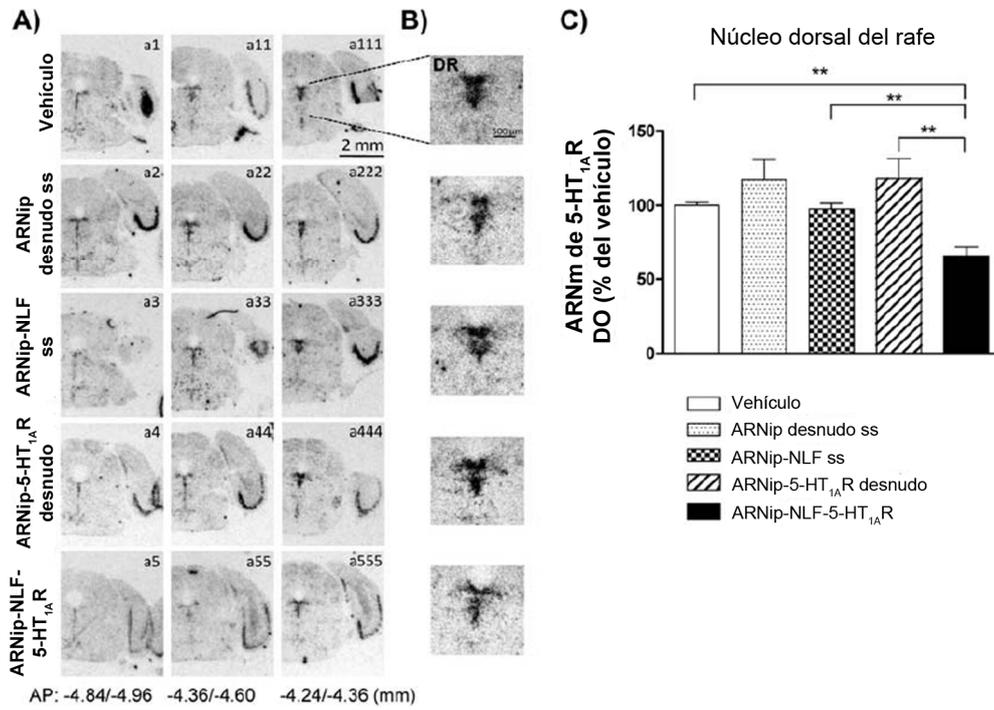


FIGURA 3

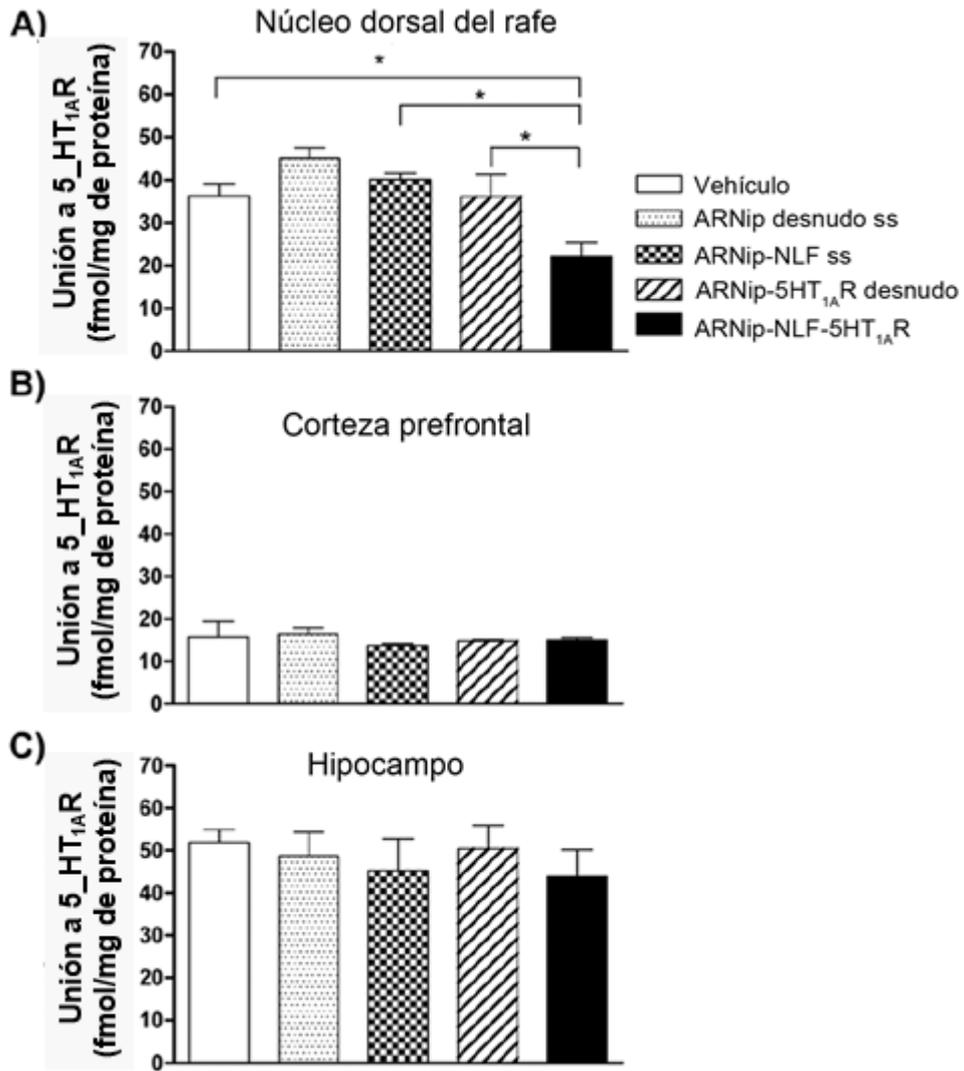


FIGURA 4

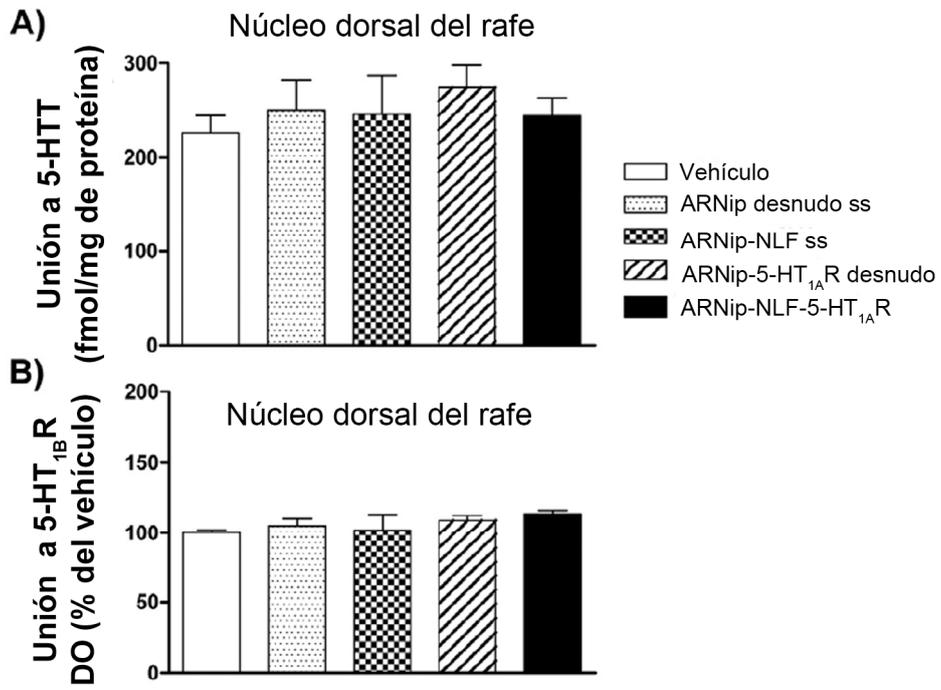


FIGURA 5

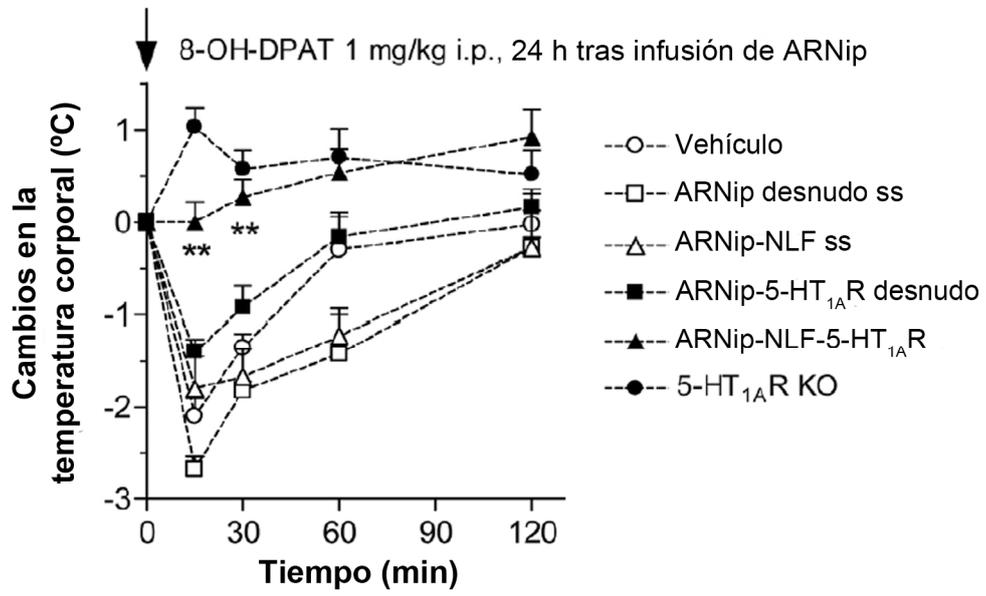


FIGURA 6

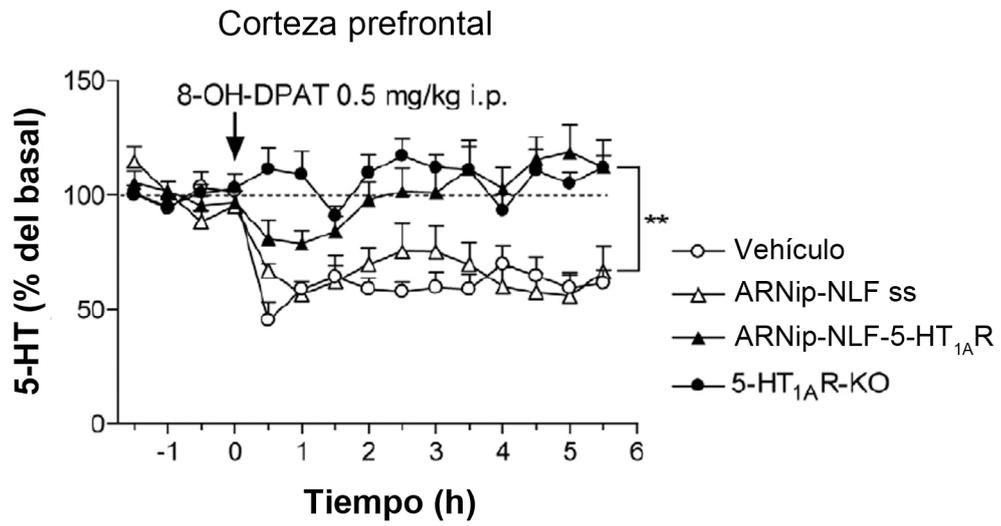


FIGURA 7

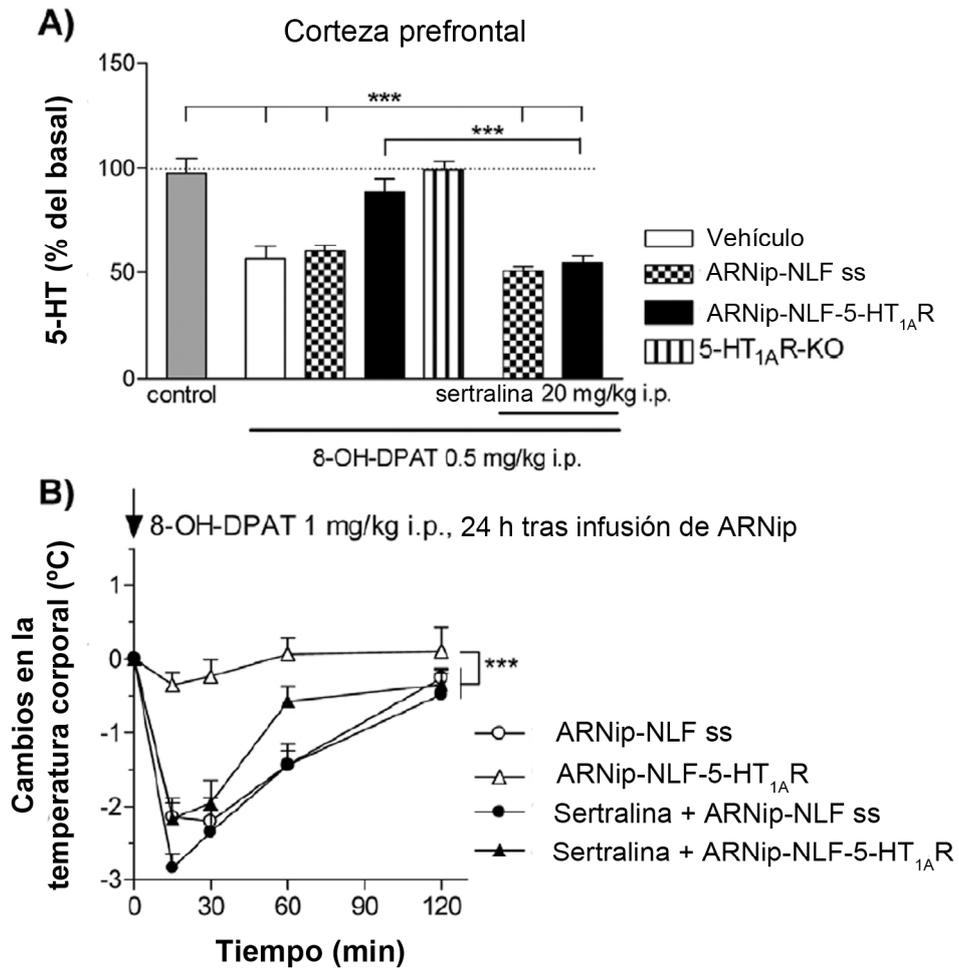
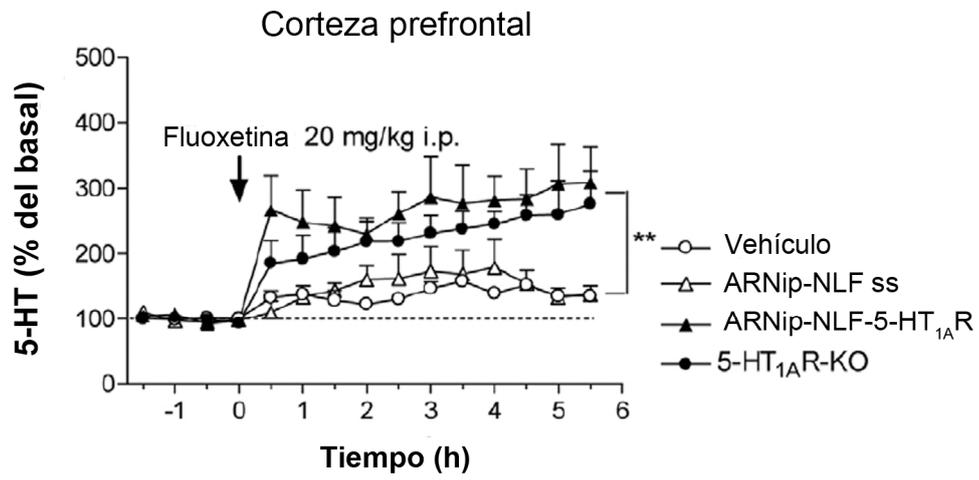


FIGURA 8



**FIGURA 9**

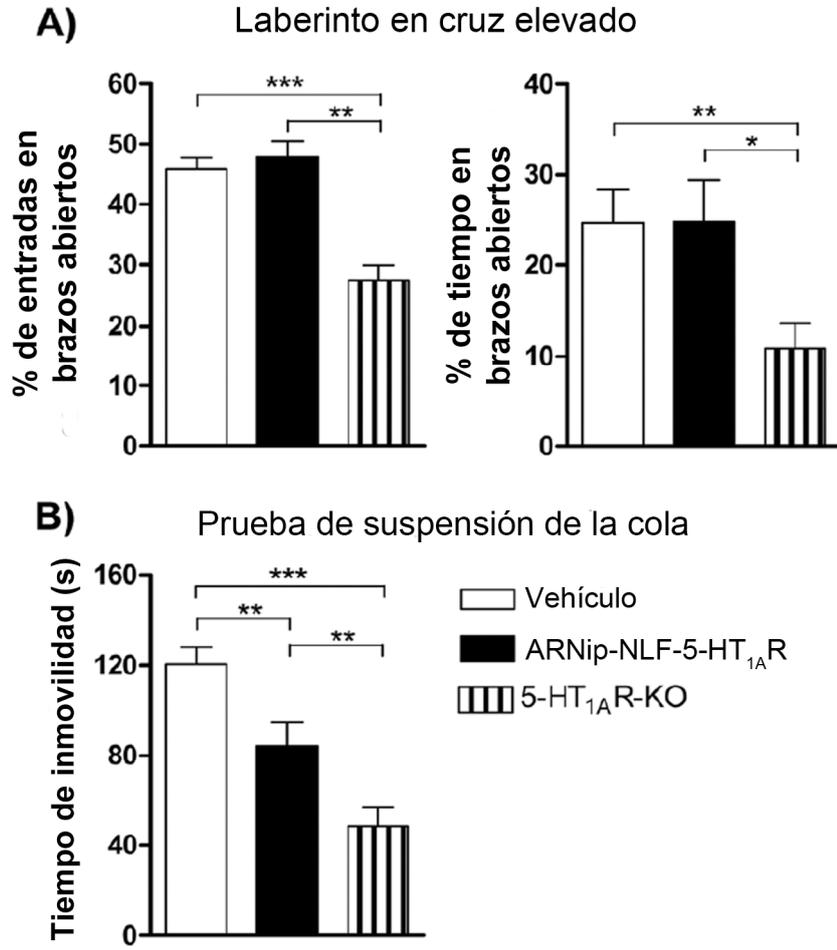


FIGURA 10

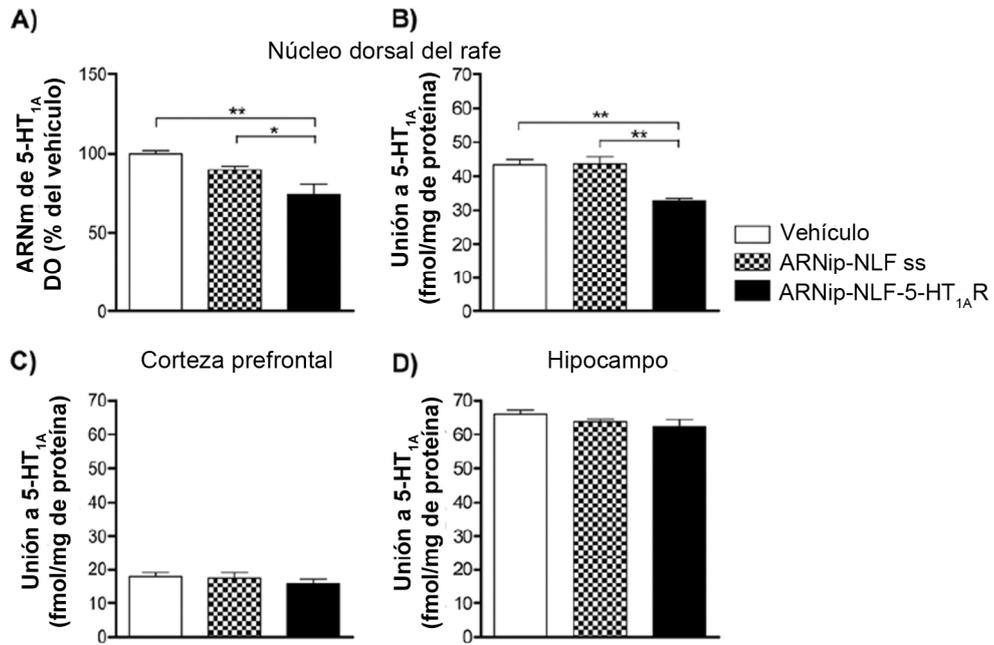


FIGURA 11

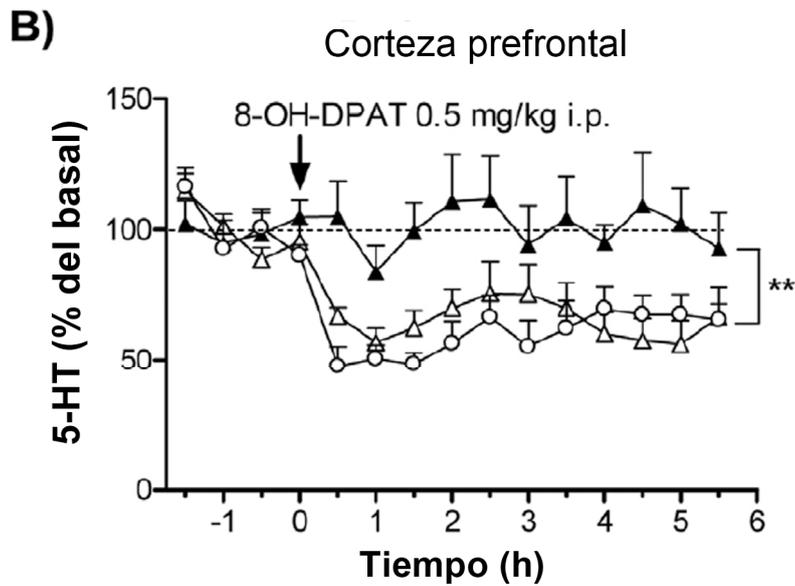
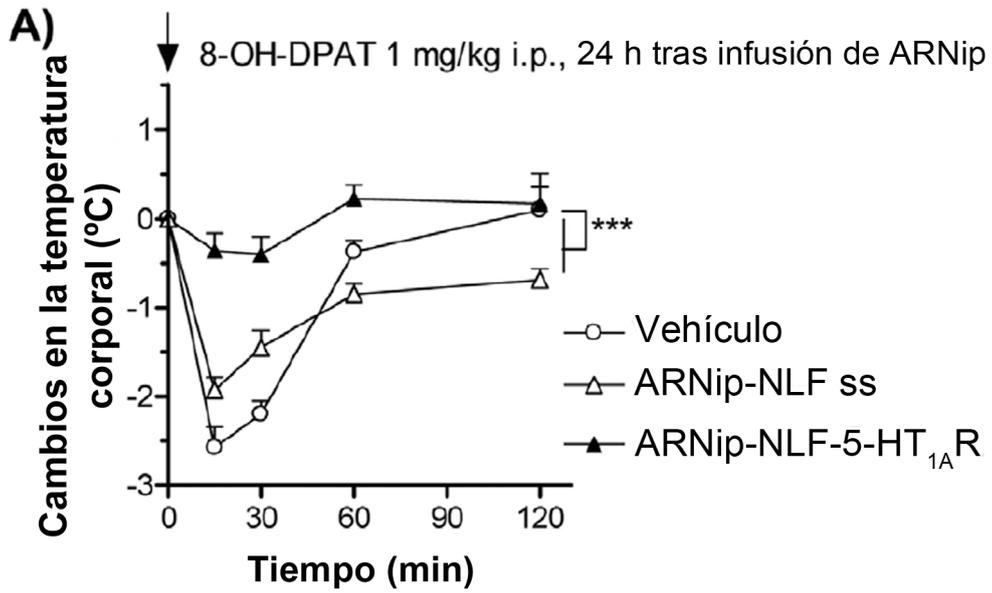
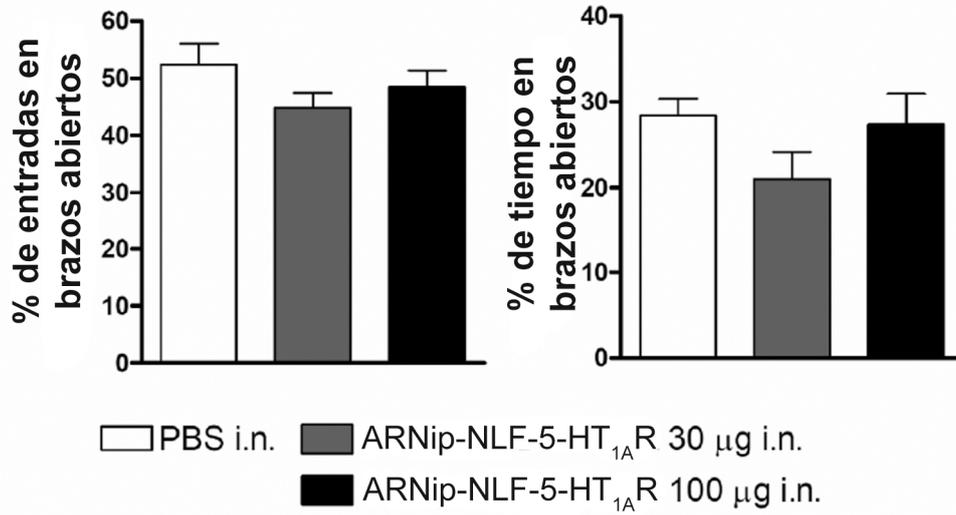


FIGURA 12

A)

### Laberinto en cruz elevado



B)

### Prueba de suspensión de la cola

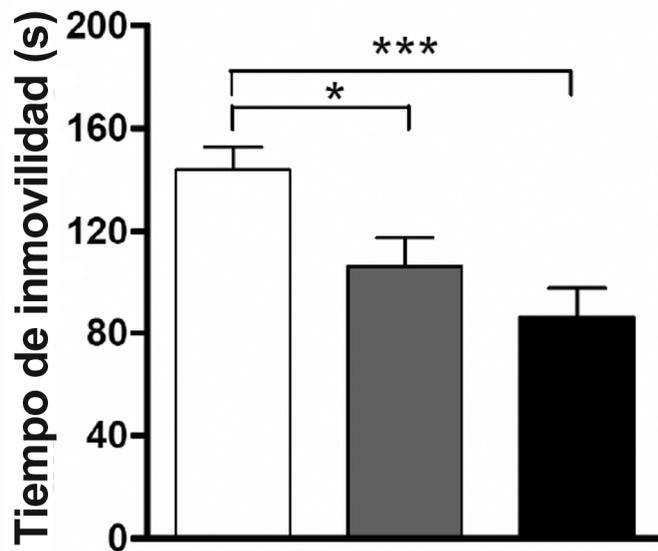


FIGURA 13

c)

### Prueba de natación forzada

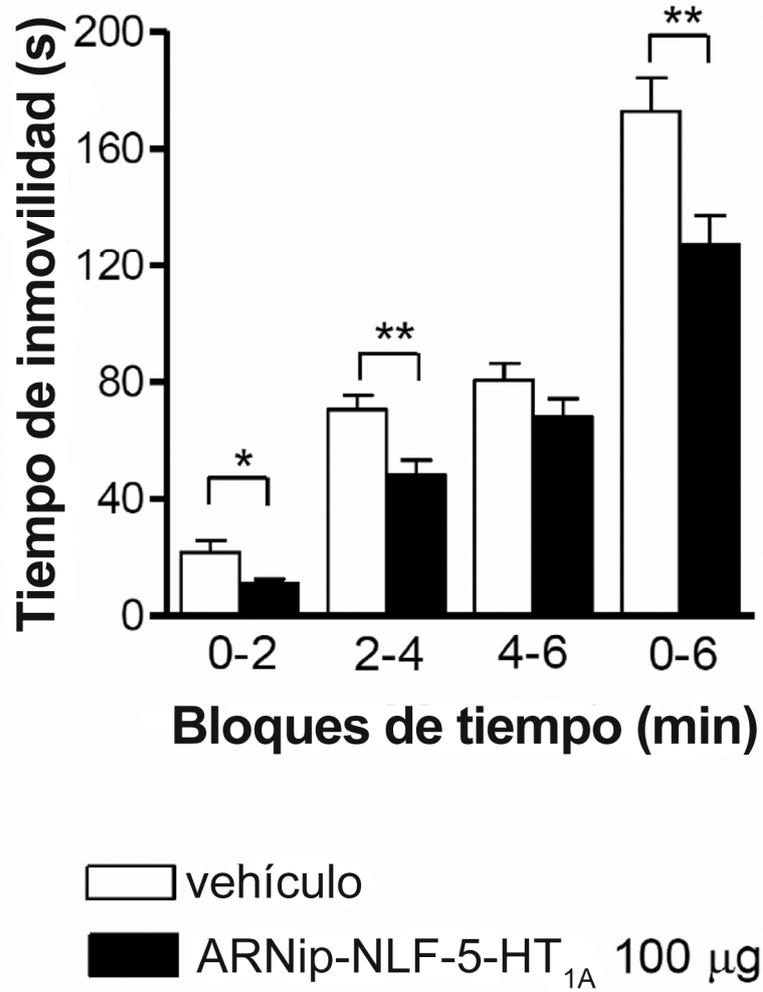
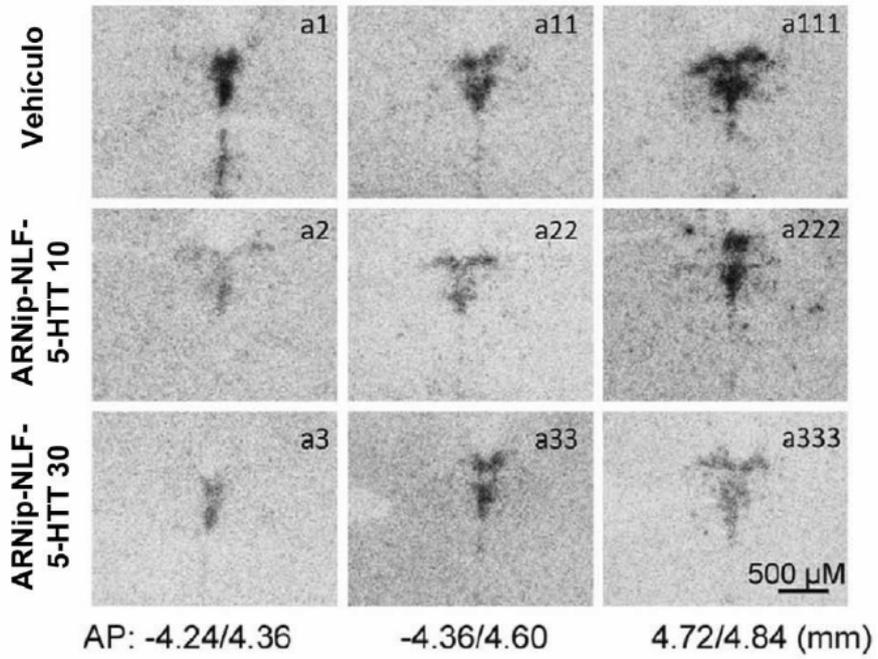


FIGURA 13 (cont.)

**A) DR - ARNm de transportador de 5-HT**



**B)**

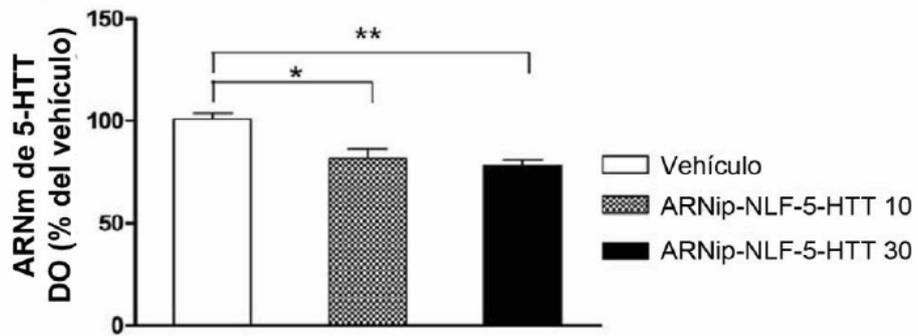


FIGURA 14

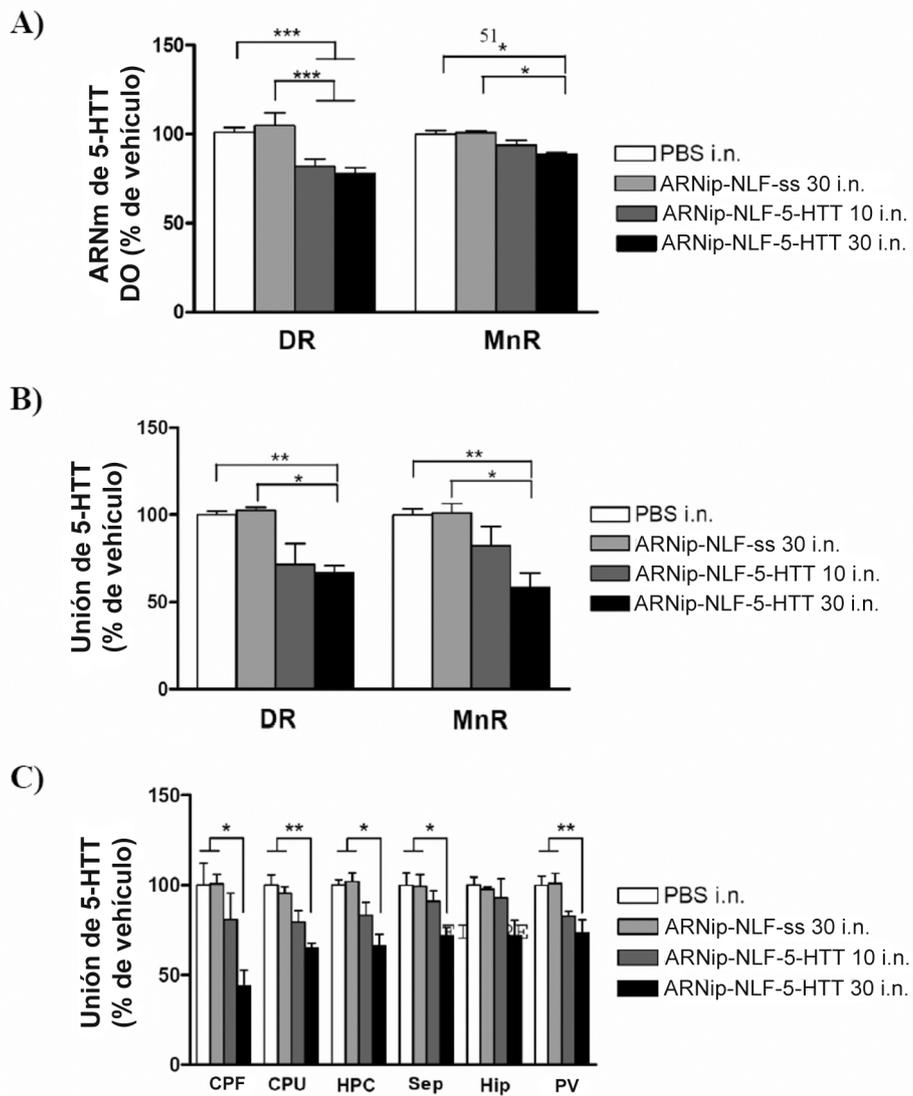


FIGURA 15

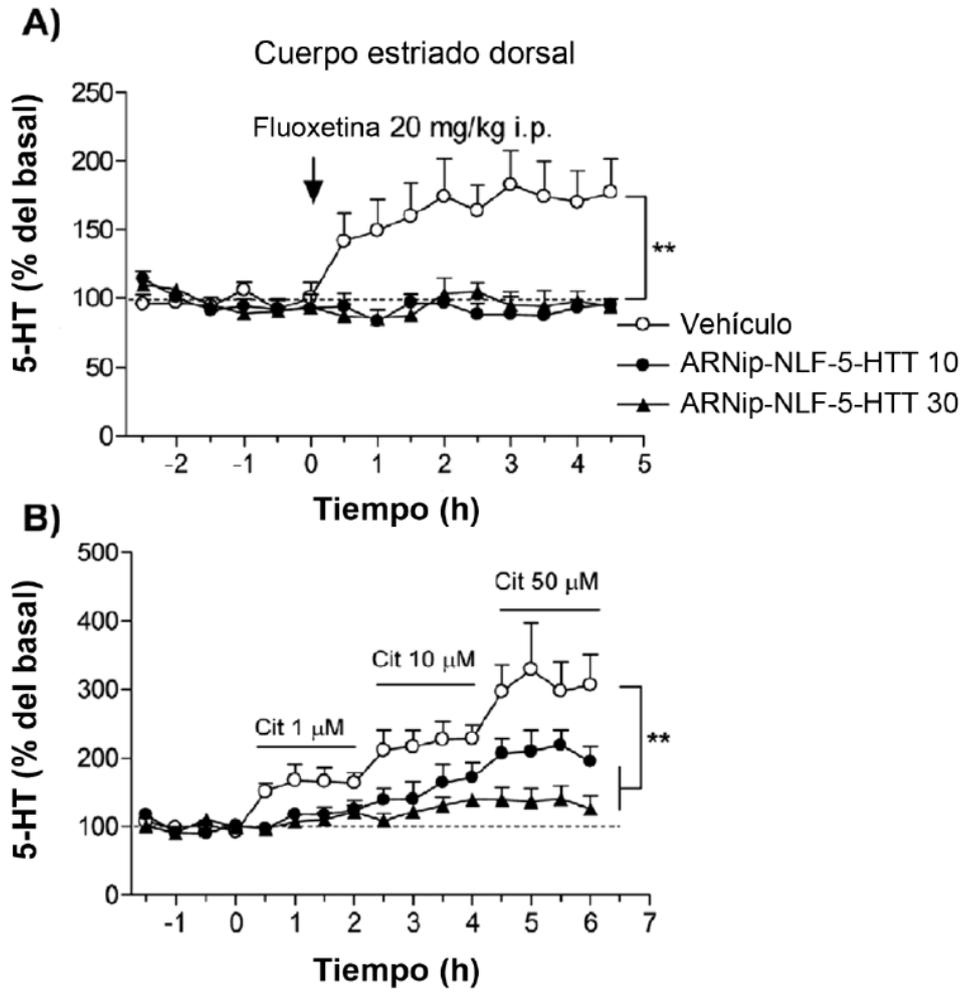


FIGURA 16

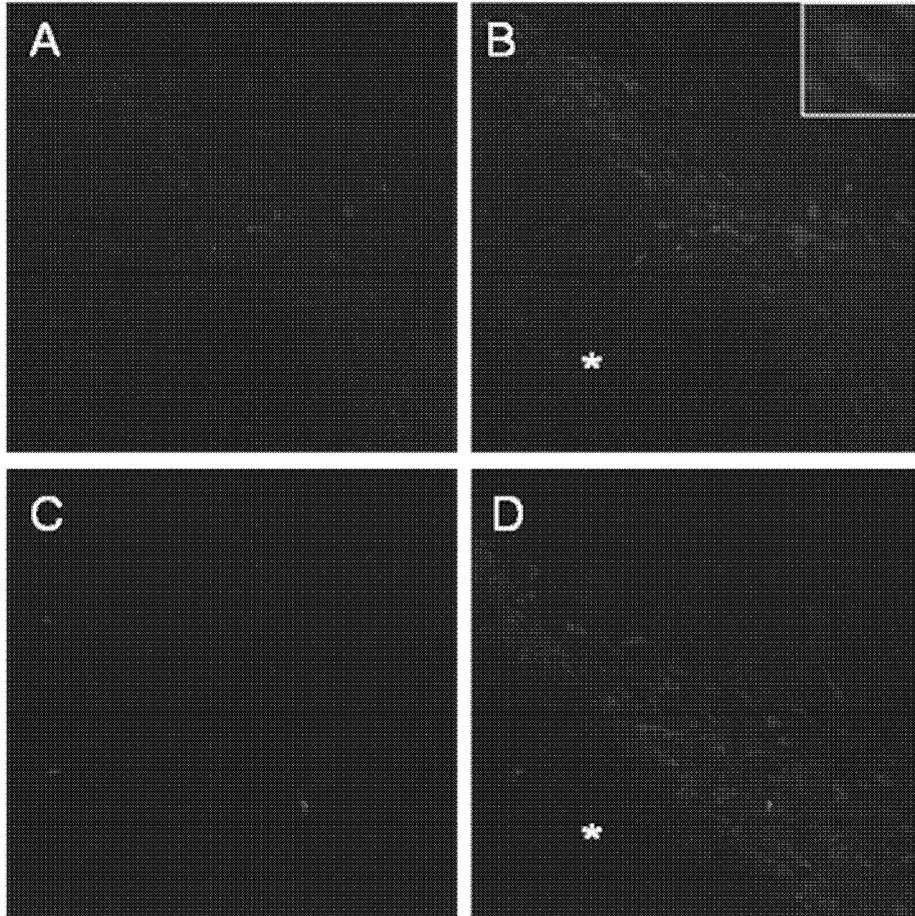


FIGURA 17

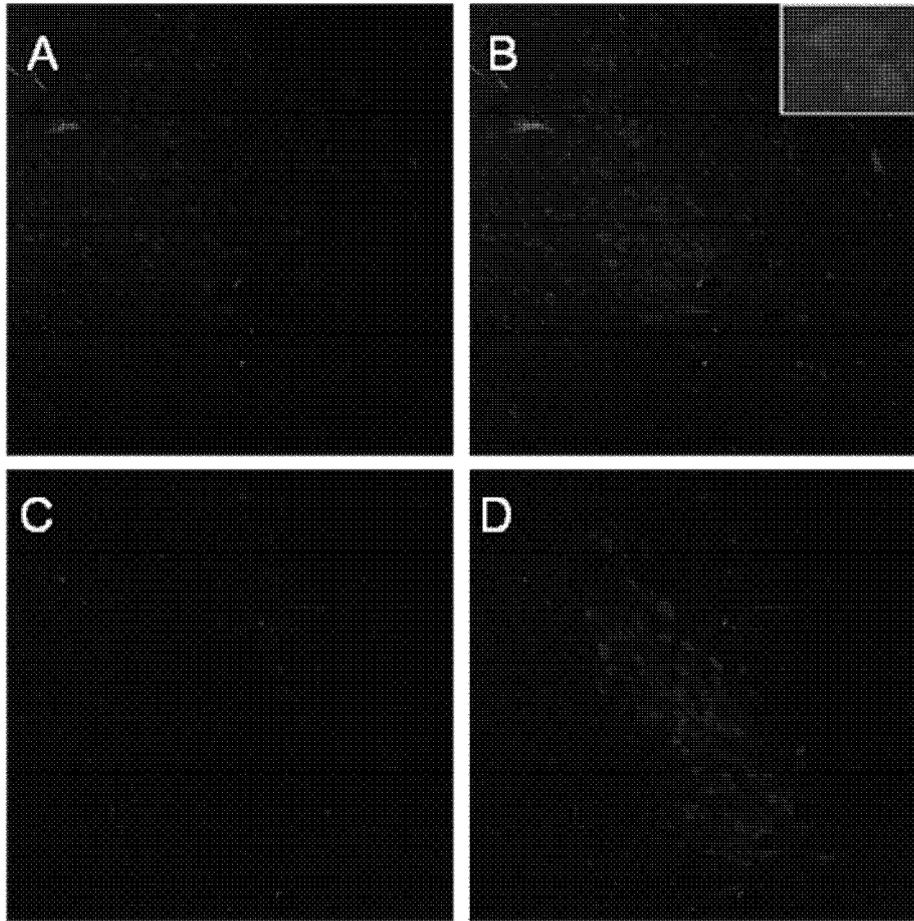


FIGURA 18

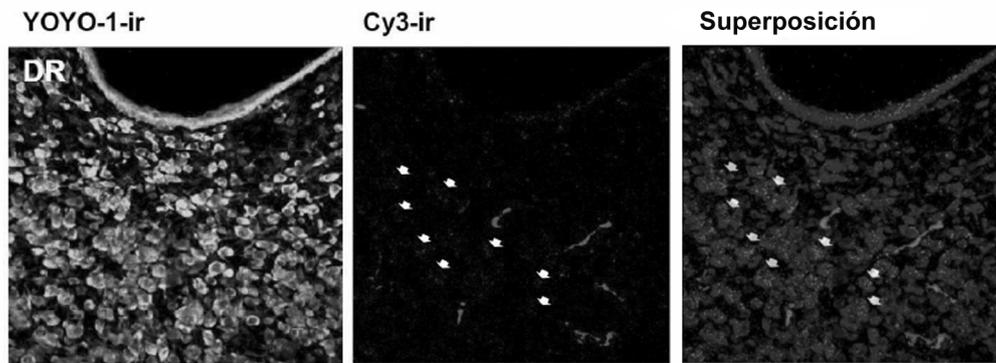


FIGURA 19