

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 929**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012 PCT/US2012/068606**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13086441**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12805882 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2788487**

54 Título: **Análogos oligonucleotídicos dirigidos a LMNA humana**

30 Prioridad:

08.12.2011 US 201161568590 P

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

05.07.2018

73 Titular/es:

**SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
215 First Street
Cambridge, MA 02142 , US**

72 Inventor/es:

**KOLE, RYSZARD y
BESTWICK, RICHARD, KEITH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 674 929 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

Análogos oligonucleotídicos dirigidos a LMNA humana

5 Antecedentes

Campo técnico

La presente invención se refiere en general a compuestos de antisentido dirigidos a lamina A humana.

10 Descripción de la técnica relacionada

15 El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) es un trastorno genético infrecuente caracterizado por arterioesclerosis prematura y degeneración de las células del músculo liso vascular (SMC). El HGPS se manifiesta de forma muy destacable como envejecimiento prematuro en niños afectados. Los niños con HGPS tienen síntomas progresivos tales como retardo del crecimiento, alopecia, pérdida de grasa subcutánea y anomalías óseas. La esperanza de vida promedio es de 12 años, siendo la causa más común de muerte el infarto de miocardio o apoplejía.

20 La mayoría de los casos de HGPS están causados por una mutación puntual en el gen de la lamina A (LMNA), que provoca la generación de progerina, un mutante de corte y empalme truncado de lamina A. La mutación puntual es una sustitución silenciosa *de novo* (1824C>T, Gly608Gly) en el exón 11 del gen de la lamina A (LMNA). La sustitución activa un sitio donador de corte y empalme críptico, que da lugar a la producción de una proteína lamina A mutante negativa dominante con una eliminación interna de 50 aminoácidos. La proteína mutante, llamada progerina, se acumula en la membrana nuclear, causando vesiculación nuclear característica ((Scaffidi y Misteli 2005; Cao, Blair et al. 2011)).

30 Se sabe que el corte y empalme aberrante puede corregirse usando oligonucleótidos de fosforodiamidato morfolino (PMO), o más específicamente, oligonucleótidos de cambio de corte y empalme (SSO). Los SSO bloquean los sitios de corte y empalme aberrantes hibridando en o cerca de los sitios, evitando de ese modo el reconocimiento por la maquinaria celular de corte y empalme. Los SSO preferentes son resistentes a las nucleasas y la estructura bicatenaria resultante elimina la posibilidad de escisión del ARN por RNasa H. Se ha demostrado que los SSO reparan de forma eficaz el patrón de corte y empalme tanto *in vitro* como *in vivo* para talasemia y distrofia muscular de Duchenne. (Kinali, Arechavala-Gomez et al. 2009; Svasti, Suwanmanee et al. 2009). Se ha demostrado que el corte y empalme aberrante de LMNA asociado con HGPS se reduce por corrección del evento de corte y empalme aberrante usando oligonucleótidos de antisentido modificados dirigidos al sitio de corte y empalme críptico activado tanto en cultivo celular (Scaffidi y Misteli 2005) y en un modelo animal oportuno (Osorio, Navarro et al. 2011).

40 Dada la función de LMNA en HGPS, se necesitan oligonucleótidos que modulen el corte y empalme del preARNm de LMNA para eliminar la expresión de progerina.

45 Fernando G. Osorio et al., "Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging", Science Translational Medicine, American Association for the Advancement of Science, vol. 3, n.º 106, páginas 145-155 se refiere, en el contexto del síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) a un tratamiento de antisentido basado en morfolino que evita el corte y empalme patógeno de Lmna, reduciendo la acumulación de progerina y sus defectos nucleares asociados.

50 El documento WO 2007/047913 A2 divulga compuestos, composiciones y métodos para modular la expresión de LMNA en una célula, tejido o animal.

Paola Scaffidi et al., "Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome", Nature Medicine, vol. 11, n.º 43, páginas 440-445 se refiere a la corrección del corte y empalme aberrante en el transcrito endógeno de lamina A en células HGPS.

55 Loren G. Fong et al., "Activating the synthesis of progerin, the mutant prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, with antisense oligonucleotides", Human Molecular Genetics, vol. 18, n.º 13, páginas 2462-2471 muestra que los oligonucleótidos de antisentido contra secuencias del exón 11 en dirección 3' desde el sitio donador de corte y empalme del exón 11 promueven un corte y empalme alternativo en fibroblastos tanto de tipo silvestre como HGPS, aumentando la síntesis de progerina.

60 Breve sumario

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

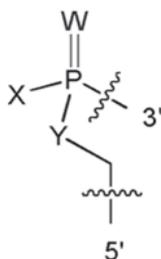
65 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un oligonucleótido de antisentido para reducir la expresión del ARNm de LMNA con corte y empalme anómalo, teniendo el oligonucleótido una estructura sustancialmente no

cargada y estando compuesto de subunidades morfolino y uniones entre unidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono 5'-exocíclico de una subunidad adyacente, que contiene 25-40 bases, y

5 que comprende una secuencia de dirección que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11, 13, 14 y 16,

en el que el oligonucleótido de antisentido se adhiere covalentemente a un péptido de penetración celular y resto conector, en el que el resto conector se selecciona de glicina, cisteína, prolina, ácido 6-aminohexanoico (Ahx), β-alanina (B) y Ahx-B, y el péptido de penetración celular se selecciona de las SEQ ID NO: 39-54.

10 La presente invención también se refiere a un oligonucleótido de antisentido, en el que el oligonucleótido reduce la expresión del ARNm de LMNA con corte y empalme anómalo, comprendiendo el oligonucleótido una estructura, comprendiendo la estructura una secuencia de estructuras cíclicas de morfolino unidas por uniones entre subunidades, uniendo las uniones entre unidades un extremo 3' de una estructura cíclica de morfolino con un extremo 5' de una estructura cíclica de morfolino adyacente, en el que cada estructura cíclica de morfolino se une a un resto de emparejamiento de bases, de modo que el oligonucleótido puede unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico diana, que comprende una secuencia de dirección que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11, 13, 14 y 16, en el que las uniones entre subunidades tienen la siguiente estructura general (I):



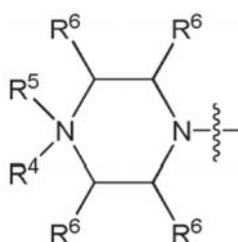
(I)

o una sal o isómero de la misma, y en el que cada una de las uniones (I) entre subunidades son independientemente unión (A) o unión (B):

25 en el que para la unión (A):

W es, en cada caso, independientemente S u O;

X es, en cada caso, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$ o;



(II)

Y es, en cada caso, independientemente O o $-NR^2$,

R^1 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;

R^2 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o $-LNR^4R^5R^7$;

35 R^3 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 ;

R^4 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ o $-[C(O)CHR'NH]_mH$, donde Z es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;

R^5 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones;

40 R^6 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;

R^7 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxilquilo C_1-C_6 ;

L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende grupos alquilo, alcoxi o alquilamino, o combinaciones de los mismos; y en el que para la unión (B):

45 W es, en cada caso, independientemente S u O;

X es, en cada caso, independientemente -NR⁸R⁹ u -OR³; e

Y es, en cada caso, independientemente O o -NR¹⁰, o

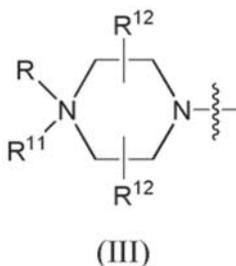
Y y W son cada uno O,

R⁸ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C₂-C₁₂;

R⁹ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aralquilo C₁-C₁₂ o arilo;

R¹⁰ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o -LNR⁴R⁵R⁷;

en el que R⁸ y R⁹ pueden unirse para formar un heterociclo mono- o bicíclico de 5-18 miembros o R⁸, R⁹ o R³ pueden unirse con R¹⁰ para formar un heterociclo de 5-7 miembros, y en el que, cuando X es 4-piprazino, X tiene la siguiente estructura (III):



en la que:

R¹¹ es, en cada caso, independientemente alquilo C₂-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, arilo, heteroarilo o heterociclilo; y

R es, en cada caso, independientemente un par de electrones, hidrógeno o alquilo C₁-C₁₂; y

R¹² es, en cada caso, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, -NH₂, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴R¹⁵, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, oxo, -CN, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonil guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, -SR¹³ o alcoxi C₁-C₁₂, en la que R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, en cada caso, independientemente alquilo C₁-C₁₂;

en el que al menos una de las uniones entre subunidades es la unión (B), o en el que cada unión (B), si está presente, tiene la misma estructura en cada caso; y

en el que el oligonucleótido de antisentido se adhiere covalentemente a un péptido de penetración celular y resto conector, en el que el resto conector se selecciona de glicina, cisteína, prolina, ácido 6-aminohexanoico (Ahx), β-alanina (B) y Ahx-B, y el péptido de penetración celular se selecciona de las SEQ ID NO: 39-54. Se exponen realizaciones de la invención en las reivindicaciones dependientes y a continuación.

Dentro del contexto de la presente invención se divulgan composiciones que modulan el corte y empalme aberrante del preARNm de LMNA. Por ejemplo, dentro del contexto de la presente invención divulgada, se proporcionan oligonucleótidos de antisentido para su uso en la modulación del corte y empalmen aberrante de un preARNm de LMNA humana, estando compuestos los oligonucleótidos de subunidades morfolino y uniones entre unidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono 5'-exocíclico de una subunidad adyacente, y:

(i) tienen una estructura resistente a nucleasa sustancialmente no cargada;

(ii) pueden captarse por células hospedadoras de mamífero;

(iii) contienen entre aproximadamente 12-40 bases nucleotídicas; y

(iv) tienen una secuencia de dirección de al menos aproximadamente 12 subunidades contiguas complementaria al exón 10, intrón 10, exón 11, o combinaciones de los mismos de un preARNm de LMNA humana.

En realizaciones más específicas, la secuencia de dirección del oligonucleótido es complementaria a bases en dirección 5' del sitio de corte y empalme críptico del exón 11 de un preARNm de LMNA humana. En otras realizaciones específicas, la secuencia de dirección es complementaria a bases en dirección 3' del sitio de corte y empalme críptico del exón 11 de un preARNm de LMNA humana. En otras realizaciones específicas más, la secuencia de dirección no solapa con el sitio de corte y empalme críptico del exón 11 del preARNm de LMNA humana.

En realizaciones adicionales, la secuencia de dirección en el oligonucleótido usado en los métodos de la invención no solapa con la mutación 1824C>T.

En otra realización específica, la base más 3' de la secuencia de dirección es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que está aproximadamente 1-30 bases en dirección 3' del sitio de corte y empalme críptico del exón 11 de un preARNm de LMNA humana.

En otra realización específica, la base más 3' de la secuencia de dirección es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que está aproximadamente 1-30 bases en dirección 3' del sitio de corte y empalme crítico del exón 11 de un preARNm de LMNA humana.

5 En otra realización específica más, la base más 3' de la secuencia de dirección es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que está aproximadamente 10-40 bases en dirección 5' del sitio de corte y empalme crítico del exón 11 de un preARNm de LMNA humana.

10 Dentro del contexto de la presente invención también se divulga en el presente documento que la base más 3' de la secuencia de dirección es complementaria a una base en el intrón 10 de LMNA que está aproximadamente 1-60 bases en dirección 5' del exón 11 de LMNA.

15 Dentro del contexto de la presente invención también se divulga en el presente documento que la base más 3' de la secuencia de dirección es complementaria a una base en el exón 10 de LMNA que está aproximadamente 1-30 bases en dirección 5' del intrón 10 de LMNA.

20 En otra realización específica más, la secuencia de dirección es complementaria a una región que solapa con la unión de corte y empalme de sitios donadores de corte y empalme (SD) o aceptadores de corte y empalme (SA) de los exones 10 y 11 del preARNm de LMNA, y es complementaria a una parte de una región exónica y una parte de una región intrónica del ARNm preprocesado.

25 La secuencia de dirección del oligonucleótido, en realizaciones incluso más específicas de la invención, es complementaria a al menos 12 bases contiguas de una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-34, o es al menos un 90 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-34, o comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-34, o consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-34.

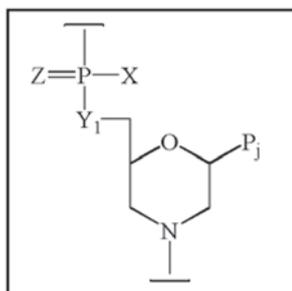
30 La secuencia de dirección del oligonucleótido, en realizaciones incluso más específicas de la invención, es complementaria a al menos 12 bases contiguas de una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-7 o 14-16, o es al menos un 90 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-7 o 14-16, o comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-7 o 14-16, o consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-7 o 14-16.

35 La secuencia de dirección del oligonucleótido, en realizaciones incluso más específicas de la invención, es complementaria a al menos 12 bases contiguas de la SEQ ID NO: 4, o es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 4, o comprende la SEQ ID NO: 4, o consiste en la SEQ ID NO: 4.

La secuencia de dirección del oligonucleótido, en otras realizaciones más específicas de la invención, es complementaria a al menos 12 bases contiguas de la SEQ ID NO: 11, o es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 11, o comprende la SEQ ID NO: 11, o consiste en la SEQ ID NO: 11.

40 En otras realizaciones, el oligonucleótido es un oligonucleótido de fosfordiamidato morfolino (PMO), o un PMO que comprende una o más uniones entre subunidades que contienen piperazina (PMOplus), o un oligonucleótido PMO-X.

45 Las subunidades morfolino ejemplares, de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención, se unen por uniones fosfordiamidato, de acuerdo con la siguiente estructura:



50 en la que Z es S u O,
 $X = NR^1R^2$ u OR^6 ,
 $Y = O$ o NR^7 ,

y cada una de dichas uniones se selecciona de:

55 (a) unión no cargada (a), en la que cada uno de R^1 , R^2 , R^6 , y R^7 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;

(b1) unión catiónica (b1), en la que $X = NR^1R^2$ e $Y = O$, y NR^1R^2 representa un grupo piperazino sustituido opcional, de modo que $R^1R^2 = -CHRCHR(N(R^3)(R^4)CHRCHR-$, en el que cada R^4 es H, CH_3 o no existe, y

5 R^3 se selecciona de H, alquilo inferior, $C(=NH)NH_2$, $Z-L-NHC(=NH)NH_2$, y $[C(O)CHR'NH]_mH$, en el que cuando Z es carbonilo ($C(O)$) o un enlace directo, L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que tiene enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;

(b2) unión catiónica (b2), en la que $X = NR^1R^2$ e $Y = O$, $R^1 = H$ o CH_3 , y $R^2 = LNR^3R^4R^5$, en el que L, R^3 , y R^4 se definen como anteriormente, y R^5 es H, alquilo inferior o (alcoxi)alquilo inferior; y

10 (b3) unión catiónica (b3), en la que $Y = NR^7$ y $X = OR^6$, y $R^7 = LNR^3R^4R^5$, en el que L, R^3 , y R^4 y R^5 se definen como anteriormente, y R^6 es H o alquilo inferior; y al menos una de dichas uniones se selecciona de uniones catiónicas (b1), (b2) y (b3).

15 En una realización más específica de la estructura anterior, cada uno de R^1 y R^2 , en las uniones de tipo (a), es metilo.

En otra realización específica de la estructura anterior, al menos una unión es de tipo (b1), donde cada R es H, R^4 es H, CH_3 , o un par de electrones, y R^3 se selecciona de H, CH_3 , $C(=NH)NH_2$, y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$.

20 En otra realización específica de la estructura anterior, al menos una unión es de tipo (b1), donde cada R es H, R^4 es un par de electrones, y R^3 se selecciona de $C(=NH)NH_2$ y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$.

En otra realización específica más de la estructura anterior, al menos una unión es de tipo (b1), donde cada R es H, R^4 es un par de electrones, y R^3 se selecciona de $C(=NH)NH_2$ y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$.

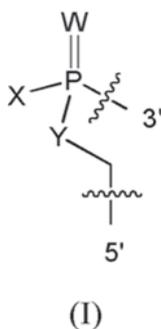
25 En otra realización específica más de la estructura anterior, R^3 es $C(O)-L-NHC(NH)NH_2$, y L es un hidrocarburo que tiene la estructura $-(CH_2)_n-$, donde n es de 1 a 12.

30 En otra realización específica de la estructura anterior, al menos una unión es de tipo (b1), donde cada R es H, y cada uno de R^3 y R^4 es independientemente H o CH_3 .

En otras realizaciones de la invención, el oligonucleótido de antisentido se adhiere covalentemente a un péptido de penetración celular, tal como un péptido rico en arginina. En una realización más específica, el péptido rico en arginina se adhiere en su extremo C al extremo 5' del oligonucleótido a través de un conector de uno o dos aminoácidos. Como alternativa, en otra realización, el péptido se adhiere en su extremo C al extremo 3' del oligonucleótido a través de un conector de uno o dos aminoácidos. En una realización preferente, el péptido de penetración celular se une al oligonucleótido a través de un aminoácido glicina.

40 En realizaciones adicionales de la invención, se proporciona un oligonucleótido que comprende una estructura, comprendiendo la estructura una secuencia de estructuras cíclicas de morfolino unidas por uniones entre subunidades, uniendo las uniones entre unidades un extremo 3' de una estructura cíclica de morfolino con un extremo 5' de una estructura cíclica de morfolino adyacente, en el que cada estructura cíclica de morfolino se une a un resto de emparejamiento de bases, de modo que el oligonucleótido puede unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico diana, que comprende una secuencia de dirección que es complementaria a al menos

45 12 bases de una secuencia expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34, o que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-34, en el que las uniones entre subunidades tienen la siguiente estructura general (I):

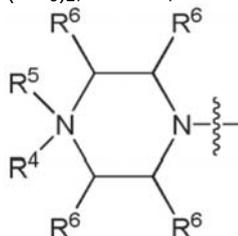


50 o una sal o isómero de la misma, y en el que cada una de las uniones (I) entre subunidades son independientemente unión (A) o unión (B):

en el que para la unión (A):

55 W es, en cada caso, independientemente S u O;

X es, en cada caso, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$ o;



(II)

Y es, en cada caso, independientemente O o $-NR^2$,

R¹ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;

R² es, en cada caso, independientemente hidrógeno o $-LNR^4R^5R^7$;

R³ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆;

R⁴ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ o $-[C(O)CHR'NH]_mH$, donde Z es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;

R⁵ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones;

R⁶ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;

R⁷ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxilalquilo C₁-C₆;

L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende grupos alquilo, alcoxi o alquilamino, o combinaciones de los mismos; y

en el que para la unión (B):

W es, en cada caso, independientemente S u O;

X es, en cada caso, independientemente $-NR^8R^9$ u $-OR^3$; e

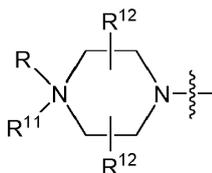
Y es, en cada caso, independientemente O o $-NR^{10}$,

R⁸ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C₂-C₁₂;

R⁹ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aralquilo C₁-C₁₂ o arilo;

R¹⁰ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o $-LNR^4R^5R^7$;

en el que R⁸ y R⁹ pueden unirse para formar un heterociclo mono- o bicíclico de 5-18 miembros o R⁸, R⁹ o R³ pueden unirse con R¹⁰ para formar un heterociclo de 5-7 miembros, y en el que, cuando X es 4-pipirazino, X tiene la siguiente estructura (III):



(III)

en la que:

R¹¹ es, en cada caso, independientemente alquilo C₂-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, arilo, heteroarilo o heterociclilo; y

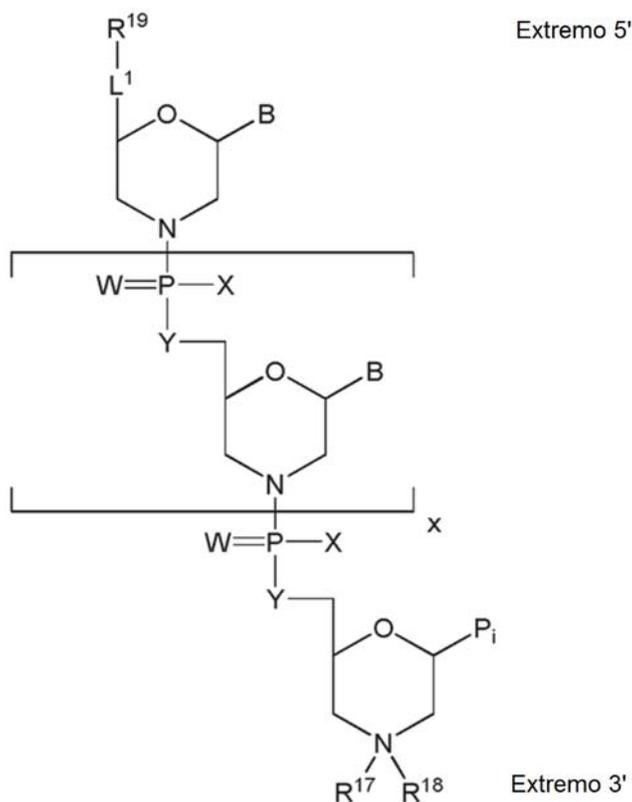
R es, en cada caso, independientemente un par de electrones, hidrógeno o alquilo C₁-C₁₂; y

R¹² es, en cada caso, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, $-NH_2$, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}R^{14}R^{15}$, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, oxo, $-CN$, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonil guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, $-SR^{13}$ o alcoxi C₁-C₁₂, en la que R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, en cada caso, independientemente alquilo C₁-C₁₂; y en la que al menos una de las uniones es la unión (B).

En algunas realizaciones de la estructura anterior, al menos un 5 % de las uniones entre subunidades son uniones (B). En una realización relacionada, de un 10 % a un 50 % de las uniones entre subunidades son uniones (B). En otra realizaciones relacionada, cada unión (B) tiene la misma estructura en cada caso. En otra realización específica más de la estructura anterior, cada Y y cada W son O.

En el presente documento se divulga un oligonucleótido de antisentido que comprende una secuencia de dirección que es complementaria a una o más bases del exón 10 o el exón 11 en el gen de LMNA humana y que contiene al menos 12 bases contiguas complementarias a una secuencia expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-34.

5 Realizaciones adicionales de la invención proporcionan un oligonucleótido de antisentido que comprende una estructura, comprendiendo la estructura una secuencia de estructuras cíclicas de morfolino unidas por uniones entre subunidades de tipo (A), (B) o combinaciones de las mismas, en el que cada estructura cíclica de morfolino mantiene un resto de emparejamiento de bases, de modo que el compuesto oligonucleotídico puede unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico diana, que comprende una secuencia diana que es complementaria a al menos 12 bases de las SEQ ID NO: 1-34, o que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-34, y en el que el oligonucleótido comprende un extremo 3', un extremo 5' y tiene la siguiente estructura (XVII):

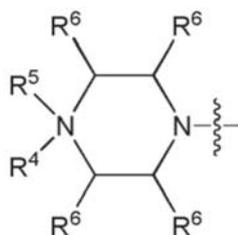


(XVII)

10

o una sal o isómero de la misma, y en el que para la unión (A):

15 W es, en cada caso, independientemente S u O;
X es, en cada caso, independientemente -N(CH₃)₂, -NR¹R², -OR³ o;



(II)

20

Y es, en cada caso, independientemente O o -NR²,
R¹ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;
R² es, en cada caso, independientemente hidrógeno o -LNR⁴R⁵R⁷;
R³ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆;

R⁴ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo, -C(=NH)NH₂, -Z-L-NHC(=NH)NH₂ o -[C(O)CHR'NH]_mH, donde Z es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;

R⁵ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones;

5 R⁶ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;

R⁷ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxilquilo C₁-C₆;

L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende grupos alquilo, alcoxi o alquilamino, o combinaciones de los mismos; y

10 en el que para la unión (B):

W es, en cada caso, independientemente S u O;

X es, en cada caso, independientemente -NR⁸R⁹ u -OR³; e

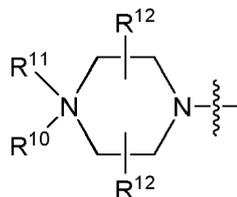
Y es, en cada caso, independientemente O o -NR¹⁰;

15 R⁸ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C₂-C₁₂;

R⁹ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aralquilo C₁-C₁₂ o arilo;

R¹⁰ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o -LNR⁴R⁵R⁷;

en el que R⁸ y R⁹ pueden unirse para formar un heterociclo mono- o bicíclico de 5-18 miembros o R⁸, R⁹ o R³ pueden unirse con R¹⁰ para formar un heterociclo de 5-7 miembros, y en el que, cuando X es 4-piperazino, X tiene la siguiente estructura (III):



(III)

en la que:

25 R¹⁰ es, en cada caso, independientemente alquilo C₂-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, arilo, heteroarilo o heterociclilo; y

R¹¹ es, en cada caso, independientemente un par de electrones, hidrógeno o alquilo C₁-C₁₂;

30 R¹² es, en cada caso, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, -NH₂, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴R¹⁵, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, -CN, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonilo, guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, -SR¹³ o alcoxi C₁-C₁₂, en la que R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, en cada caso, independientemente alquilo C₁-C₁₂; y

R¹⁷ es, en cada caso, independientemente inexistente, hidrógeno o alquilo C₁-C₆;

35 R¹⁸ y R¹⁹ son, en cada caso, independientemente inexistentes, hidrógeno, un péptido de penetración celular, un aminoácido natural o no natural, alquilcarbonilo C₂-C₃₀, -C(=O)OR²¹ o R²⁰;

R²⁰ es, en cada caso, independientemente guanidinilo, heterociclilo, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₇-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀ o -P(=O)(R²²)₂;

40 R²¹ es alquilo C₁-C₃₀ que comprende uno o más restos de oxígeno o hidroxilo o combinaciones de los mismos;

cada R²² es independientemente ariloxi C₆-C¹²;

B es un resto de emparejamiento de bases;

L¹ es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende enlaces seleccionados de alquilo, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, amida, éster, carbonilo, carbamato, fosfordiamidato, fosforoamidato, fosforotioato, piperazina y fosfodiéster;

45 x es un número entero de 0 o mayor; y

en la que al menos uno de R¹⁸ o R¹⁹ es R²⁰ y con la condición de que tanto R¹⁷ como R¹⁸ no estén ausentes.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes tras la referencia a la siguiente divulgación detallada. Para este fin, se exponen diversas referencias en el presente documento, que describen en más detalle determinada información antecedente, procedimientos, compuestos y/o composiciones.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1A muestra una estructura ejemplar de oligómero de morfolino con una unión fosfordiamidato;

La figura 1B muestra un oligómero de morfolino como en la figura 1A, pero donde las uniones de la estructura contienen un grupo cargado positivamente en forma de una unión de fosfordiamidato (piperazino);

La figura 1C muestra un conjugado de un péptido rico en arginina y un oligómero de antisentido, de acuerdo con una realización de la invención;

Las figuras 1D-G muestran el segmento de subunidad repetitivo de oligonucleótidos morfolino ejemplares, denominado D a G.

5 La figura 2 muestra los resultados para el cribado de inmunofluorescencia de progerina y lamina A/C.

La figura 3 muestra los resultados para el análisis de Western de lamina A y progerina.

La figura 4 muestra los resultados para el análisis de RT-qPCR de lamina A y progerina.

La figura 5 muestra los resultados para el análisis de Western de lamina A, lamina C y progerina.

10 Descripción detallada

La presente invención se refiere a oligonucleótidos como se describe en el presente documento, y una composición que contiene los mismos. Dentro del contexto de la presente invención también se divulgan métodos *in vitro*, en los que los oligonucleótidos muestran expresión del ARNm de la proteína LMNA mutante, por ejemplo, modulando el

15 corte y empalme del preARNm de LMNA.

Definiciones

20 Salvo que definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido normalmente por los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferentes. Para los fines de la presente invención, los términos siguientes se definen a continuación.

25 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

30 Por "aproximadamente" se entiende una magnitud, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía en tanto como un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % respecto a una magnitud, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

35 Por "secuencia codificante" se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico que contribuye a codificar el producto polipeptídico de un gen. Por el contrario, la expresión "secuencia no codificante" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuye a codificar el producto polipeptídico de un gen.

40 En toda esta memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprenden", "comprende", y "que comprende" se entenderán como la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

45 Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sea que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase y se limita a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación de los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

50 Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las normas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial," en que únicamente algunas de las bases de los ácidos nucleicos se acoplan de acuerdo con las normas de emparejamiento de bases. O puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre hebras de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de hibridación entre hebras de ácido nucleico. Aunque a menudo se desea complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir uno o más, pero preferentemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 emparejamientos incorrectos con respecto al ARN diana. Se incluyen variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En determinadas realizaciones, las variaciones en la secuencia cerca de los extremos de un oligómero generalmente son preferentes a variaciones en el interior y, si están presentes, normalmente están en aproximadamente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido del extremo 5' y/o 3'.

65 Las expresiones "péptido de penetración celular" o "CPP" se usan indistintamente y se refieren a péptidos catiónicos de penetración celular, también llamados péptidos de transporte, péptidos portadores o dominios de transducción peptídica. Los péptidos, como se muestra en el presente documento, tiene la capacidad de inducir la penetración celular en un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de las células de una población de cultivo celular

dada, incluyendo todos los números enteros entremedias, y permiten la traslocación macromolecular dentro de múltiples tejidos *in vivo* tras administración sistémica.

Las expresiones "oligómero de antisentido" o "compuesto de antisentido" u "oligonucleótido de antisentido" u "oligonucleótido" se usan indistintamente y hacen referencia a una secuencia de subunidades cíclicas, albergando cada una un resto de emparejamiento de bases, unidas por uniones entre subunidades que permiten que los restos de emparejamiento de bases hibriden con una secuencia diana en un ácido nucleico (normalmente un ARN) por emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia diana. Las subunidades cíclicas pueden estar basadas en ribosa u otra azúcar pentosa o, en determinadas realizaciones, un grupo morfolino (véase la descripción de oligómeros de morfolino a continuación). También se contemplan ácidos peptidonucleicos (APN), ácidos nucleicos bloqueados (ANB) y oligonucleótidos 2'-O-metilo, y otros agentes de antisentido conocidos en la técnica.

Dicho oligómero de antisentido puede diseñarse para bloquear o inhibir la traducción del ARNm o para inhibir el procesamiento de corte y empalme del preARNm natural, o inducir la degradación de los ARNm diana, y puede decirse que está "dirigido a" o "dirigido contra" una secuencia diana con la que hibrida. En determinadas realizaciones, la secuencia diana es una región que rodea o incluye un codón de inicio AUG de un ARNm, un sitio de corte y empalme 3' o 5' de un ARNm preprocesado o un punto de ramificación. La secuencia diana puede estar dentro de un exón o dentro de un intrón o una combinación. La secuencia diana para un sitio de corte y empalme puede incluir una secuencia de ARNm que tiene su extremo 5' de 1 a aproximadamente 25 pares de bases en dirección 3' de una unión aceptadora de corte y empalme normal en un ARNm preprocesado. Una secuencia diana preferente para corte y empalme es cualquier región de un ARNm preprocesado que incluye un sitio de corte y empalme o está contenida completamente dentro de una secuencia que codifica un exón o abarca un sitio aceptador y donador de corte y empalme. Más en general se dice que un oligómero está "dirigido contra" una diana biológicamente pertinente tal como, en la presente invención, un preARNm del gen de LMNA humana que codifica la proteína lamina A, cuando está dirigido contra el ácido nucleico de la diana de la manera descrita anteriormente. Las secuencias de dirección ejemplares incluyen las SEQ ID NO: 3-34.

Se incluyen oligonucleótidos de antisentido que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en una o más de las SEQ ID NO: 3-34. También se incluyen variantes de estos oligómeros de antisentido, incluyendo oligómeros variantes que tienen un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % (incluyendo todos los números enteros entremedias) de identidad de secuencia u homología de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-34 y/o variantes que difieren de estas secuencias en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, preferentemente aquellas variantes que modulan la expresión de progerina en una célula. También se incluyen oligonucleótidos de una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 3-34, que comprenden una cantidad adecuada de uniones catiónicas u otras uniones modificadas, como se describe en el presente documento, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 por cada 2-5 uniones no cargadas, tal como aproximadamente 4-5 por cada 10 uniones no cargadas, y/o que comprenden un péptido de transporte de penetración celular rico en Arg adherido a los mismos, como también se describe en el presente documento.

Las expresiones "oligómero de morfolino" o "PMO" (oligómero de fosforoamidato o fosforodiamidato morfolino) se refieren a un análogo oligonucleotídico compuesto de estructuras de subunidad morfolino, donde (i) las estructuras se unen juntas mediante uniones que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, preferentemente de dos átomos de longitud y preferentemente no cargadas o catiónicas, que unen el nitrógeno de morfolino de una subunidad a un carbono 5' exocíclico de una subunidad adyacente, y (ii) cada anillo de morfolino alberga una purina o pirimidina o un resto de emparejamiento de bases equivalente eficaz para unirse, por enlaces de hidrógeno específicos de base, a una base en un polinucleótido. Pueden hacerse variaciones a esta unión siempre que no interfieran con la unión o la actividad. Por ejemplo, el oxígeno adherido al fósforo puede sustituirse con azufre (tiofosforodiamidato). El oxígeno 5' puede sustituirse con amino o amino sustituido con alquilo inferior. El nitrógeno colgante adherido al fósforo puede estar si sustituir, monosustituido o disustituido con alquilo inferior (opcionalmente sustituido). Véase también el análisis de uniones catiónicas a continuación. El resto de emparejamiento de bases de purina o pirimidina es normalmente adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. La síntesis, estructuras y características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las patentes de Estados Unidos n.º 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063 y 5.506.337, y las solicitudes PCT n.º PCT/US07/11435 (uniones catiónicas) y US08/012804 (síntesis mejorada).

"PMO+" se refiere a oligómeros de fosforodiamidato morfolino que comprenden incontables uniones (1-piperazino)fosfinilideneoxi, (1-(4-(ω -guanidino-alcanoil))-piperazino)fosfinilideneoxi (A2 y A3) que se han descrito previamente (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO/2008/036127).

"PMO-X" se refiere a oligómeros de fosforodiamidato morfolino divulgados en el presente documento que comprenden al menos una unión (B) o al menos una de las modificaciones terminales divulgadas, y como se divulga en los documentos WO2011/150408 y US2012/0065169. Además, los oligómeros de fosforodiamidato morfolino PMO-X útiles en el presente documento pueden encontrarse en el documento US2014/0330006. Un grupo "fosforoamidato" comprende fósforo que tiene tres átomos de oxígeno adheridos y un átomo de nitrógeno adherido, mientras que un grupo "fosforodiamidato" comprende fósforo que tiene dos átomos de oxígeno adheridos y dos

átomos de nitrógeno adheridos. En las uniones entre subunidades no cargadas o modificadas de los oligómeros descritos en el presente documento y en los documentos WO2011/150408 y US7.943.762, un nitrógeno siempre está colgante a la cadena estructural. El segundo nitrógeno, en una unión fosforodiamidato, normalmente es el nitrógeno del anillo en una estructura cíclica de morfolino.

Las uniones "tiofosforoamidato" o "tiofosforodiamidato" son uniones fosforoamidato o fosforodiamidato, respectivamente, en las que un átomo de oxígeno, normalmente el oxígeno colgante a la estructura, se reemplaza con azufre.

"Unión entre subunidades" se refiere a la unión que conecta dos subunidades morfolino, por ejemplo la estructura (I).

"Cargado", "no cargado", "catiónico" y "aniónico", como se usan en el presente documento, se refieren al estado predominante de un resto químico a pH casi neutro, por ejemplo, de aproximadamente 6 a 8. Por ejemplo, el término puede hacer referencia al estado predominante del resto químico a pH fisiológico, es decir, de aproximadamente 7,4.

La expresión "análogo oligonucleotídico" se refiere a un oligonucleótido que tiene (i) una estructura central modificada, por ejemplo, una estructura diferente de la unión fosfodiéster convencional encontrada en oligo- y polinucleótidos naturales y (ii), opcionalmente, restos de azúcar modificados, por ejemplo, restos morfolino en lugar de restos de ribosa o desoxirribosa. Los análogos oligonucleotídicos mantienen bases que pueden formar enlaces de hidrógeno por emparejamiento de bases de Watson-Crick con bases polinucleotídicas convencionales, donde la estructura análoga presenta las bases de una manera que permite dichos enlaces de hidrógeno de una manera específica de secuencia entre la molécula análoga oligonucleotídica y las bases en un polinucleótido convencional (por ejemplo, ARN monocatenario o ADN monocatenario). Los análogos preferidos son aquellos que tienen una estructura sustancialmente no cargada, que contiene fósforo.

Una estructura sustancialmente no cargada, que contiene fósforo en un análogo oligonucleotídico es una en que una mayoría de las uniones de subunidades, por ejemplo, entre un 50-100 %, normalmente al menos de un 60 % a un 100 % o un 75 % o un 80 % de sus uniones, están sin cargar y contienen un único átomo de fósforo. Los oligonucleótidos de antisentido y los análogos oligonucleotídicos pueden contener entre aproximadamente 8 y 40 subunidades, normalmente aproximadamente 8-25 subunidades y preferentemente de aproximadamente 12 a 25 subunidades (incluyendo todos los números enteros e intervalos entremedias). En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos pueden tener complementariedad de secuencia exacta con la secuencia diana o casi complementariedad, como se define a continuación.

Una "subunidad" de un oligonucleótido se refiere a una unidad de nucleótido (o análogo nucleotídico). El término puede hacer referencia a la unidad de nucleótido con o sin la unión entre subunidades adherida, aunque, cuando se refiere a una "subunidad cargada", la carga normalmente reside dentro de la unión entre subunidades (por ejemplo, una unión fosfato o fosforotioato o una unión catiónica).

El resto de emparejamiento de bases de purina o pirimidina es normalmente adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. También se incluyen bases tales como piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, seudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metiluracilo, dihidouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitolinas (por ejemplo, 5-metilcitolina), 5-alquiluridinas (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (por ejemplo, 6-metiluridina), propina, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wybutosina, wybutoxosina, 4-acetiluridina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, β -D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosa, 3-metilcitolina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosa, N6-metiladenosina, 7-metilguanosa, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetiluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, β -D-manosilqueosina, ácido uridina-5-oxiacético, 2-tiocitolina, derivados de treonina y otros (Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman y Peyman, supra). Por "bases modificadas", en este aspecto, se entiende bases nucleotídicas diferentes de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), como se ilustra anteriormente; dicha bases pueden usarse en cualquier posición en la molécula de antisentido. Los expertos en la materia apreciarán que, dependiendo de los usos de los oligómeros, las T y los U son intercambiables. Por ejemplo, con otros compuestos químicos de antisentido tales como oligonucleótidos 2'-O-metilo de antisentido que son más parecidos a ARN, las bases T pueden mostrarse como U (véase, por ejemplo, el listado de secuencias).

Una "subunidad de aminoácido" o "resto de aminoácido" puede hacer referencia a un resto de α -aminoácido (-CO-CHR-NH-) o un resto de β -aminoácido u otro (por ejemplo, -CO-(CH₂)_nCHR-NH-), donde R es una cadena lateral (que puede incluir hidrógeno) y n es de 1 a 7, preferentemente de 1 a 4.

La expresión "aminoácido de origen natural" se refiere a un aminoácido presente en proteínas encontradas en la naturaleza, tales como los 20 (L)-aminoácidos utilizados durante la biosíntesis de proteínas, así como otros tales como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina. La expresión "aminoácidos no naturales" se refiere a aquellos aminoácidos no presentes en proteínas encontradas en la naturaleza, cuyos ejemplos incluyen beta-alanina (β -Ala), ácido 6-aminohexanoico (Ahx) y ácido 6-aminopentanoico.

Ejemplos adicionales de "aminoácidos no naturales" incluyen, sin limitación, (D)-aminoácidos, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina y similares, que son conocidos para los expertos en la materia.

5 Por "aislado" se entiende material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado" u "oligonucleótido aislado", como se usan en el presente documento, pueden hacer referencia a un polinucleótido que se ha purificado o retirado de las secuencias que lo flanquean en un estado de origen natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento.

10 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de oligómero de antisentido eficaz para modular la expresión de progerina *in vitro*.

15 Por "potencia" o "potenciación", o "aumentar" o "aumento", o "estimular" o "estimulación" se refiere en general a la capacidad de uno o más compuestos o composiciones de antisentido de producir o provocar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos posteriores) en una célula, en comparación con la respuesta provocada por cualquier compuesto que no sea de antisentido o un compuesto de control. Una cantidad "aumentada" o "potenciada" es normalmente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entremedias y por encima de 1), por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por 20 compuestos que no es de antisentido (la ausencia de un agente) o un compuesto de control.

25 El término "reducir" o "inhibir" puede referirse en general a la capacidad de uno o más compuestos de antisentido de la invención de "disminuir" una respuesta fisiológica o celular pertinente, medida de acuerdo con técnicas rutinarias en la técnica de diagnóstico. Las respuestas fisiológicas o celulares pertinentes (*in vivo* o *in vitro*) serán evidentes para los expertos en la materia, y pueden incluir, por ejemplo, reducciones en la expresión de progerina medida por los niveles de ARNm y/o proteína. Una "disminución" en una respuesta puede ser "estadísticamente significativa" en comparación con la respuesta producida por un compuesto que no es de antisentido o una composición de control, y puede incluir un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 30 100 %, incluyendo todos los números enteros entremedias.

35 La expresión "secuencia diana" se refiere a una parte del ARN diana contra el que está dirigido el oligonucleótido o agente de antisentido, es decir, la secuencia con la que hibridará el oligonucleótido por emparejamiento de bases de Watson-Crick de una secuencia complementaria. En determinadas realizaciones, la secuencia diana puede ser una región contigua de un preARNm que incluye secuencia diana tanto intrónica como exónica. En otras determinadas realizaciones, la secuencia diana consistirá exclusivamente de secuencias intrónicas o exónicas.

40 La expresión "secuencia de dirección" o "secuencia de dirección de antisentido" se refiere a la secuencia en un oligonucleótido u otro agente de antisentido que es complementaria (que significa, además, sustancialmente complementaria) a la secuencia diana en el genoma de ARN. La secuencia completa, o únicamente una parte, del compuesto de antisentido puede ser complementaria a la secuencia diana. Por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene 20-30 bases, aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 pueden ser secuencias de dirección que son complementarias a la región diana. Típicamente, la secuencia de dirección está formada de bases contiguas, pero puede estar formada, como alternativa, de secuencias no 45 contiguas que cuando se sitúan juntas, por ejemplo, desde extremos opuestos del oligonucleótido, constituyen la secuencia que abarca la secuencia diana.

50 Las secuencias diana y de dirección se describen como "complementarias" entre sí cuando se produce hibridación en una configuración antiparalela. Una secuencia de dirección puede tener complementariedad "cercana" o "sustancial" con la secuencia diana y aún funcional para los fines de la presente invención, es decir, aún puede ser funcionalmente "complementaria". En determinadas realizaciones, un oligonucleótido puede tener como mucho un emparejamiento incorrecto con la secuencia diana de los 10 nucleótidos, y preferentemente como mucho un emparejamiento incorrecto de los 20. Como alternativa, un oligonucleótido puede tener al menos un 90 % de homología de secuencia, y preferentemente al menos un 95 % de homología de secuencia, con las secuencias de 55 dirección de antisentido ejemplares descritas en el presente documento.

60 Un oligonucleótido "hibrida específicamente" con un polinucleótido diana si el oligómero hibrida con la diana en condiciones fisiológicas, con una T_m sustancialmente mayor de 45 °C, preferentemente al menos 50 °C y normalmente 60 °C-80 °C o mayor. Dicha hibridación preferentemente corresponde a condiciones de hibridación rigurosas. A una fuerza iónica y pH dados, la T_m es la temperatura a la que el 50 % de una secuencia diana hibrida con un polinucleótido complementario. De nuevo, dicha hibridación puede producirse con complementariedad "cercana" o "sustancial" del oligómero de antisentido a la secuencia diana, así como con complementariedad exacta.

65 "Homología" se refiere al porcentaje de la cantidad de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología puede determinarse usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395). De esta manera, secuencias de una longitud

similares o sustancialmente diferente respecto a las indicadas en el presente documento podría compararse por inserción de huecos en la alineación, determinándose dichos huecos, por ejemplo, por el algoritmo de comparación usado por GAP.

5 Las expresiones "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprenden una "secuencia un 50 % idéntica a", como se usan en el presente documento, se refieren al grado al que las secuencias son idénticas en una base nucleótido por nucleótido o una base aminoácido por aminoácido sobre una ventana de comparación. Por lo tanto, un "porcentaje de identidad de secuencia" puede calcularse comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre la ventana de comparación, determinando la cantidad de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) aparece en ambas secuencias para producir la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

15 Las expresiones usadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptido incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es de al menos 8 o 10, pero frecuentemente de 15 a 18 y a menudo de al menos 25 unidades monoméricas, incluyendo nucleótidos y restos de aminoácido, de longitud. Como dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, únicamente una parte de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se realizan normalmente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en que se compara una secuencia con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de alinear de forma óptima las dos secuencias. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de aproximadamente un 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias.

20 La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse por implementaciones informáticas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.) o por inspección y la mejor alineación (es decir, que produce el porcentaje de homología más alto sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia BLAST de programas como se divulga, por ejemplo, por Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Puede encontrarse un análisis detallado del análisis de secuencia en la unidad 19.3 de Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15.

35 Una molécula oligomérica (oligómero) "resistente a nucleasa" se refiere a una cuya estructura es sustancialmente resistente a escisión por nucleasa, en forma no hibridada o hibridada; por nucleasas extracelulares e intracelulares comunes en el organismo; es decir, el oligómero muestra poca o ninguna escisión por nucleasa en condiciones de nucleasa normales en el organismo al que se expone el oligómero.

45 Una agente se "capta activamente por células de mamífero" cuando el agente puede entrar en la célula por un mecanismo diferente de difusión pasiva a través de la membrana celular. El agente puede transportarse, por ejemplo, por "transporte activo", que se refiere al transporte de agentes a través de una membrana celular de mamífero por, por ejemplo, un mecanismo de transporte dependiente de ATP, o por "transporte facilitado", que se refiere al transporte de agentes de antisentido a través de la membrana celular por un mecanismo de transporte que requiere la unión del agente a una proteína de transporte, que entonces facilita el paso del agente unido a través de la membrana. Tanto para el transporte activo como para el transporte facilitado, los análogos oligonucleotídicos preferentemente tienen una estructura sustancialmente no cargada, como se define a continuación.

50 Un "heterodúplex" se refiere a un dúplex entre un oligonucleótido de antisentido y la parte complementaria de un ARN diana. Un "heterodúplex resistente a nucleasa" se refiere a un heterodúplex formado por la unión de un oligómero de antisentido con su diana complementaria, de modo que el heterodúplex es sustancialmente resistente a degradación *in vivo* por nucleasas intracelulares y extracelulares, tales como RNasaH, que pueden cortar complejos bicatenarios de ARN/ARN o ARN/ADN.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "líquido corporal" abarca una diversidad de tipos de muestra obtenidos de un sujeto, incluyendo orina, saliva, plasma, sangre, líquido cefalorraquídeo u otra muestra de origen biológico, tal como células de la piel o desechos dérmicos, y puede referirse a células o fragmentos celulares suspendidos en el mismo, o el medio líquido y sus solutos.

65

La expresión "cantidad relativa" se usa cuando se hace una comparación entre una medición de ensayo y una medición de control. La cantidad relativa de un reactivo que forma un complejo en una reacción es la cantidad que reacciona con una muestra de ensayo, en comparación con la cantidad que reacciona con una muestra de control. La muestra de control puede ejecutarse por separado en el mismo ensayo, o puede ser parte de la misma muestra (por ejemplo, tejido normal que rodea un área maligna en una sección tisular).

Un gen o producto génico de tipo silvestre es el que se observa más frecuentemente en una población y, por tanto, se denomina arbitrariamente forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen.

Los siguientes términos químicos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

"Amino" se refiere al radical $-NH_2$.

"Ciano" o "nitrilo" se refiere al radical $-CN$.

"Hidroxi" o "hidroxilo" se refiere al radical $-OH$.

"Imino" se refiere al sustituyente $=NH$.

"Guanidinilo" se refiere al sustituyente $-NHC(=NH)NH_2$.

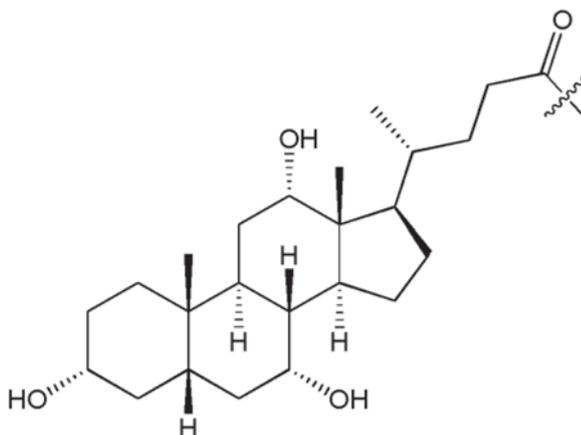
"Amidinilo" se refiere al sustituyente $-C(=NH)NH_2$.

"Nitro" se refiere al radical $-NO_2$.

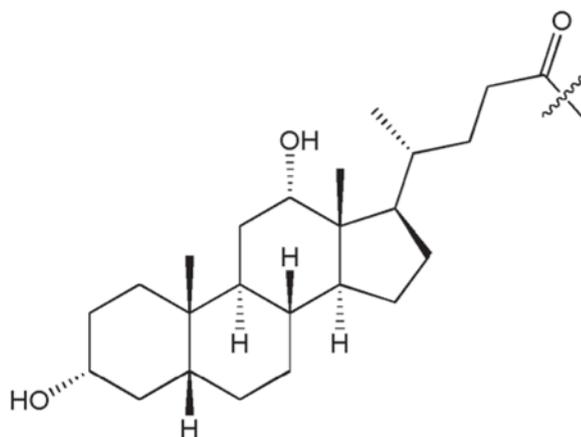
"Oxo" se refiere al sustituyente $=O$.

"Tioxo" se refiere al sustituyente $=S$.

"Colato" se refiere a la siguiente estructura:



"Desoxicolato" se refiere a la siguiente estructura:



"Alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que está saturada o insaturada (es decir, contiene uno o más dobles y/o triples enlaces), que tiene de uno a treinta átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. Se incluyen alquilos que comprenden cualquier cantidad de átomos de carbono de 1 a 30. Un alquilo que comprende hasta 30 átomos de carbono se menciona como un alquilo C_1-C_{30} , asimismo, por ejemplo, un alquilo que comprende hasta 12 átomos de carbono es un alquilo C_1-C_{12} . Los alquilos (y otros restos definidos en el presente documento) que comprenden otras cantidades de átomos de carbono se representan de forma similar. Los grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, alquilo C_1-C_{30} , alquilo C_1-C_{20} , alquilo C_1-C_{15} , alquilo C_1-C_{10} , alquilo C_1-C_8 , alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_4 , alquilo C_1-C_3 , alquilo C_1-C_2 , alquilo C_2-C_8 , alquilo

C₃-C₈ y alquilo C₄-C₈. Los grupos alquilo representativos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, *n*-propilo, 1-metiletilo (*iso*-propilo), *n*-butilo, *i*-butilo, *s*-butilo, *n*-pentilo, 1,1-dimetiletilo (*t*-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo, etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo, etinilo, propinilo, but-2-inilo, but-3-inilo, pentinilo, hexinilo y similares. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Alquileno" o "cadena de alquileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada que une el resto de la molécula a un grupo radical. Los alquilenos pueden estar saturados o insaturados (es decir, contiene uno o más dobles y/o triples enlaces). Los alquilenos representativos incluyen, pero sin limitación, alquileno C₁-C₁₂, alquileno C₁-C₈, alquileno C₁-C₆, alquileno C₁-C₄, alquileno C₁-C₃, alquileno C₁-C₂, alquileno C₁. Los grupos alquileno representativos incluyen, pero sin limitación, metileno, etileno, propileno, *n*-butileno, etenileno, propenileno, *n*-butenileno, propinileno, *n*-butinileno y similares. La cadena de alquileno está unida al resto de la molécula a través de un enlace sencillo o doble y al grupo radical a través de un enlace sencillo o doble. Los puntos de unión de la cadena de alquileno al resto de la molécula y al grupo radical pueden ser a través de un carbono o dos carbonos cualesquiera dentro de la cadena. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, una cadena de alquileno puede estar opcionalmente sustituida como se describe a continuación.

"Alcoxi" se refiere a un radical de fórmula -OR_a, donde R_a es un radical alquilo como se define. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo alcoxi puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

Alcoxialquilo" se refiere a un radical de fórmula -R_bOR_a, donde R_a es un radical alquilo como se define y donde R_b es un radical alquileno como se define. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo alcoxialquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Alquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula -C(=O)R_a, donde R_a es un radical alquilo como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo alquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Alquiloxicarbonilo" se refiere a un radical de fórmula -C(=O)OR_a, donde R_a es un radical alquilo como se define. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo alquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Alquilamino" se refiere a un radical de fórmula -NHR_a o -NR_aR_a, donde cada R_a es, independientemente, un radical alquilo como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo alquilamino puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Amidilo" se refiere a un radical de fórmula -N(H)C(=O)R_a, donde R_a es un radical alquilo o arilo como se define en el presente documento. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo amidilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Amidinilalquilo" se refiere a un radical de fórmula -R_b-C(=NH)NH₂, donde R_b es un radical alquileno como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo amidinilalquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Amidinilalquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula -C(=O)R_b-C(=NH)NH₂, donde R_b es un radical alquileno como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo amidinilalquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Aminoalquilo" se refiere a un radical de fórmula -R_b-NR_aR_a, donde R_b es un radical alquileno como se define anteriormente, y cada R_a es independientemente un hidrógeno o un radical alquilo.

"Tioalquilo" se refiere a un radical de fórmula -SR_a, donde R_a es un radical alquilo como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo tioalquilo puede estar opcionalmente sustituido.

"Arilo" se refiere a un radical derivado de un sistema cíclico de hidrocarburo que comprende hidrógeno, de 6 a 30 átomos de carbono y al menos un anillo aromático. El radical arilo puede ser un sistema cíclico monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas cíclicos condensados o unidos por puentes. Los radicales arilo incluyen, pero sin limitación, radicales arilo derivados de los sistemas de hidrocarburo de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, fluoranteno, fluoreno, *as*-indaceno, *s*-indaceno, indano, indeno, naftaleno, fenaleno, fenantreno, pleyadeno, pireno y trifenileno. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, el término "arilo" o el prefijo "ar-" (tal como en "aralquilo") pretende incluir radicales arilo que están opcionalmente sustituidos.

"Aralquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_b-R_c$, donde R_b es una cadena de alquileo como se define anteriormente y R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, bencilo, difenilmetilo, tritilo y similares. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo aralquilo puede estar opcionalmente sustituido.

5 "Arlcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_c$, donde R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo arilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.

10 "Arlloxicarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)OR_c$, donde R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo ariloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.

15 "Aralquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_b-R_c$, donde R_b es una cadena de alquileo como se define anteriormente y R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo aralquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.

20 "Aralquiloxicarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)OR_b-R_c$, donde R_b es una cadena de alquileo como se define anteriormente y R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo aralquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.

25 "Arlloxi" se refiere a un radical de fórmula $-OR_c$, donde R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo arilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.

30 "Cicloalquilo" se refiere a un anillo carbocíclico monocíclico o policíclico no aromático, estable, que puede incluir sistemas cíclicos condensados o unidos por puentes, que está saturado o insaturado, y unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. Los cicloalquilos representativos incluyen, pero sin limitación, cicloalquilos que tienen de tres a quince átomos de carbono y de tres a ocho átomos de carbono. Los radicales cicloalquilo monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Los radicales policíclicos incluyen, por ejemplo, adamantilo, norbornilo, decalinilo y 7,7-dimetil-biciclo[2.2.1]heptanilo. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido.

35 "Cicloalquilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_bR_d$, donde R_b es una cadena de alquileo como se define anteriormente y R_d es un radical cicloalquilo como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo cicloalquilalquilo puede estar opcionalmente sustituido.

40 "Cicloalquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_d$, donde R_d es un radical cicloalquilo como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo cicloalquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.

45 "Cicloalquiloxicarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)OR_d$, donde R_d es un radical cicloalquilo como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo cicloalquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.

50 "Condensado" se refiere a cualquier estructura cíclica descrita en el presente documento condensada a una estructura cíclica existente. Cuando el anillo condensado es un anillo heterociclilo o un anillo heteroarilo, cualquier átomo de carbono en la estructura cíclica existente que se vuelve parte del anillo heterociclilo condensado o el anillo heteroarilo condensado puede remplazarse por un átomo de nitrógeno.

55 "Guanidinilalquilo" se refiere un radical de fórmula $-R_b-NHC(=NH)NH_2$, donde R_b es un radical alquileo como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo guanidinilalquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

60 "Guanidinilalquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_b-NHC(=NH)NH_2$, donde R_b es un radical alquileo como se define anteriormente. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo guanidinilalquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

"Halo" o "halógeno" se refiere a bromo, cloro, flúor o yodo.

65 "Haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se define anteriormente, que está sustituido con uno o más radicales halo, como se define anteriormente, por ejemplo, trifluorometilo, difluorometilo, fluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 3-bromo-2-fluoropropilo, 1,2-dibromoetilo y similares. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo haloalquilo puede estar opcionalmente sustituido.

"Perhalo" o "perfluoro" se refiere a un resto en que cada átomo de hidrógeno se ha remplazado por un átomo de halógeno o átomo de flúor, respectivamente.

"Heterociclilo" o "anillo heterocíclico" se refiere a un radical cíclico no aromático estable de 3 a 24 miembros que comprende de 2 a 23 átomos de carbono y de uno a ocho heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, el radical heterociclilo puede ser un sistema cíclico monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas cíclicos condensados o unidos por puentes; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterociclilo puede estar parcial o totalmente saturado. Los ejemplos de tales radicales heterociclilo incluyen, pero sin limitación, dioxolanilo, tienil[1,3]ditianilo, decahidroisoquinolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, quinuclidinilo, tiazolidinilo, tetrahydrofuranilo, tritiano, tetrahidropiranilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinilo, 1-oxo-tiomorfolinilo, 1,1-dioxo-tiomorfolinilo, 12-corona-4, 15-corona-5, 18-corona-6, 21-corona-7, aza-18-corona-6, diaza-18-corona-6, aza-21-corona-7 y diaza-21-corona-7. A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo heterociclilo puede estar opcionalmente sustituido.

"Heteroarilo" se refiere a un radical de sistema cíclico de 5 a 14 que comprende átomos de hidrógeno, de uno a trece átomos de carbono, de uno a seis heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, y al menos un anillo aromático. Para los fines de la presente invención, el radical heteroarilo puede ser un sistema cíclico monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas cíclicos condensados o unidos por puentes; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heteroarilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, azepinilo, acridinilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzindolilo, benzodioxolilo, benzofuranilo, benzooxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[b][1,4]dioxepinilo, 1,4-benzodioxanilo, benzonaftofuranilo, benzoxazolilo, benzodioxolilo, benzodioxinilo, benzopiranilo, benzopiranonilo, benzofuranilo, benzofuranonilo, benzotienilo (benzotiofenilo), benzotriazolilo, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]piridinilo, carbazolilo, cinolinilo, dibenzofuranilo, dibenzotiofenilo, furanilo, furanonilo, isotiazolilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indazolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, isoquinolilo, indolizino, isoxazolilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, oxiranilo, 1-oxidopiridinilo, 1-oxidopirimidinilo, 1-oxidopirazinilo, 1-oxidopiridazinilo, 1-fenil-1*H*-pirrolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, pirrolilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, quinuclidinilo, isoquinolinilo, tetrahydroquinolinilo, tiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, triazinilo y tiofenilo (es decir, tienilo). A menos que se indique otra cosa específicamente en la memoria descriptiva, un grupo heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido.

Todos los grupos anteriores pueden estar sustituidos o sin sustituir. El término "sustituido", como se usa en el presente documento, significa que cualquiera de los grupos anteriores (es decir, alquilo, alquileo, alcoxi, alcoxilalquilo, alquilcarbonilo, alquiloxicarbonilo, alquilamino, amidilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonilo, aminoalquilo, arilo, aralquilo, arilcarbonilo, ariloxicarbonilo, aralquilcarbonilo, aralquiloxicarbonilo, ariloxi, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilcarbonilo, cicloalquilalquilcarbonilo, cicloalquiloxicarbonilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, haloalquilo, heterociclilo y/o heteroarilo), puede estar funcionalizado adicionalmente, en el que al menos un átomo de hidrógeno está remplazado por un enlace a un sustituyente de átomo que no es de hidrógeno. A menos que se indique específicamente en la memoria descriptiva, un grupo sustituido puede incluir uno o más sustituyentes seleccionados de: oxo, $-CO_2H$, nitrilo, nitro, hidroxilo, tiooxi, alquilo, alquileo, alcoxi, alcoxilalquilo, alquilcarbonilo, alquiloxicarbonilo, arilo, aralquilo, arilcarbonilo, ariloxicarbonilo, aralquilcarbonilo, aralquiloxicarbonilo, ariloxi, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilcarbonilo, cicloalquilalquilcarbonilo, cicloalquiloxicarbonilo, heterociclilo, heteroarilo, dialquilaminas, arilaminas, alquilarilaminas, diarilaminas, N-óxidos, imidas y enaminas; un átomo de silicio en grupos tales como grupos trialkilsililo, grupos dialquilarilsililo, grupos alquildiarilsililo, grupos triarilsililo, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi, por ejemplo, trifluorometilo o trifluorometoxi. "Sustituido" también significa cualquiera de los grupos anteriores en que uno o más átomos de hidrógeno están remplazados por un enlace de orden superior (por ejemplo, un doble o triple enlace) a un heteroátomo tal como oxígeno en grupos oxo, carbonilo, carboxilo y éster; y nitrógeno en grupos tales como iminas, oximas, hidrazonas y nitrilos. Por ejemplo, "sustituido" incluye cualquiera de los grupos anteriores en que uno o más átomos de hidrógeno están remplazados con $-NR_gC(=O)NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)OR_h$, $-NR_gSO_2R_h$, $-OC(=O)NR_gR_h$, $-OR_g$, $-SR_g$, $-SOR_g$, $-SO_2R_g$, $-OSO_2R_g$, $-SO_2OR_g$, $=NSO_2R_g$, y $-SO_2NR_gR_h$. "Sustituido" también se refiere a cualquiera de los grupos anteriores en que uno o más átomos de hidrógeno están remplazados por $-C(=O)R_g$, $-C(=O)OR_g$, $-CH_2SO_2R_g$, $-CH_2SO_2NR_gR_h$, $-SH$, $-SR_g$ o $-SSR_g$. En lo anterior, R_g y R_h son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, tionalquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, haloalquilo, heterociclilo, *N*-heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, *N*-heteroarilo y/o heteroarilalquilo. Además, cada uno de los sustituyentes anteriores también puede estar sustituido opcionalmente con uno o más de los sustituyentes anteriores. Además, cualquiera de los grupos anteriores puede estar sustituido para que incluya uno o más átomos de oxígeno o azufre internos. Por ejemplo, un grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de oxígeno internos para formar un grupo éter o poliéter. De manera similar, un grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de azufre internos para formar un tioéter, disulfuro, etc. Los restos amidilo pueden estar sustituidos con hasta 2 átomos de halógeno, mientras que otros grupos anteriores pueden estar sustituidos con uno o más átomos de halógeno. Con la excepción

de los grupos alquilo, todos los demás grupos también pueden estar sustituidos con amino o monoalquilamino. Con la excepción de los grupos alquilo y alquilcarbonilo, todos los demás grupos también pueden estar sustituidos con guanidinilo o amidinilo. Los sustituyentes opcionales para cualquiera de los grupos anteriores también incluyen arilfosforilo, por ejemplo -R_aP(Ar)₃, en el que R_a es un alquileo y Ar es un resto arilo, por ejemplo, fenilo.

"Alquilo inferior" se refiere a un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono, que se ilustran por metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, isoamilo, n-pentilo e isopentilo. En determinadas realizaciones, un grupo "alquilo inferior" tiene de uno a cuatro átomos de carbono. En otras realizaciones, un grupo "alquilo inferior" tiene de uno a dos átomos de carbono; es decir, metilo o etilo. De forma análoga, "alqueno inferior" se refiere a un radical alqueno de dos a seis, preferentemente tres o cuatro, átomos de carbono, como se ilustra por alilo y butenilo.

Un sustituyente "no interferente" es uno que no afecta de forma adversa a la capacidad de un oligómero de antisentido, como se describe en el presente documento, de unirse a su diana pretendida. Dichos sustituyentes incluyen grupos pequeños y/o relativamente no polares tales como metilo, etilo, metoxi, etoxi o fluoro.

Dirección a LMNA

Los ejemplos incluyen oligonucleótidos de antisentido dirigidos a las SEQ ID NO: 1 y/o 2, tratadas a continuación.

Determinados oligonucleótidos de antisentido pueden comprender una secuencia de dirección que es complementaria a una o más bases del exón 11 en el gen de LMNA humana, incluyendo la secuencia de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) y/o la secuencia encontrada en pacientes con HGPS, como se muestra en la SEQ ID NO: 2. Estas secuencias diana se muestran en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1. Secuencias diana de LMNA ejemplares

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO:
LMNA exón 11	GGCTCCCAGTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGA GTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGA CCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGC GGCTCAGGAGCCCAGGTGGGCGGACCCATCTCCTC TGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACGGTCACTCGCA GCTACCGCAGTGTGGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGC TTCGGGGACAATCTGGTACCCGCTCCTACCTCCT	1
	GGGCAACTCCAGCCCCGAACCCAG	
HGPS exón 11	GGCTCCCAGTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGA GTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGA CCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGC GGCTCAGGAGCCCAGGTGGGTTGGACCCATCTCCTC TGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACGGTCACTCGCA GCTACCGCAGTGTGGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGC TTCGGGGACAATCTGGTACCCGCTCCTACCTCCT GGGCAACTCCAGCCCCGAACCCAG	2

Los ejemplos incluyen oligonucleótidos de antisentido que son completamente complementarios al exón 11 de LMNA (SEQ ID NO: 1 o 2), incluyendo aquellos que también son complementarios al sitio de corte y empalme críptico del exón 11 de LMNA subrayado en la SEQ ID NO: 1 y 2 en la tabla 1 (por ejemplo, CAGGTGGGC/T). Determinados oligonucleótidos de antisentido pueden comprender una secuencia de dirección donde la base más 3' es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que está 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 bases en dirección 3' del sitio de corte y empalme críptico subrayado en la SEQ ID NO: 1 o 2 (véase la tabla 1), o que es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que está 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 en dirección 5' del sitio de corte y empalme críptico. Los oligonucleótidos ejemplares de este tipo están entre los enumerados a continuación como las SEQ ID NO: 3-16. Determinados oligonucleótidos de antisentido pueden comprender una secuencia de dirección donde la base más 3' es complementaria a una base en el intrón 10 de LMNA que está 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 bases en dirección 5' del exón 11 de LMNA en la SEQ ID NO: 1 o 2 (véase la tabla 1). Determinados oligonucleótidos de antisentido pueden comprender una secuencia de dirección donde la base más 3' es complementaria a una base en el exón 10 de LMNA que está 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 bases en dirección 5' del intrón 10 de LMNA. Determinadas

realizaciones se refieren al uso de una combinación de estos agentes de antisentido. Las realizaciones específicas incluyen oligonucleótidos de antisentido que comprende todo o una parte (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 bases) de la SEQ ID NO: 1 y/o 2.

Los oligonucleótidos de antisentido también puede dirigirse contra, o ser complementarios a, una diversidad de regiones en un ARNm de LMNA preprocesado, tal como un exón, un intrón, una unión de exón-intrón o una unión de corte y empalme. Por ejemplo, determinados oligonucleótidos de antisentido pueden comprender una secuencia de dirección que es complementaria a una región (secuencia diana) que solapa con la unión de corte y empalme de un sitio donador de corte y empalme (SD) o un sitio aceptador de corte y empalme (SA) de los exones 10 y 11 del preARNm de LMNA, y es complementaria a una parte de una región exónica (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos) y una parte de una región intrónica (por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos) del ARNm preprocesado. Las secuencias de dirección ejemplares de los tipos anteriores se enumeran a continuación con las SEQ ID NO: 17-34.

Las secuencias de dirección de antisentido seleccionadas pueden hacerse más cortas, por ejemplo, de aproximadamente 12 bases, o más largas, por ejemplo, de aproximadamente 40 bases, e incluyen una pequeña cantidad de emparejamientos incorrectos, siempre que la secuencia sea suficientemente complementaria para lograr el corte y empalme, y/u otra forma de inhibición tras la hibridación con la diana y forma, con el ARN diana, un heterodúplex que tiene una Tm de 45 °C o mayor.

En determinadas realizaciones, el grado de complementariedad entre la diana y la secuencia de dirección de antisentido es suficiente para formar un dúplex estable. La región de complementariedad de los oligómeros de antisentido con la secuencia de ARN diana puede ser tan corta como de 8-11 bases, pero es preferentemente de 12-15 bases o más, por ejemplo, de 12-20 bases, de 12-25 o de 15-25 bases, incluyendo todos los números enteros e intervalos entre estos intervalos. Un oligómero de antisentido de aproximadamente 14-15 bases en general es suficientemente largo para que tenga una secuencia complementaria única en el ARNm diana. En determinadas realizaciones, puede requerirse una longitud mínima de complementariedad para conseguir la Tm de unión necesaria, como se analiza a continuación.

En determinadas realizaciones, pueden ser adecuados oligómeros tan largos como de 40 bases, donde al menos una cantidad mínima de bases, por ejemplo, 10-12 bases, son complementarias a la secuencia diana. En general, sin embargo, la captación facilitada o activa en las células se optimiza a longitudes de oligómero menores de aproximadamente 30. Para oligómeros PMO, descritos adicionalmente a continuación, se produce un equilibrio óptimo de estabilidad de unión y captación en general a longitudes de 18-30 bases. Se incluyen oligómeros de antisentido (por ejemplo, APN, ANB, 2'-OMe, MOE, PMO) que consisten en aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 bases, en que al menos aproximadamente 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 bases contiguas y/o no contiguas son complementarias a una secuencia diana descrita en el presente documento, incluyendo las secuencias diana de las SEQ ID NO: 1 y/o 2, o variantes de las mismas.

En determinadas realizaciones, los oligómeros de antisentido pueden ser un 100 % complementarias a la secuencia diana de ácido nucleico de preARNm de LMNA, o pueden incluir emparejamientos incorrectos, por ejemplo, para satisfacer las variantes, siempre que un heterodúplex formado entre el oligómero y la secuencia diana sea suficientemente estable para soportar la acción de las nucleasas celulares y otros modos de degradación o desplazamiento que puedan producirse *in vivo*. Las estructuras de oligómero que son menos susceptibles a escisión por las nucleasas se analizan a continuación. Los emparejamientos incorrectos, si estuvieran presentes, son menos desestabilizantes hacia las regiones finales del dúplex híbrido que en el centro. La cantidad de emparejamientos incorrectos permitidos dependerá de la longitud del oligómero, el porcentaje de pares de bases G:C en el dúplex y la posición del emparejamiento o emparejamientos incorrectos en el dúplex, de acuerdo con principios bien comprendidos de la estabilidad del dúplex. Aunque dicho oligómero de antisentido no es necesariamente un 100 % complementario a la secuencia diana, es eficaz para unirse de forma estable y específica a la secuencia diana, de modo que una actividad biológica de la diana de ácido nucleico, por ejemplo, la expresión de la proteína o proteínas progerina, se modula.

La estabilidad del dúplex formado entre un oligómero y una secuencia diana es una función de la Tm de unión y la susceptibilidad del dúplex a escisión enzimática celular. La Tm de un compuesto de antisentido con respecto al ARN de secuencia complementaria puede medirse por métodos convencionales, tales como los descritos por Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pág. 107-108 o como se describe en Miyada C.G. y Wallace R.B., 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques*, *Methods Enzymol.* vol. 154 pág. 94-107. En determinadas realizaciones, el oligómero de antisentido puede tener una Tm de unión, con respecto a un ARN de secuencia complementaria, mayor que la temperatura corporal y preferentemente mayor de 50 °C. Se prefieren Tm en el intervalo de 60-80 °C o mayores. De acuerdo con principios bien conocidos, la Tm de un compuesto oligomérico, con respecto a un híbrido de ARN de bases complementarias, puede aumentarse aumentando la relación de bases

emparejadas C:G en el dúplex y/o aumentando la longitud (en pares de bases) del heterodúplex. Al mismo tiempo, con el fin de optimizar la captación celular, puede ser ventajoso limitar el tamaño del oligómero. Por este motivo, los compuestos que muestra una elevada Tm (50 °C o mayor) a una longitud de 25 bases o menos son en general preferentes sobre los que requieren más de 25 bases para valores de Tm elevados.

5 En determinadas realizaciones, tales como oligómeros PMO, la actividad antisentido de un oligómero puede potenciarse usando una mezcla de uniones fosforodiamidato no cargadas y catiónicas, como se ilustra en la figura 1C. La cantidad total de uniones catiónicas en el oligómero puede variar de 1 a 10 (incluyendo todos los números enteros entremedias), y pueden estar intercaladas a lo largo de todo el oligómero. Preferentemente, la cantidad de uniones cargadas es de al menos 2 y no más de la mitad de las uniones totales de la estructura, por ejemplo, entre 10 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 uniones cargadas positivamente y preferentemente cada unión cargada está separada a lo largo de la estructura por al menos 1, 2, 3, 4 o 5 uniones no cargadas. Una unión catiónica preferente de la invención incluye la unión apn B10 como se muestra en la tabla 3.

15 Las secuencias de antisentido ejemplares para dirigirlas al preARNm de LMNA humana se muestran en la tabla 1 a continuación. Los oligonucleótidos de antisentido pueden comprender la totalidad o una parte de estas secuencias de dirección.

Tabla 2. Secuencias de dirección a HGPS ejemplares*

Nombre de PMO	Secuencia de dirección 5' - 3'	SEQ ID NO:
Exo11.25.133	CCGCTGGCAGATGCCTTGTCGGCAG	3
Exo11.25.138	CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC	4*
Exo11.25.142	GCTCCTGAGCCGCTGGCAGATGCCT	5*
Exo11.25.145	TGGGCTCCTGAGCCGCTGGCAGATG	6
Exo11.25.149	CACCTGGGCTCCTGAGCCGCTGGCA	7
Exo11.25.154	CCACCCACCTGGGCTCCTGAGCCGC	8
Exo11.25.158	GGGTCCACCCACCTGGGCTCCTGAG	9
Exo11.25.162	AGATGGGTCCACCCACCTGGGCTCC	10*
Exo11.25.166	GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG	11*
Exo11.25.170	GCCAGAGGAGATGGGTCCACCCACC	12
Exo11.25.174	AAGAGCCAGAGGAGATGGGTCCACC	13*
Exo11.25.177	CAGAAGAGCCAGAGGAGATGGGTCC	14*
Exo11.25.181	GAGGCAGAAGAGCCAGAGGAGATGG	15
Exo11.25.185	ACTGGAGGCAGAAGAGCCAGAGGAG	16*
Exo10SD.25.69	ACGTGGTGGTGATGGAGCAGGTCAT	17
Exo10SD.25.73	ACTCACGTGGTGGTGATGGAGCAGG	18
Exo10SD.25.79	GCTACCACTCACGTGGTGGTGATGG	19
Exo10SD.25.84	CGGCGGCTACCACTCACGTGGTGGT	20
Exo10SD.25.87	CAGCGGCGGCTACCACTCACGTGGT	21
Exo10SD.25.90	CCTCAGCGGCGGCTACCACTCACGT	22
Exo10SD.25.92	GGCCTCAGCGGCGGCTACCACTCAC	23
Exo10SD.25.96	GCTCGGCCTCAGCGGCGGCTACCAC	24
Exo11SA.25.779	CGAGTCTGGGACTGACCACTCAGGC	25
Exo11SA.25.796	AGGCTCAGGCGGGACGGCGAGTCTG	26
Exo11SA.25.801	AGACAAGGCTCAGGCGGGACGGCGA	27
Exo11SA.25.805	AGGGAGACAAGGCTCAGGCGGGACG	28
Exo11SA.25.809	GGGAAGGGAGACAAGGCTCAGGCGG	29
Exo11SA.25.814	GCCCTGGGAAGGGAGACAAGGCTCA	30
Exo11SA.25.820	GTGGGAGCCCTGGGAAGGGAGACAA	31

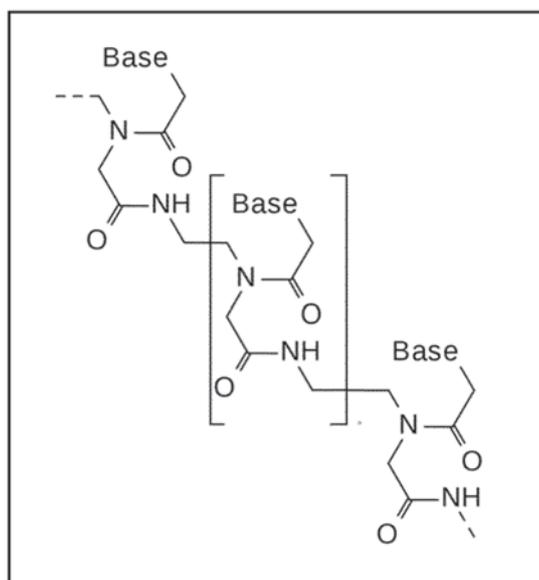
Nombre de PMO	Secuencia de dirección 5' - 3'	SEQ ID NO:
Exo11SA.25.828	CTGCTGCAGTGGGAGCCCTGGGAAG	32
Exo11SA.25.830	AGCTGCTGCAGTGGGAGCCCTGGGA	33
Exo11SA.25.836	CCCCCGAGCTGCTGCAGTGGGAGCC	34
HsEx10	GCTACCACTCACGTGGTGGTGATGG-AcR ₆ G	35
HsEx11	GGGTCCACCCACCTGGGCTCCTGAG-AcR ₆ G	36
HsEx10-apn	GC ^{apn} TACCAC ^{apn} TCACG ^{apn} TGGTGG ^{apn} TGATGG	37
HsEx11-apn	GGG ^{apn} TCCACCCACC ^{apn} TGGGC ^{apn} TCC ^{apn} TGAG	38
<p>* cubierto por las reivindicaciones ** AcR₆G se refiere a un transportador peptídico de penetración celular preferente (R₆ acilado; SEQ ID NO: 45) conjugado con un conector de glicina al extremo 3' de una secuencia de dirección ejemplar. La ^{apn}T en las SEQ ID NO: 19 y 20 se refiere a una unión entre subunidades apn como se describe adicionalmente a continuación en la tabla 3, unión B10.</p>		

Compuestos oligonucleotídicos de antisentido

5 Los oligonucleótidos de antisentido de la presente invención normalmente (a) tienen la capacidad de captarse activamente por células de mamífero, y (b) una vez captados, forman un dúplex con el ARN diana con una T_m mayor de aproximadamente 45 °C. En determinadas realizaciones, la estructura del oligómero puede estar sustancialmente no cargada y, preferentemente, puede reconocerse como un sustrato para transporte activo o facilitado a través de la membrana celular. La capacidad del oligómero de formar un dúplex estable con el ARN diana también puede estar relacionada con otras características de la estructura del oligómero, incluyendo la longitud y el grado de complementariedad del oligómero de antisentido con respecto a la diana, la relación de emparejamiento de bases G:C a A:T y las posiciones de cualquier base emparejada incorrectamente. La capacidad del oligómero de antisentido de resistir las nucleasas celulares puede promover la supervivencia y finalmente el suministro del agente al citoplasma celular. Se incluyen oligómeros de antisentido compuestos de agentes químicos basados en PMO, PMO+ (PMO_{plus}), PMO-X, ANB, APN y/o 2'O-Me, descritos en el presente documento. En general, los agentes químicos de APN y ANB utilizan oligómeros de dirección más cortos debido a su fuerza de unión a diana relativamente elevada en comparación con oligómeros PMO y 2'O-Me.

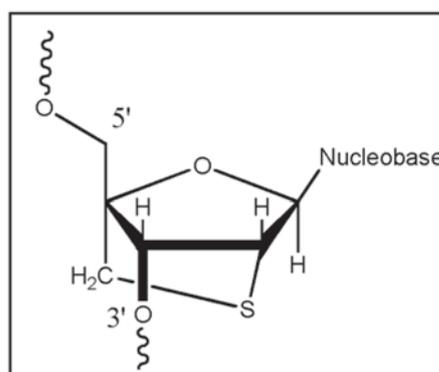
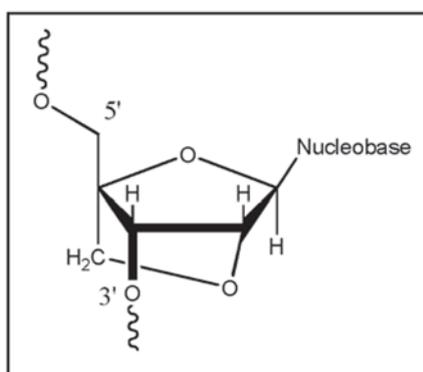
20 Los ácidos peptidonucleicos (APN) son análogos de ADN en que la estructura es estructuralmente homomorfa con una estructura de desoxirribosa, que consiste en unidades de N-(2-aminoetil) glicina a las que unen bases de pirimidina o purina. Los APN que contienen bases naturales de pirimidina y purina hibridan con oligonucleótidos complementarios que cumplen las normas de emparejamiento de bases de Watson-Crick e imitan el ADN en términos de reconocimiento de pares de bases (Egholm, Buchardt *et al.* 1993). La estructura de los APN se forma por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster, que los hacen muy adecuados para aplicaciones de antisentido (véase la estructura a continuación). La estructura no está cargada, lo que produce dúplex de APN/ADN o APN/ARN que muestran estabilidad térmica mayor de la normal. Los APN no se reconocen por nucleasas o proteasas.

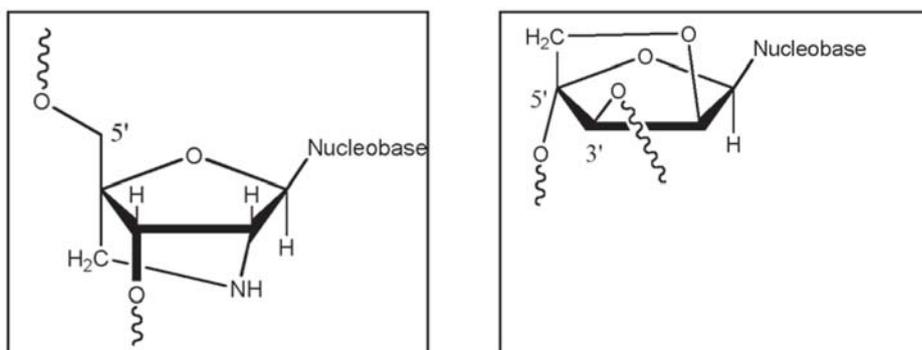
30 Los APN se producen sintéticamente usando cualquier técnica conocida en la técnica. El APN es un análogo de ADN en que una estructura de poliamida reemplaza el anillo de fosfato y ribosa tradicional de ADN como se muestra a continuación.



5 A pesar de un cambio estructural radical en la estructura natural del ARN o el ADN, el APN puede unirse de forma específica de secuencia en forma de hélice al ADN o el ARN. Las características del APN incluyen una alta afinidad de unión a ADN o ARN complementario, un efecto desestabilizante causado por emparejamiento incorrecto de una única base, resistencia a nucleasas y proteasas, hibridación con ADN o ARN independiente de la concentración salina y formación de hélices triples con ADN de homopurina. Panagene™ ha desarrollado sus monómeros de APN patentados Bts (Bts; grupo benzotiazol-2-sulfonilo) y un proceso de oligomerización patentado. La oligomerización de APN usando monómeros de APN Bts está compuesta de ciclos repetitivos de desprotección, acoplamiento y recubrimiento. Las patentes de Panagene para esta tecnología incluyen US 6969766, 7211668, 7022851, 7125994, 7145006 y 7179896. Las patentes de los Estados Unidos representativas que muestran la preparación de dichos compuestos de APN incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Pueden encontrarse contenidos adicionales de compuestos de APN en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497.

15 Los compuestos oligonucleotídicos también pueden contener subunidades de "ácido nucleico bloqueado" (ANB). Las estructuras de ANB son conocidas en la técnica: por ejemplo, Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54, 3607 y Accounts of Chem. Research (1999) 32, 301; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38, 8735; (1998) 39, 5401 y Bioorganic Medicinal Chemistry (2008)16, 9230. Se ilustran estructuras no limitantes y ejemplares de ANB a continuación:





Los compuestos de la invención pueden incorporar uno o más ANB. Los métodos para la síntesis de subunidades nucleosídicas individuales de ANB y su incorporación en oligonucleótidos son conocidos en la técnica: patentes de Estados Unidos 7.572.582; 7.569.575; 7.084.125; 7.060.809; 7.053.207; 7.034.133; 6.794.499; y 6.670.461. Los conectores típicos entre subunidades incluyen restos fosfodiéster y fosforotioato; como alternativa, pueden emplearse conectores que no contienen fósforo. Una realización preferente es un ANB que contiene un compuesto donde la subunidad de ANB está separada por una subunidad de ADN (es decir, un nucleótido de desoxirribosa). Compuestos preferentes adicionales están compuestos de subunidades alternas de ANB y ADN, donde el conector entre subunidades es fosforotioato.

Una estructura de oligómero preferente emplea subunidades basadas en morfolino que albergan restos de emparejamiento de bases, unidos por uniones no cargadas, como se describe anteriormente. Se prefiere especialmente un oligómero de morfolino unido por fosforodiamidato (PMO) sustancialmente no cargado. Los oligonucleótidos de morfolino, incluyendo oligómeros de antisentido, se detallan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063 y 5.506.337 del mismo propietario que la presente, y en la solicitud PCT n.º US08/088339.

Determinadas propiedades de las subunidades basadas en morfolino incluyen: la capacidad de unirse en una forma oligomérica por uniones de estructura no cargadas y estables; la capacidad de mantener una base nucleotídica (por ejemplo, adenina, citosina, guanina o uracilo), de manera que el polímero formado puede hibridar con un ácido nucleico diana de bases complementarias, incluyendo ARN diana, con elevada T_m , incluso con oligómeros tan cortos como de 10-14 bases; la capacidad del oligómero de transportarse activamente en células de mamífero; y la capacidad del heterodúplex de oligómero:ARN de resistir la degradación con RNasa.

Las propiedades de las subunidades basadas en morfolino incluyen: 1) la capacidad de unirse en una forma oligomérica por uniones de estructura no cargadas o cargadas positivamente y estables; 2) la capacidad de mantener una base nucleotídica (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo e hipoxantina), de manera que el polímero formado puede hibridar con un ácido nucleico diana de bases complementarias, incluyendo ARN diana, a valores de T_m por encima de aproximadamente 45 °C en oligonucleótidos relativamente cortos (por ejemplo, 10-15 bases); 3) la capacidad del oligonucleótido de transportarse de forma activa o pasiva en células de mamífero; y 4) la capacidad del heterodúplex de oligonucleótido de antisentido:ARN de resistir la degradación por RNasa y RNasaH, respectivamente.

Los ejemplos de oligonucleótidos de morfolino que tienen uniones de estructura que contienen fósforo se ilustran en las figuras 1A-1C. Un oligonucleótido de morfolino unido por fosforodiamidato preferente se muestra en la figura 1C, que está modificado, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, para que contenga grupos cargados positivamente en preferentemente un 10 %-50 % de sus uniones de la estructura. Las estructuras centrales ejemplares para oligonucleótidos de antisentido de la presente materia reivindicada incluyen los tipos de subunidad morfolino mostrados en las figuras 1A-1C, cada una unida por una unión de subunidades que contiene fósforo, no cargada o cargada positivamente. La figura 1D muestra una unión que contiene fósforo que forma la estructura de unidad repetitiva de cinco átomos, donde los anillos de morfolino están unidos por una unión fosfoamida de 1 átomo. La figura 1E muestra una unión que produce una estructura de unidad repetitiva de 6 átomos. En esta estructura, el átomo Y que une el carbono 5' de morfolino al grupo fósforo puede ser azufre, nitrógeno, carbono o, preferentemente, oxígeno. El resto X colgante del fósforo puede ser flúor, un alquilo o alquilo sustituido, un alcoxi o alcoxi sustituido, un tioalcoxi o tioalcoxi sustituido, o nitrógeno sin sustituir, monosustituido o disustituido, incluyendo estructuras cíclicas, tales como morfollinas o piperidinas. Alquilo, alcoxi y tioalcoxi preferentemente incluyen 1-6 átomos de carbono. Los restos Z son azufre u oxígeno, y son preferentemente oxígeno.

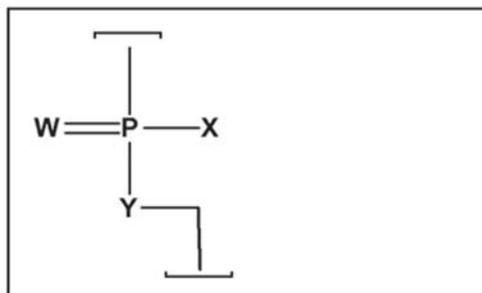
Las uniones mostradas en las figuras 1F y 1G están diseñadas para estructuras de 7 átomos de longitud de unidad. En la figura 1F, el resto X es como en la figura 1E, y el resto Y puede ser metileno, azufre o, preferentemente, oxígeno. En la figura 1G, los restos X e Y son como en la figura 1E. Los oligonucleótidos de morfolino particularmente preferentes incluyen los compuestos de estructuras de subunidad morfolino de la forma mostrada en la figura 1E, donde $X=NH_2$, $N(CH_3)_2$ o 1-piperazina u otro grupo cargado, $Y=O$ y $Z=O$.

Como se indica anteriormente, el oligonucleótido sustancialmente no cargado puede modificarse, de acuerdo con un aspecto de la invención, para que incluya uniones cargadas, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 por cada 2-5 uniones no cargadas, tal como aproximadamente 4-5 por cada 10 uniones no cargadas. En determinadas realizaciones, la mejora óptima en la actividad antisentido puede observarse cuando aproximadamente un 25 % de las uniones de la estructura son catiónicas. En determinadas realizaciones, la potenciación puede observarse con una cantidad pequeña, por ejemplo, un 10-20 % de uniones catiónicas, o cuando la cantidad de uniones catiónicas está en el intervalo de un 50-80 %, tal como aproximadamente un 60 %. La potenciación observada con cargas estructurales catiónicas añadidas puede, en algunos casos, potenciarse adicionalmente distribuyendo la mayor parte de las cargas cerca de las uniones de la estructura de la "región central" del oligonucleótido de antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido de 20 monómeros con 8 uniones de estructura catiónicas, que tiene al menos un 70 % de estas uniones cargadas ubicadas en las 10 uniones más centrales.

Los compuestos de antisentido de la invención pueden prepararse por síntesis en fase sólida por etapas, empleando métodos detallados en las referencias citadas anteriormente, y a continuación con respecto a la síntesis de oligonucleótidos que tienen una mezcla de uniones de estructura no cargadas y catiónicas. En algunos casos, puede ser deseable añadir agentes químicos adicionales al compuestos de antisentido, por ejemplo, para potenciar la farmacocinética o para facilitar la captura o detección del compuesto. Dicho resto puede adherirse covalentemente, normalmente a un extremo del oligómero, de acuerdo con métodos sintéticos convencionales. Por ejemplo, la adición de un resto de polietilenglicol u otro polímero hidrófilo, por ejemplo, uno que tiene 10-100 subunidades monoméricas, puede ser útil para potenciar la solubilidad. Uno o más grupos cargados, por ejemplo, grupos cargados aniónicos tales como un ácido orgánico, pueden potenciar la captación celular.

Un resto indicador, tal como fluoresceína o un grupo radiomarcado, puede adherirse con fines de detección. Como alternativa, el marcador indicador adherido al oligómero puede ser un ligando, tal como un antígeno o biotina, que puede unirse a un anticuerpo marcado o estreptavidina. En la selección de un resto para la adhesión o modificación de un compuesto de antisentido, en general es deseable, por supuesto, seleccionar compuestos químicos de grupos que son biocompatible y probablemente se toleren por un sujeto sin efectos secundarios indeseables.

Como se indica anteriormente, pueden construirse determinados compuestos de antisentido para que contengan una cantidad seleccionada de uniones catiónicas intercaladas con uniones no cargadas del tipo descrito anteriormente. Las uniones entre subunidades, tanto no cargadas como catiónicas, preferentemente son uniones que contienen fósforo, que tienen la estructura:



35 donde

W es S u O, y es preferentemente O,

X = NR¹R² u OR⁶,

Y = O o NR⁷,

40 y cada una de dichas uniones en el oligómero se selecciona de:

(a) unión no cargada (a), donde cada uno de R¹, R², R⁶ y R⁷ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;

45 (b1) unión catiónica (b1), donde X = NR¹R² e Y = O, y NR¹R² representa un grupo piperazino opcionalmente sustituido, de modo que R¹R² = -CHRCHR³(R⁴)CHRCHR-, donde cada R es independientemente H o CH₃,

R⁴ es H, CH₃, o un par de electrones, y

50 R³ se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo, CH₃, C(=NH)NH₂, Z-L-NHC(=NH)NH₂, y [C(O)CHR'NH]_mH, donde: Z es C(O) o un enlace directo, L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud, preferentemente de hasta 12 átomos y más preferentemente de hasta 8 átomos de longitud, que tienen enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4;

(b2) unión catiónica (b2), donde X = NR¹R² e Y = O, R¹ = H o CH₃, y R² = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³, y R⁴ son como se definen anteriormente, y R⁵ es H, alquilo inferior o (alcoxi)alquilo inferior; y

55 (b3) unión catiónica (b3), donde Y = NR⁷ y X = OR⁶, y R⁷ = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³, R⁴ y R⁵ son como se definen anteriormente, y R⁶ es H o alquilo inferior;

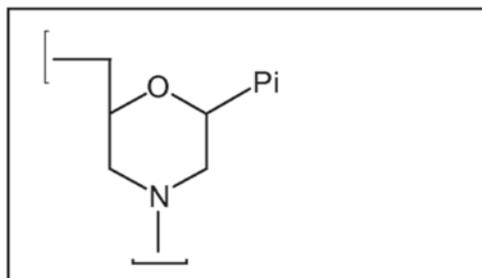
y al menos una de dichas uniones se selecciona de uniones catiónicas (b1), (b2) y (b3).

5 En determinadas realizaciones, un oligómero puede incluir al menos dos uniones consecutivas de tipo (a) (es decir, uniones no cargadas). En realizaciones adicionales, al menos un 5 % de las uniones en el oligómero son uniones catiónicas (es decir, de tipo (b1), (b2) o (b3)); por ejemplo, de un 10 % a un 60 % y preferentemente un 20-50 % de las uniones pueden ser uniones catiónicas.

10 En una realización, al menos una unión es de tipo (b1), donde, preferentemente, cada R es H, R⁴ es H, CH₃, o un par de electrones, y R³ se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo, CH₃, C(=NH)NH₂, y C(O)-L-NHC(=NH)NH₂. Las dos últimas realizaciones de R³ proporcionan un resto guanidino, adherido directamente al anillo piperazina o colgante a un grupo conector L, respectivamente. Para facilitar la síntesis, la variable Z en R³ es preferentemente C(O) (carbonilo), como se muestra.

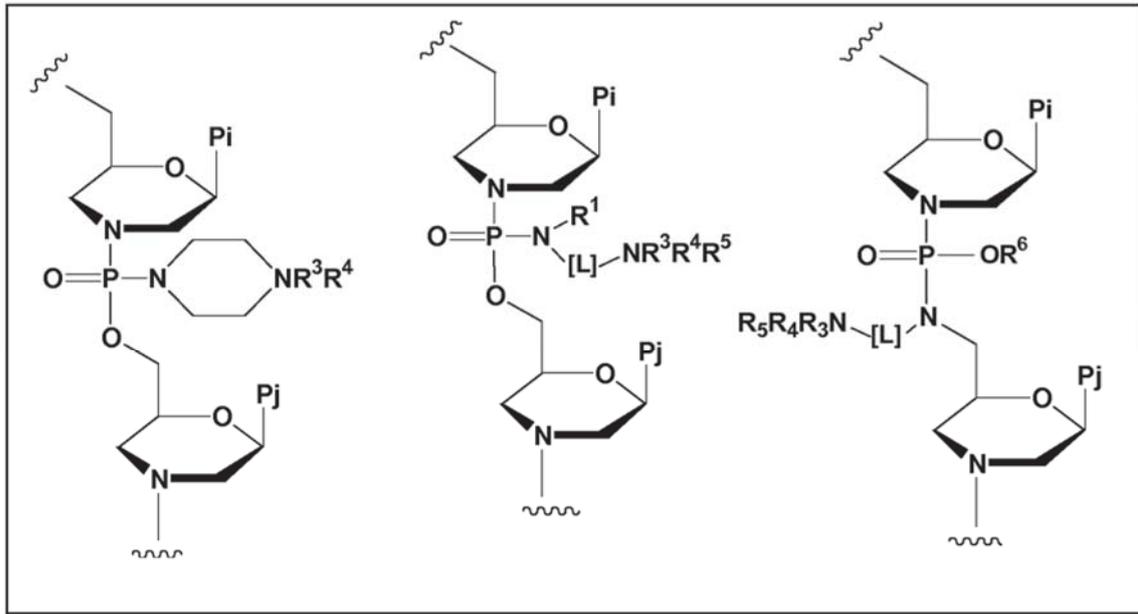
15 El grupo conector L, como se indica anteriormente, contiene enlaces en su estructura seleccionados de alquilo (por ejemplo, -CH₂-CH₂-), alcoxi (-C-O-) y alquilamino (por ejemplo, -CH₂-NH-), con la condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, los adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono. Aunque las uniones ramificadas (por ejemplo, -CH₂-CHCH₃-) son posibles, el conector preferentemente no está ramificado. En una realización, el conector es un conector de hidrocarburo. Dicho conector puede tener la estructura -(CH₂)_n-, donde n es 1-12, preferentemente 2-8 y más preferentemente 2-6.

20 Las subunidades morfolino pueden tener la estructura:



(i)

25 donde Pi es un resto de emparejamiento de bases, y las uniones representadas anteriormente conectan el átomo de nitrógeno de (i) al carbono 5' de una subunidad adyacente. Los restos de emparejamiento de bases Pi pueden ser iguales o diferentes, y en general se diseñan para proporcionar una secuencia que se una a un ácido nucleico diana. El uso de realizaciones de los tipos de unión (b1), (b2) y (b3) anteriores para unir subunidades morfolino puede ilustrarse de forma gráfica de la siguiente manera:



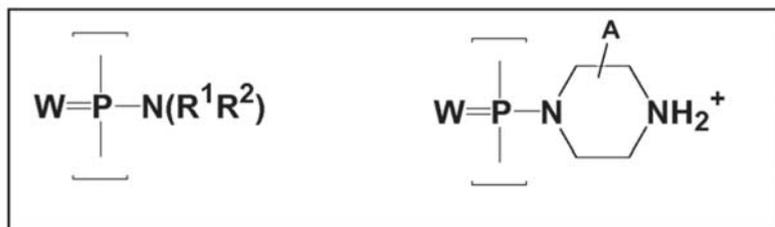
(b1)

(b2)

(b3)

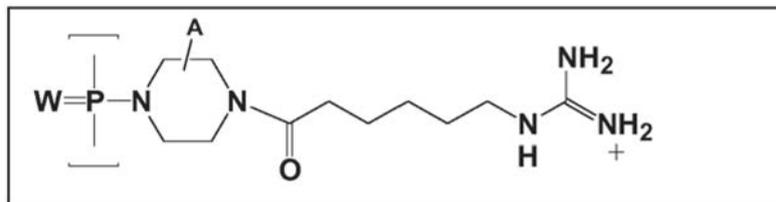
Preferentemente, todas las uniones catiónicas en el oligómero son del mismo tipo; es decir, todas de tipo (b1), todas de tipo (b2) o todas de tipo (b3).

5 En realizaciones adicionales, las uniones catiónicas se seleccionan de uniones (b1') y (b1'') como se muestra a continuación, donde (b1'') se menciona en el presente documento como unión "Pip" y (b1') se menciona en el presente documento como unión "GuX":



(a)

(b1')



(b1'')

15 En las estructuras anteriores, W es S u O, y es preferentemente O; cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior, y es preferentemente metilo; y A representa hidrógeno o un sustituyente no interferente en uno o más átomos de carbono en (b1') y (b1''). Preferentemente, los carbonos del anillo en el anillo de piperazina están sin sustituir; sin embargo, pueden incluir sustituyentes no interferentes, tales como metilo o flúor. Preferentemente, como mucho uno o dos átomos de carbono están sustituidos de esta manera. En realizaciones adicionales, al menos un 10 % de las uniones son de tipo (b1') o (b1''); por ejemplo, un 10 %-60 %
 20 y preferentemente de un 20 % a un 50 %, de las uniones pueden ser de tipo (b1') o (b1'').

En determinadas realizaciones, el oligómero no contiene uniones del tipo (b1') anterior. Como alternativa, el oligómero no contiene uniones de tipo (b1), donde cada R es H, R³ es H o CH₃, y R⁴ es H, CH₃, o un par de electrones.

5 Las subunidades morfolino también pueden unirse por uniones entre subunidades que no están basadas en fósforo, como se describe adicionalmente a continuación, donde al menos una unión está modificada con un grupo catiónico colgante como se describe anteriormente.

10 Podrían usarse otras uniones de análogos oligonucleotídicos que no están cargados en su estado sin modificar, pero que podrían albergar también un sustituyente amina colgante. Por ejemplo, podría emplearse un átomo de nitrógeno 5' en un anillo morfolino en una unión sulfamida o una unión urea (donde el fósforo está remplazado con carbono o azufre, respectivamente) y modificado de manera análoga al átomo de nitrógeno 5' en la estructura (b3) anterior.

15 Se proporcionan oligómeros que tienen incontables uniones catiónicas, incluyendo oligómeros completamente con uniones catiónicas. Preferentemente, sin embargo, los oligómeros están parcialmente cargados, que tienen, por ejemplo, un 10 %-80 %. En realizaciones preferentes, aproximadamente de un 10 % a un 60 %, y preferentemente de un 20 % a un 50 % de las uniones son catiónicas.

20 En una realización, las uniones catiónicas están intercaladas a lo largo de la estructura. Los oligómeros parcialmente cargados preferentemente contienen al menos dos uniones no cargadas consecutivas; es decir, el oligómero preferentemente no tiene un patrón estrictamente alterno a lo largo de su longitud completa.

25 También se consideran oligómeros que tienen bloques de uniones catiónicas y bloques de uniones no cargadas; por ejemplo, un bloque central de uniones no cargadas puede estar flanqueado por bloques de uniones catiónicas, o viceversa. En una realización, el oligómero tiene regiones 5', 3' y centrales de aproximadamente la misma longitud, y el porcentaje de uniones catiónicas en la región central es mayor de aproximadamente un 50 %, preferentemente mayor de aproximadamente un 70 %.

30 Los oligómeros para su uso en aplicaciones antisentido generalmente varían en su longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 subunidades, más preferentemente de aproximadamente 10 a 30 subunidades, y normalmente de 15-25 bases. Por ejemplo, un oligómero de la invención que tiene 19-20 subunidades, una longitud útil para un compuesto de antisentido, puede tener de forma ideal de dos a diez, por ejemplo, de cuatro a ocho, uniones catiónicas, y el resto uniones no cargadas. Un oligómero que tiene 14-15 subunidades puede tener de forma ideal de dos a siete, por ejemplo, 3, 4 o 5, uniones catiónicas, y el resto uniones no cargadas.

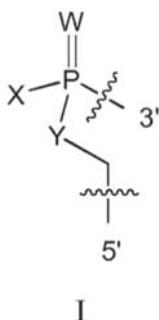
35 Cada estructura cíclica de morfolino mantiene un resto de emparejamiento de bases, para formar una secuencia de restos de emparejamiento de bases que normalmente está diseñado para hibridar con una diana de antisentido seleccionada en una célula o en un sujeto que se está tratando. El resto de emparejamiento de bases puede ser una purina o pirimidina encontrada en ADN o ARN natural (por ejemplo, A, G, C, T o U) o un análogo, tal como hipoxantina (el componente de base del nucleósido inosina) o 5-metil citosina.

40 Como se indica anteriormente, determinadas realizaciones se refieren a oligómeros que comprenden uniones entre subunidades novedosas, incluyendo oligómeros PMO-X y aquellos que tienen grupos terminal modificados. En algunas realizaciones, estos oligómeros tienen mayor afinidad por ADN y ARN que los oligómeros no modificados correspondientes y demuestran mejoras en el suministro celular, la potencia y/o las propiedades de distribución tisular en comparación con oligómeros que tienen otras uniones entre subunidades. En una realización, los oligómeros comprenden al menos una unión entre subunidades de tipo (B) como se define en el presente documento. Los oligómeros también pueden comprender una o más uniones entre subunidades de tipo (A) como se define en el presente documento. Las características estructural y propiedades de los diversos tipos de unión y oligómeros se describen en más detalle en el siguiente análisis. La síntesis de estos oligómeros y oligómeros relacionados se describe en la solicitud de Estados Unidos n.º 13/118.298 del mismo propietario que la presente, que se incorpora por referencia en su totalidad.

55 Unión (A)

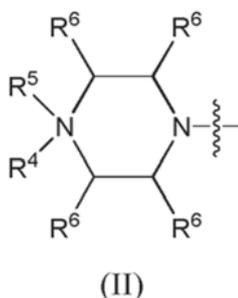
Los solicitantes han descubierto que la potenciación de la actividad antisentido, la biodistribución y/u otras propiedades deseables pueden optimizarse preparando oligómeros que tienen uniones entre subunidades. Por ejemplo, los oligómeros pueden comprender opcionalmente una o más uniones entre subunidades de tipo (A), y en determinadas realizaciones, los oligómeros comprenden al menos una unión de tipo (A). En algunas otras realizaciones, cada unión de tipo (A) tiene la misma estructura. Las uniones de tipo (A) pueden incluir uniones divulgadas en la patente de Estados Unidos n.º 7.943.762 del mismo propietario que la presente, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. La unión (A) tiene la siguiente estructura (I), en la que 3' y 5' indican el punto de adhesión a los extremos 3' y 5', respectivamente, del anillo morfolino (es decir, la estructura (i) analizada a continuación):

65



o una sal o isómero de la misma, en la que:

- 5 W es, en cada caso, independientemente S u O;
X es, en cada caso, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$ o;



- 10 Y es, en cada caso, independientemente O o $-NR^2$,
R¹ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;
R² es, en cada caso, independientemente hidrógeno o $-LNR^4R^5R^7$;
R³ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆;
15 R⁴ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ o $-[C(=O)CHR'NH]_mH$, donde Z es $-C(=O)-$ o un enlace directo, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;
R⁵ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones;
R⁶ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;
R⁷ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoialquilo C₁-C₆; y
20 L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende grupos alquilo, alcoxi o alquilamino, o combinaciones de los mismos.

En algunos ejemplos, el oligómero comprende al menos una unión de tipo (A). En algunas otras realizaciones, el oligómero incluye al menos dos uniones consecutivas de tipo (A). En realizaciones adicionales, al menos un 5 % de las uniones en el oligómero son de tipo (A); por ejemplo, en algunas realizaciones, un 5 %-95 %, de un 10 % a un 90 %, de un 10 % a un 50 % o de un 10 % a un 35 % de las uniones pueden ser la unión de tipo (A). En algunas realizaciones específicas, al menos una unión de tipo (A) es $-N(CH_3)_2$. En otras realizaciones, cada unión de tipo (A) es $-N(CH_3)_2$. En otras realizaciones, al menos una unión de tipo (A) es piperizin-1-ilo, por ejemplo, piperazin-1-ilo sin sustituir (por ejemplo, A2 o A3). En otras realizaciones, cada unión de tipo (A) es piperizin-1-ilo, por ejemplo, piperazin-1-ilo sin sustituir.

En algunas realizaciones, W es, en cada caso, independientemente S u O, y en determinadas realizaciones W es O.

En algunas realizaciones, X es, en cada caso, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$. En algunas realizaciones X es $-N(CH_3)_2$. En otros aspectos X es $-NR^1R^2$, y en otros ejemplos X es $-OR^3$.

En algunas realizaciones, R¹ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, R¹ es hidrógeno. En otras realizaciones X es metilo.

En algunas realizaciones, R² es, en cada caso, hidrógeno. En otras realizaciones R² es, en cada caso, $-LNR^4R^5R^7$. En algunas realizaciones, R³ es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆. En otras realizaciones, R³ es metilo. En otras realizaciones más, R³ es etilo. En algunas otras realizaciones, R³ es n-propilo o isopropilo. En algunas otras realizaciones, R³ es alquilo C₄. En otras realizaciones, R³ es alquilo C₅. En algunas realizaciones, R³ es alquilo C₆.

45

En determinadas realizaciones, R^4 es, en cada caso, independientemente hidrógeno. En otras realizaciones, R^4 es metilo o etilo. En otras realizaciones más, R^4 es $-C(=NH)NH_2$, y en otras realizaciones, R^4 es $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$. En otras realizaciones adicionales, R^4 es $-[C(=O)CHR'NH]_mH$. Z es $-C(=O)-$ en una realización y Z es un enlace directo en otra realización. R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural. En algunas realizaciones, R' es un homólogo de uno o dos carbonos de una cadena lateral de un aminoácido de origen natural.
 m es un número entero de 1 a 6. m puede ser 1. m puede ser 2. m puede ser 3. m puede ser 4. m puede ser 5. m puede ser 6.

En algunas realizaciones, R^5 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones. En algunas realizaciones, R^5 es hidrógeno. En otras realizaciones, R^5 es metilo. En otras realizaciones más, R^5 es un par de electrones.

En algunas realizaciones, R^6 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, R^6 es hidrógeno. En otras realizaciones, R^6 es metilo.

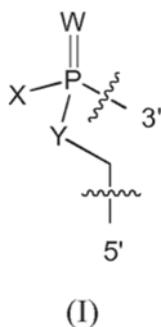
En otras realizaciones, R^7 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxilalquilo C_2-C_6 . En algunas realizaciones, R^7 es hidrógeno. En otras realizaciones, R^7 es alquilo C_1-C_6 . En otras realizaciones más, R^7 es alcoxilalquilo C_2-C_6 . En algunas realizaciones, R^7 es metilo. En otras realizaciones, R^7 es etilo. En otras realizaciones más, R^7 es n-propilo o isopropilo. En algunas otras realizaciones, R^7 es alquilo C_4 . En algunas realizaciones, R^7 es alquilo C_5 . En algunas realizaciones, R^7 es alquilo C_6 . En otras realizaciones más, R^7 es alcoxilalquilo C_2 . En algunas otras realizaciones, R^7 es alcoxilalquilo C_3 . En otras realizaciones más, R^7 es alcoxilalquilo C_4 . En algunas realizaciones, R^7 es alcoxilalquilo C_5 . En otras realizaciones, R^7 es alcoxilalquilo C_6 .

El grupo conector L, como se indica anteriormente, contiene enlaces en su estructura seleccionados de alquilo (por ejemplo, $-CH_2-CH_2-$), alcoxi (por ejemplo, $-C-O-C-$) y alquilamino (por ejemplo, $-CH_2-NH-$), con la condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, los adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono. Aunque son posibles uniones ramificadas (por ejemplo, $-CH_2-CHCH_3-$), el conector generalmente no está ramificado. En una realización, el conector es un conector de hidrocarburo. Dicho conector puede tener la estructura $(CH_2)_n$, donde n es 1-12, preferentemente 2-8 y más preferentemente 2-6.

Se proporcionan oligómeros que tienen incontables uniones de tipo (A). En algunas realizaciones, el oligómero no contiene uniones de tipo (A). En determinadas realizaciones, un 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de las uniones son la unión (A). En realizaciones seleccionadas, de un 10 a un 80, de un 20 a un 80, de un 20 a un 60, de un 20 a un 50, de un 20 a un 40 o de un 20 a un 35 por ciento de las uniones son la unión (A).

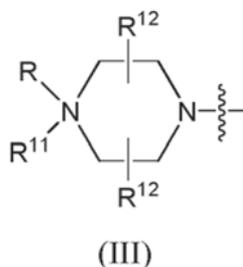
Unión (B)

En algunas realizaciones, los oligómeros comprenden al menos una unión de tipo (B). Por ejemplo, los oligómeros pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más uniones de tipo (B). Las uniones de tipo (B) pueden estar adyacentes o pueden estar intercaladas por todo el oligómero. La unión de tipo (B) tiene la siguiente estructura (I):



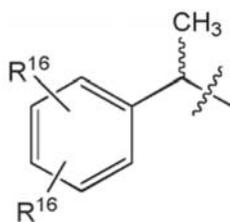
o una sal o isómero de la misma, en la que:

- W es, en cada caso, independientemente S u O;
- X es, en cada caso, independientemente $-NR^8R^9$ u $-OR^3$; e
- Y es, en cada caso, independientemente O o $-NR^{10}$;
- R^3 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 ;
- R^8 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C_2-C_{12} ;
- R^9 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} , aralquilo C_1-C_{12} o arilo;
- R^{10} es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} o $-LNR^4R^5R^7$;
- en el que R^8 y R^9 pueden unirse para formar un heterociclo mono- o bicíclico de 5-18 miembros o R^8 , R^9 o R^3 pueden unirse con R^{10} para formar un heterociclo de 5-7 miembros, y en el que, cuando X es 4-piparazino, X tiene la siguiente estructura (III):



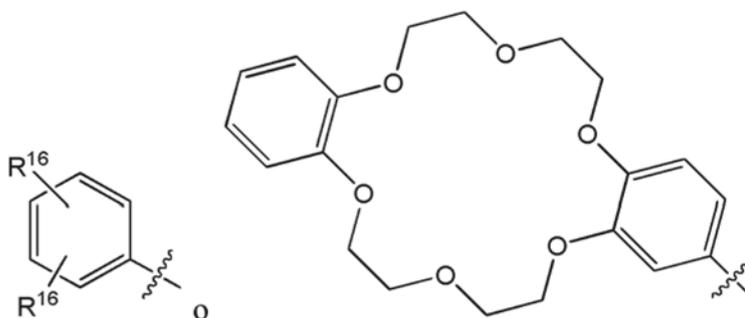
en la que:

- 5
- R^{11} es, en cada caso, independientemente alquilo C_2-C_{12} , aminoalquilo C_1-C_{12} , alquilcarbonilo C_1-C_{12} , arilo, heteroarilo o heterociclo;
- R es, en cada caso, independientemente un par de electrones, hidrógeno o alquilo C_1-C_{12} ; y
- 10 R^{12} es, en cada caso, independientemente, hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} , aminoalquilo C_1-C_{12} , $-NH_2$, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}R^{14}R^{15}$, alquilcarbonilo C_1-C_{12} , oxo, $-CN$, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonil guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, $-SR^{13}$ o alcoxi C_1-C_{12} , en la que R^{13} , R^{14} y R^{15} son, en cada caso, independientemente alquilo C_1-C_{12} .
- 15 En algunos ejemplos, el oligómero comprende una unión de tipo (B). En algunas otras realizaciones, el oligómero comprende dos uniones de tipo (B). En algunas otras realizaciones, el oligómero comprende tres uniones de tipo (B). En algunas otras realizaciones, el oligómero comprende cuatro uniones de tipo (B). En otras realizaciones adicionales, las uniones de tipo (B) son consecutivas (es decir, las uniones de tipo (B) están adyacentes entre sí). En otras realizaciones, al menos un 5 % de las uniones en el oligómero son de tipo (B); por ejemplo, en algunas
- 20 realizaciones, un 5 %-95 %, de un 10 % a un 90 %, de un 10 % a un 50 % o de un 10 % a un 35 % de las uniones pueden ser la unión de tipo (B).
- En otras realizaciones, R^3 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 . En otras realizaciones más, R^3 puede ser metilo. En algunas realizaciones, R^3 puede ser etilo. En algunas otras realizaciones, R^3 puede ser n-propilo o isopropilo. En otras realizaciones más, R^3 puede ser alquilo C_4 . En algunas realizaciones, R^3 puede ser alquilo C_5 . En algunas realizaciones, R^3 puede ser alquilo C_6 .
- En algunas realizaciones, R^8 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C_2-C_{12} . En algunas realizaciones, R^8 es hidrógeno. En otras realizaciones más, R^8 es etilo. En algunas otras realizaciones, R^8 es n-propilo o isopropilo. En algunas realizaciones, R^8 es alquilo C_4 . En otras realizaciones más, R^8 es alquilo C_5 . En otras realizaciones, R^8 es alquilo C_6 . En algunas realizaciones, R^8 es alquilo C_7 . En otras realizaciones más, R^8 es alquilo C_8 . En otras realizaciones, R^8 es alquilo C_9 . En otras realizaciones más, R^8 es alquilo C_{10} . En algunas otras realizaciones, R^8 es alquilo C_{11} . En otras realizaciones más, R^8 es alquilo C_{12} . En algunas otras realizaciones, R^8 es alquilo C_2-C_{12} y el alquilo C_2-C_{12} incluye uno o más dobles enlaces (por ejemplo, alqueno), triples enlaces (por ejemplo, alquino) o ambos. En algunas realizaciones, R^8 es alquilo C_2-C_{12} sin sustituir.
- 35
- En algunas realizaciones, R^9 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} , aralquilo C_1-C_{12} o arilo. En algunas realizaciones, R^9 es hidrógeno. En otras realizaciones más, R^9 es alquilo C_1-C_{12} . En otras realizaciones, R^9 es metilo. En otras realizaciones más, R^9 es etilo. En algunas otras realizaciones, R^9 es n-propilo o isopropilo. En algunas realizaciones, R^9 es alquilo C_4 . En algunas realizaciones, R^9 es alquilo C_5 . En otras realizaciones más, R^9 es alquilo C_6 . En algunas otras realizaciones, R^9 es alquilo C_7 . En algunas realizaciones, R^9 es alquilo C_8 . En algunas realizaciones, R^9 es alquilo C_9 . En algunas otras realizaciones, R^9 es alquilo C_{10} . En algunas otras realizaciones, R^9 es alquilo C_{11} . En otras realizaciones más, R^9 es alquilo C_{12} .
- 40
- En algunas otras realizaciones, R^9 es aralquilo C_1-C_{12} . Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^9 es bencilo y el bencilo puede estar opcionalmente sustituido en el anillo fenilo o el carbono bencílico. Los sustituyentes a este respecto incluyen grupos alquilo y alcoxi, por ejemplo, metilo o metoxi. En algunas realizaciones, el grupo bencilo está sustituido con metilo en el carbono bencílico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^9 tiene la siguiente estructura (XIV):
- 45
- 50



(XIV)

5 En otras realizaciones, R^9 es arilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^9 es fenilo, y el fenilo puede estar opcionalmente sustituido. Los sustituyentes a este respecto incluyen sustituyentes de grupos alquilo y alcoxi, por ejemplo, metilo o metoxi. En otras realizaciones, R^9 es fenilo y el fenilo comprende un resto de éter corona, por ejemplo, un éter corona de 12-18 miembros. En una realización, el éter corona es de 18 miembros y puede comprender además un resto fenilo adicional. Por ejemplo, en una realización, R^9 tiene una de las siguientes estructuras (XV) o (XVI):



(XV)

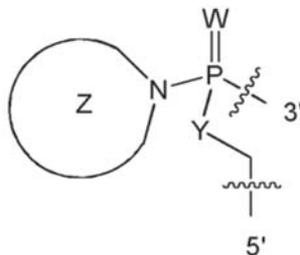
(XVI)

10

15 En algunas realizaciones, R^{10} es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} o $-LNR^4R^5R^7$, en la que R^4 , R^5 y R^7 son como se definen anteriormente con respecto a la unión (A). En otras realizaciones, R^{10} es hidrógeno. En otras realizaciones, R^{10} es alquilo C_1-C_{12} , y en otras realizaciones R^{10} es $-LNR^4R^5R^7$. En algunas realizaciones, R^{10} es metilo. En otras realizaciones más, R^{10} es etilo. En algunas realizaciones, R^{10} es alquilo C_3 . En algunas realizaciones, R^{10} es alquilo C_4 . En otras realizaciones más, R^{10} es alquilo C_5 . En algunas otras realizaciones, R^{10} es alquilo C_6 . En otras realizaciones, R^{10} es alquilo C_7 . En otras realizaciones más, R^{10} es alquilo C_8 . En algunas realizaciones, R^{10} es alquilo C_9 . En otras realizaciones, R^{10} es alquilo C_{10} . En otras realizaciones más, R^{10} es alquilo C_{11} . En algunas otras realizaciones, R^{10} es alquilo C_{12} .

20

En algunas realizaciones, R^8 y R^9 se unen para formar un heterociclo mono- o bicíclico de 5-18 miembros. En algunas realizaciones, el heterociclo es un heterociclo monocíclico de 5 o 6 miembros. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la unión (B) tiene la siguiente estructura (IV):

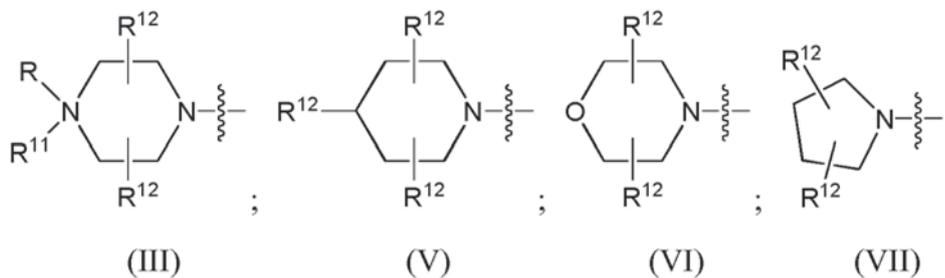


(IV)

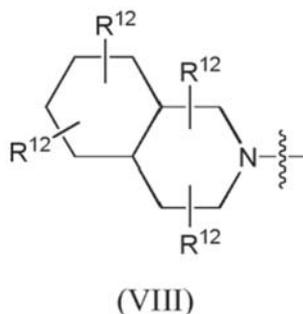
25

30 En otras realizaciones, heterociclo es bicíclico, por ejemplo, un heterociclo bicíclico de 12 miembros. El heterociclo puede ser piperizinilo. El heterociclo puede ser morfolino. El heterociclo puede ser piperidinilo. El heterociclo puede ser decahidroisoquinolina. Los heterociclos representativos incluyen los siguientes:

30



y



5

En algunas realizaciones, R^{11} es, en cada caso, independientemente alquilo C_2 - C_{12} , aminoalquilo C_1 - C_{12} , arilo, heteroarilo o heterociclilo.

10 En algunas realizaciones, R^{11} es alquilo C_2 - C_{12} . En algunas realizaciones, R^{11} es etilo. En otras realizaciones, R^{11} es alquilo C_3 . En otras realizaciones más, R^{11} es isopropilo. En algunas otras realizaciones, R^{11} es alquilo C_4 . En otras realizaciones, R^{11} es alquilo C_5 . En algunas realizaciones, R^{11} es alquilo C_6 . En otras realizaciones, R^{11} es alquilo C_7 . En algunas realizaciones, R^{11} es alquilo C_8 . En otras realizaciones, R^{11} es alquilo C_9 . En otras realizaciones más, R^{11} es alquilo C_{10} . En algunas otras realizaciones, R^{11} es alquilo C_{11} . En algunas realizaciones, R^{11} es alquilo C_{12} .

15 En otras realizaciones, R^{11} es aminoalquilo C_1 - C_{12} . En algunas realizaciones, R^{11} es metilamino. En algunas realizaciones, R^{11} es etilamino. En otras realizaciones, R^{11} es aminoalquilo C_3 . En otras realizaciones más, R^{11} es aminoalquilo C_4 . En algunas otras realizaciones, R^{11} es aminoalquilo C_5 . En otras realizaciones, R^{11} es aminoalquilo C_6 . En otras realizaciones más, R^{11} es aminoalquilo C_7 . En algunas realizaciones, R^{11} es aminoalquilo C_8 . En otras realizaciones, R^{11} es aminoalquilo C_9 . En otras realizaciones más, R^{11} es aminoalquilo C_{10} . En algunas otras realizaciones, R^{11} es aminoalquilo C_{11} . En otras realizaciones, R^{11} es aminoalquilo C_{12} .

20 En otras realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_1 - C_{12} . En otras realizaciones más, R^{11} es alquilcarbonilo C_1 . En otras realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_2 . En algunas realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_3 . En otras realizaciones más, R^{11} es alquilcarbonilo C_4 . En algunas realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_5 . En algunas otras realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_6 . En otras realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_7 . En otras realizaciones más, R^{11} es alquilcarbonilo C_8 . En algunas realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_9 . En otras realizaciones más, R^{11} es alquilcarbonilo C_{10} . En algunas realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_{11} . En algunas realizaciones, R^{11} es alquilcarbonilo C_{12} . En otras realizaciones más, R^{11} es $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$, donde n es de 1 a 6. Por ejemplo, en algunas realizaciones, n es 1. En otras realizaciones, n es 2. En otras realizaciones más, n es 3. En algunas otras realizaciones, n es 4. En otras realizaciones más, n es 5. En otras realizaciones, n es 6.

25 En otras realizaciones, R^{11} es arilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{11} es fenilo. En algunas realizaciones, el fenilo está sustituido, por ejemplo, con un grupo nitro.

30 En otras realizaciones, R^{11} es heteroarilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{11} es piridinilo. En otras realizaciones, R^{11} es pirimidinilo.

35 En otras realizaciones, R^{11} es heterociclilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{11} es piperidinilo, por ejemplo, piperidin-4-ilo.

40 En algunas realizaciones, R^{11} es etilo, isopropilo, piperidinilo, pirimidinilo, colato, desoxicolato o $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$, donde n es de 1 a 6.

45 En algunas realizaciones, R es un par de electrones. En otras realizaciones, R es hidrógeno, y en otras realizaciones, R es alquilo C_1 - C_{12} . En algunas realizaciones, R es metilo. En algunas realizaciones, R es etilo. En

5 otras realizaciones, R es alquilo C₃. En otras realizaciones más, R es isopropilo. En algunas otras realizaciones, R es alquilo C₄. En otras realizaciones más, R es alquilo C₅. En algunas realizaciones, R es alquilo C₆. En otras realizaciones, R es alquilo C₇. En otras realizaciones más, R es alquilo C₈. En otras realizaciones, R es alquilo C₉. En algunas realizaciones, R es alquilo C₁₀. En otras realizaciones más, R es alquilo C₁₁. En algunas realizaciones, R es alquilo C₁₂.

10 En algunas realizaciones, R¹² es, en cada caso, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, -NH₂, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴R¹⁵, oxo, -CN, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonil guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, -SR¹³ o alcoxi C₁-C₁₂, en la que R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, en cada caso, independientemente alquilo C₁-C₁₂.

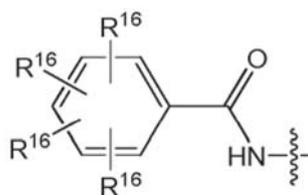
15 En algunas realizaciones, R¹² es hidrógeno. En algunas realizaciones, R¹² es alquilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹² es aminoalquilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹² es -NH₂. En algunas realizaciones, R¹² es -NR¹³R¹⁴. En algunas realizaciones, R¹² es -NR¹³R¹⁴R¹⁵. En algunas realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹² es oxo. En algunas realizaciones, R¹² es -CN. En algunas realizaciones, R¹² es trifluorometilo. En algunas realizaciones, R¹² es amidilo. En algunas realizaciones, R¹² es amidinilo. En algunas realizaciones, R¹² es amidinilalquilo. En algunas realizaciones, R¹² es amidinilalquilcarbonilo. En algunas realizaciones, R¹² es guanidinilo, por ejemplo, monometilguanidinilo o dimetilguanidinilo. En algunas realizaciones, R¹² es guanidinilalquilo. En algunas realizaciones, R¹² es amidinilalquilcarbonilo. En algunas realizaciones, R¹² es colato. En algunas realizaciones, R¹² es desoxicolato. En algunas realizaciones, R¹² es arilo. En algunas realizaciones, R¹² es heteroarilo. En algunas realizaciones, R¹² es heterociclo. En algunas realizaciones, R¹² es -SR¹³. En algunas realizaciones, R¹² es alcoxi C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹² es dimetilamina.

25 En otras realizaciones, R¹² es metilo. En otras realizaciones más, R¹² es etilo. En algunas realizaciones, R¹² es alquilo C₃. En algunas realizaciones, R¹² es isopropilo. En algunas realizaciones, R¹² es alquilo C₄. En otras realizaciones, R¹² es alquilo C₅. En otras realizaciones más, R¹² es alquilo C₆. En algunas otras realizaciones, R¹² es alquilo C₇. En algunas realizaciones, R¹² es alquilo C₈. En otras realizaciones más, R¹² es alquilo C₉. En algunas realizaciones, R¹² es alquilo C₁₀. En otras realizaciones más, R¹² es alquilo C₁₁. En otras realizaciones, R¹² es alquilo C₁₂. En otras realizaciones más, el resto alquilo está sustituido con uno o más átomos de oxígeno para formar un resto éter, por ejemplo, un resto metoximetilo.

35 En algunas realizaciones, R¹² es metilamino. En otras realizaciones, R¹² es etilamino. En otras realizaciones más, R¹² es aminoalquilo C₃. En algunas realizaciones, R¹² es aminoalquilo C₄. En otras realizaciones más, R¹² es aminoalquilo C₅. En algunas otras realizaciones, R¹² es aminoalquilo C₆. En algunas realizaciones, R¹² es aminoalquilo C₇. En algunas realizaciones, R¹² es aminoalquilo C₈. En otras realizaciones más, R¹² es aminoalquilo C₉. En algunas otras realizaciones, R¹² es aminoalquilo C₁₀. En otras realizaciones más, R¹² es aminoalquilo C₁₁. En otras realizaciones, R¹² es aminoalquilo C₁₂. En algunas realizaciones, el aminoalquilo es un dimetilaminoalquilo.

40 En otras realizaciones más, R¹² es acetilo. En algunas otras realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₂. En algunas realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₃. En otras realizaciones más, R¹² es alquilcarbonilo C₄. En algunas realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₅. En otras realizaciones más, R¹² es alquilcarbonilo C₆. En algunas otras realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₇. En algunas realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₈. En otras realizaciones más, R¹² es alquilcarbonilo C₉. En algunas otras realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₁₀. En algunas realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₁₁. En otras realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₁₂. El alquilcarbonilo está sustituido con un resto carboxi, por ejemplo, el alquilcarbonilo está sustituido para formar un resto ácido succínico (es decir, un 3-carboxialquilcarbonilo). En otras realizaciones, el alquilcarbonilo está sustituido con un grupo -SH terminal.

50 En algunas realizaciones, R¹² es amidilo. En algunas realizaciones, el amidilo comprende un resto alquilo que está sustituido adicionalmente, por ejemplo, con -SH, carbamato o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el amidilo está sustituido con un resto arilo, por ejemplo, fenilo. En determinadas realizaciones, R¹² puede tener la siguiente estructura (IX):



(IX)

55 en la que R¹⁶ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, -CN, arilo o heteroarilo.

En algunas realizaciones, R¹² es metoxi. En otras realizaciones, R¹² es etoxi. En otras realizaciones más, R¹² es alcoxi C₃. En algunas realizaciones, R¹² es alcoxi C₄. En algunas realizaciones, R¹² es alcoxi C₅. En algunas otras

realizaciones, R^{12} es alcoxi C_6 . En otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_7 . En algunas otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_8 . En algunas realizaciones, R^{12} es alcoxi C_9 . En otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_{10} . En algunas realizaciones, R^{12} es alcoxi C_{11} . En otras realizaciones más, R^{12} es alcoxi C_{12} .

5 En determinadas realizaciones, R^{12} es pirrolidinilo, por ejemplo, pirrolidin-1-ilo. En otras realizaciones, R^{12} es piperidinilo, por ejemplo, piperidin-1-ilo o piperidin-4-ilo. En otra realización, R^{12} es morfolino, por ejemplo, morfolin-4-ilo. En otras realizaciones, R^{12} es fenilo, y en realizaciones incluso adicionales, el fenilo está sustituido, por ejemplo, con un grupo nitro. En otras realizaciones adicionales, R^{12} es pirimidinilo, por ejemplo, pirimidin-2-ilo.

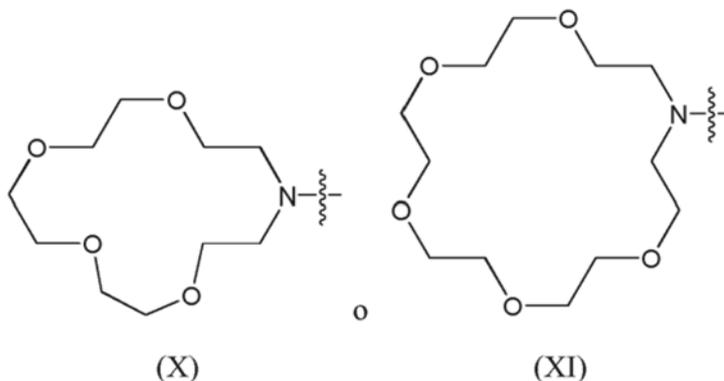
10 En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} y R^{15} son, en cada caso, independientemente alquilo C_1 - C_{12} . En algunas realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es metilo. En otras realizaciones más, R^{13} , R^{14} o R^{15} es etilo. En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_3 . En otras realizaciones más, R^{13} , R^{14} o R^{15} es isopropilo. En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_4 . En algunas realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_5 . En algunas otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_6 . En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_7 . En otras realizaciones más, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_8 . En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_9 . En algunas realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_{10} . En algunas realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_{11} . En otras realizaciones más, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_{12} .

20 Como se indica anteriormente, en algunas realizaciones, R^{12} es amidilo sustituido con un resto arilo. A este respecto, cada caso de R^{16} puede ser igual o diferente. En algunas de estas realizaciones, R^{16} es hidrógeno. En otras realizaciones, R^{16} es -CN. En otras realizaciones, R^{16} es heteroarilo, por ejemplo, tetrazolilo. En otras determinadas realizaciones, R^{16} es metoxi. En otras realizaciones, R^{16} es arilo, y el arilo está opcionalmente sustituido. Los sustituyentes opcionales a este respecto incluyen: alquilo C_1 - C_{12} , alcoxi C_1 - C_{12} , por ejemplo, metoxi; trifluorometoxi; halo, por ejemplo, cloro; y trifluorometilo.

25 En otras realizaciones, R^{16} es metilo. En otras realizaciones más, R^{16} es etilo. En algunas realizaciones, R^{16} es alquilo C_3 . En algunas otras realizaciones, R^{16} es isopropilo. En otras realizaciones más, R^{16} es alquilo C_4 . En otras realizaciones, R^{16} es alquilo C_5 . En otras realizaciones más, R^{16} es alquilo C_6 . En algunas otras realizaciones, R^{16} es alquilo C_7 . En algunas realizaciones, R^{16} es alquilo C_8 . En otras realizaciones más, R^{16} es alquilo C_9 . En algunas otras realizaciones, R^{16} es alquilo C_{10} . En otras realizaciones, R^{16} es alquilo C_{11} . En algunas otras realizaciones, R^{16} es alquilo C_{12} .

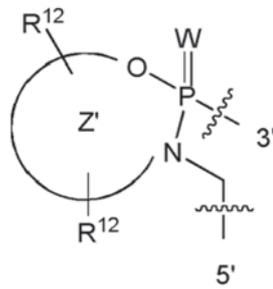
30 En algunas realizaciones, R^{16} es metoxi. En algunas realizaciones, R^{16} es etoxi. En otras realizaciones más, R^{16} es alcoxi C_3 . En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C_4 . En otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C_5 . En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C_6 . En otras realizaciones más, R^{16} es alcoxi C_7 . En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C_8 . En otras realizaciones más, R^{16} es alcoxi C_9 . En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C_{10} . En algunas realizaciones, R^{16} es alcoxi C_{11} . En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C_{12} .

35 En algunas otras realizaciones, R^8 y R^9 se unen para formar un éter corona de 12-18 miembros. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el éter corona es de 18 miembros, y en otras realizaciones, el éter corona es de 15 miembros. En determinadas realizaciones, R^8 y R^9 se unen para formar un heterociclo que tiene una de las siguientes estructuras (X) o (XI):



45 En algunas realizaciones, R^8 , R^9 o R^3 se unen con R^{10} para formar un heterociclo de 5-7 miembros. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^3 se une con R^{10} para formar un heterociclo de 5-7 miembros. En algunas realizaciones, el heterociclo es de 5 miembros. En otras realizaciones, el heterociclo es de 6 miembros. En otras realizaciones, el heterociclo es de 7 miembros. En algunas realizaciones, el heterociclo está representado por la siguiente estructura (XII):

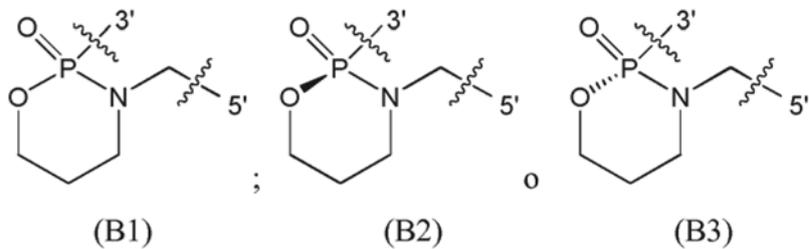
50



(XII)

en la que Z' representa un heterociclo de 5-7 miembros. En determinadas realizaciones de la estructura (XI), R¹² es hidrógeno en cada caso. Por ejemplo, la unión (B) puede tener una de las siguientes estructuras (B1), (B2) o (B3):

5



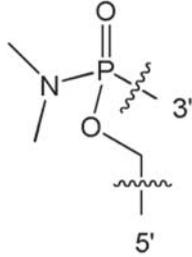
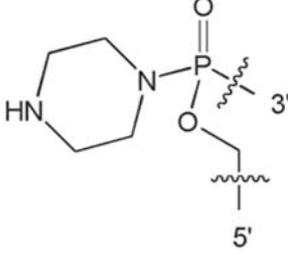
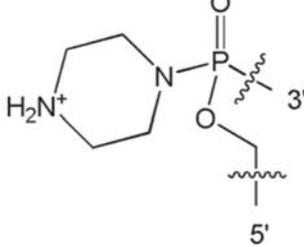
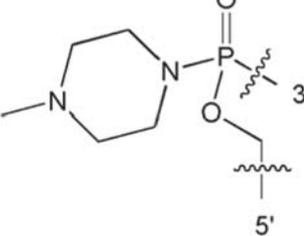
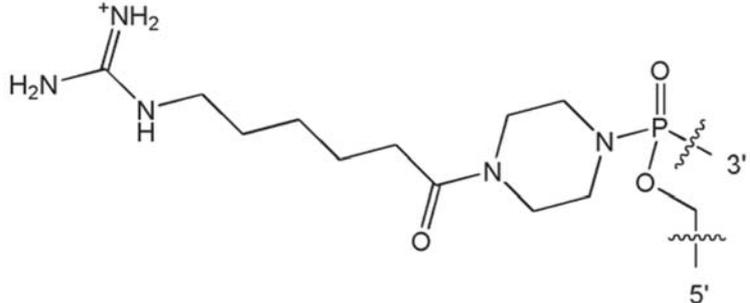
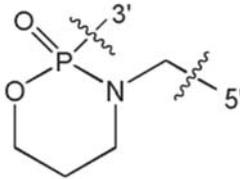
En otras determinadas realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₁-C₁₂ o amidilo que está sustituido adicionalmente con un resto arilfosforilo, por ejemplo, un resto trifenilfosforilo. Los ejemplos de uniones que tienen esta estructura incluyen B56 y B55.

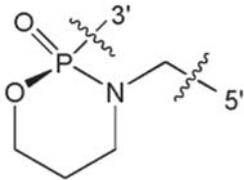
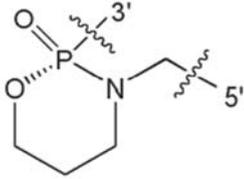
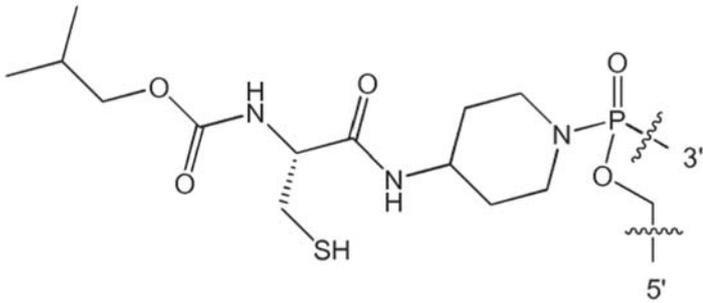
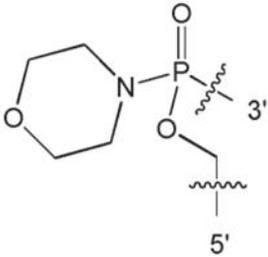
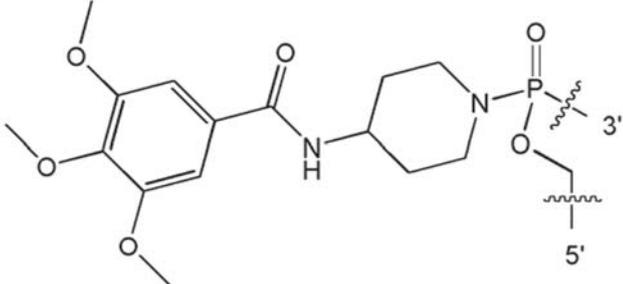
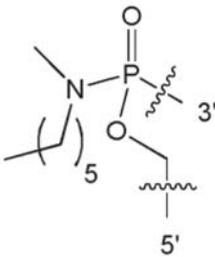
10

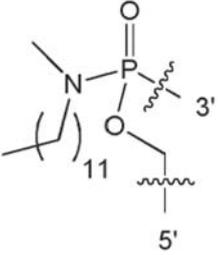
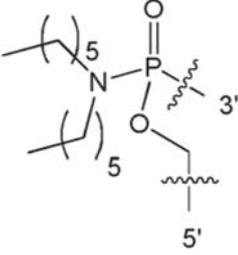
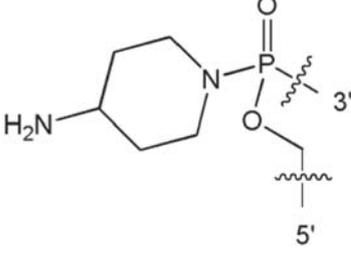
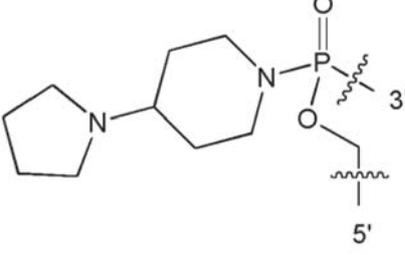
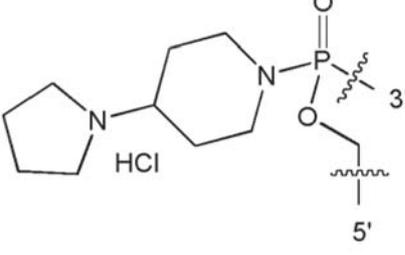
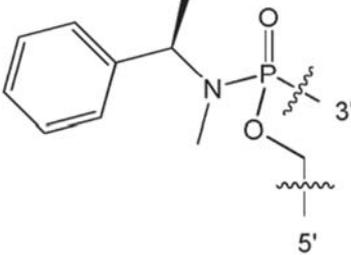
En determinada realización, la unión (B) no tiene ninguna de las estructuras A1-A5. La tabla 3 muestra uniones representativas de tipo (A) y (B).

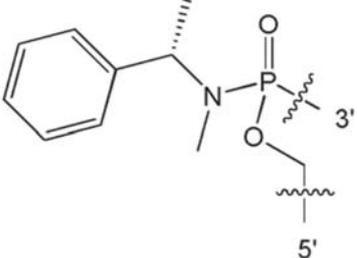
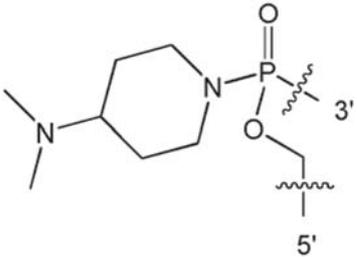
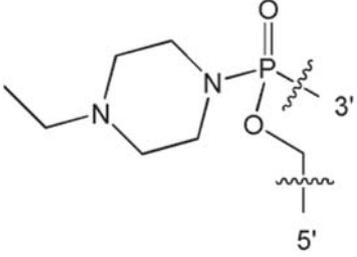
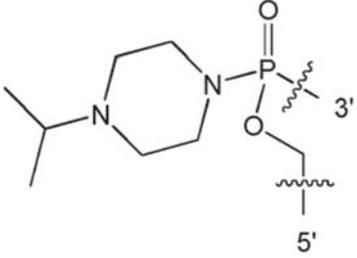
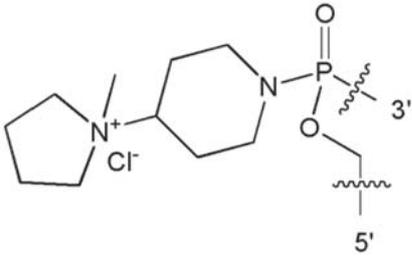
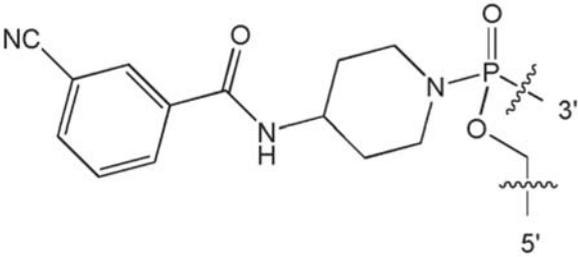
15

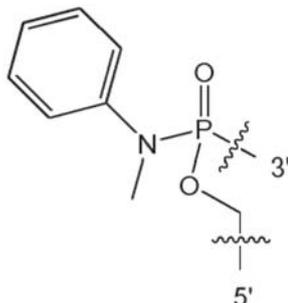
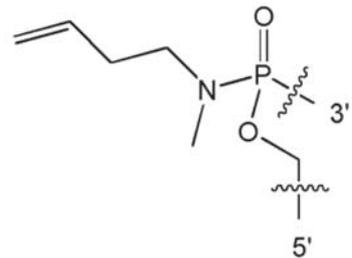
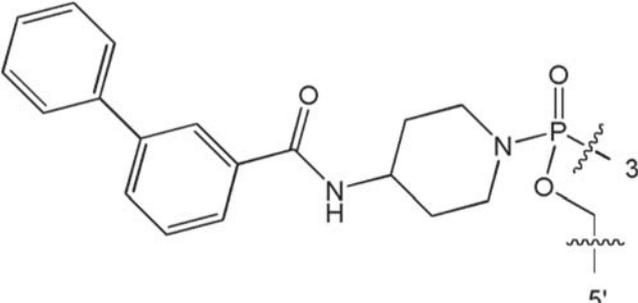
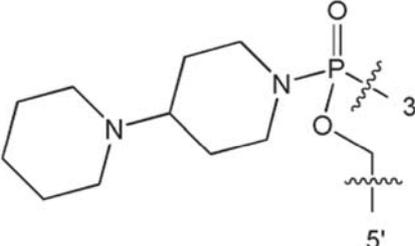
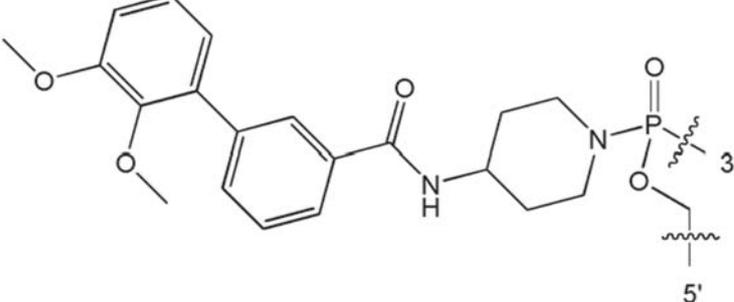
Tabla 3. Uniones entre subunidades representativas

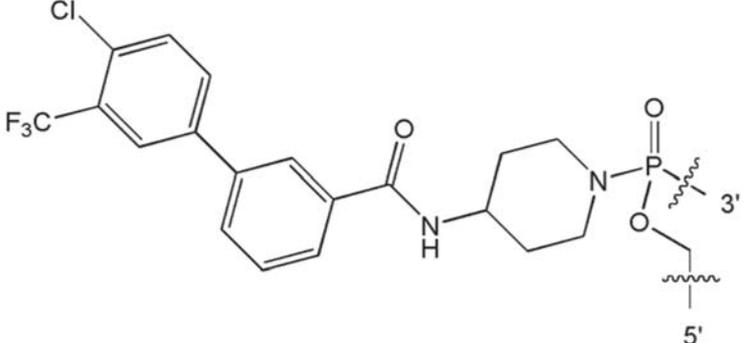
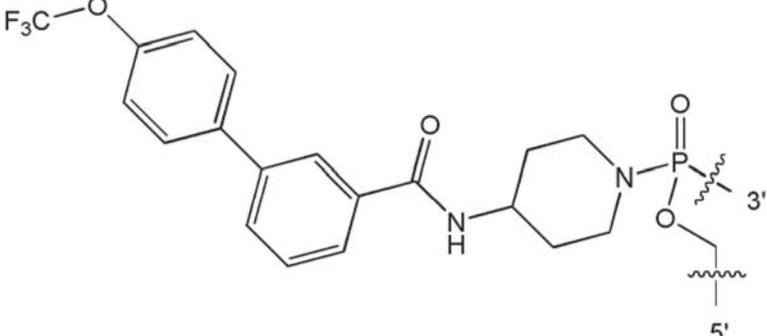
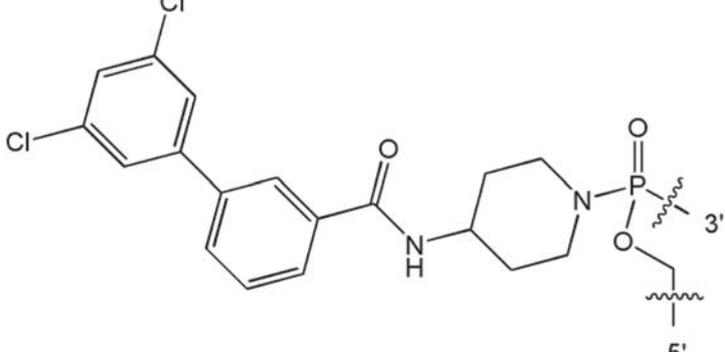
N.º	Nombre	Estructura
A1	PMO	
A2	PMO+ (forma no protonada representada)	
A3	PMO+ (+)	
A4	PMO ^{mepip} (m+)	
A5	PMO ^{GUX}	
B1	PMO ^{CP}	

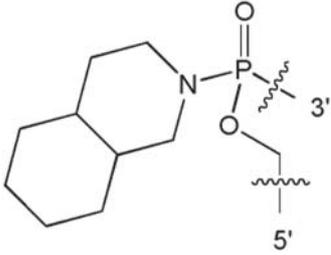
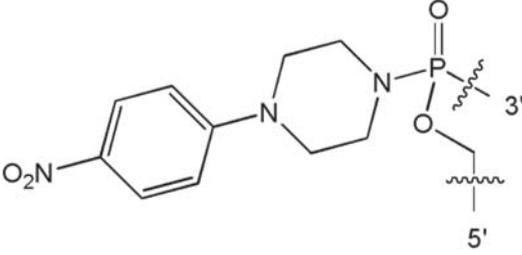
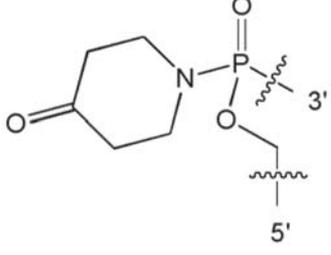
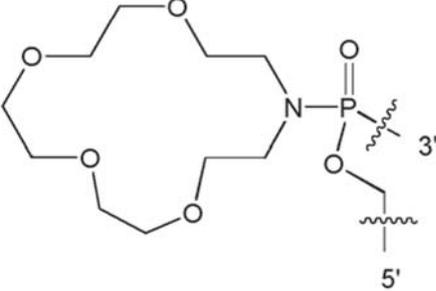
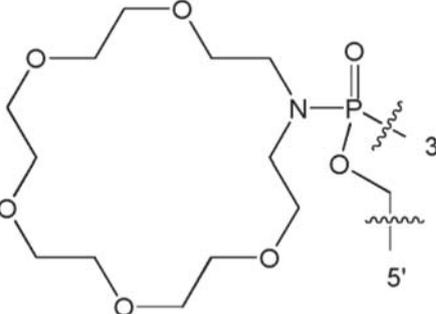
N.º	Nombre	Estructura
B2	PMO ^{cps}	
B3	PMO ^{cpr}	
B4	PMO ^{Shc}	
B5	PMO ^{morfolino (m)}	
B6	PMO ^{tri (t)}	
B7	PMO ^{hex (h)}	

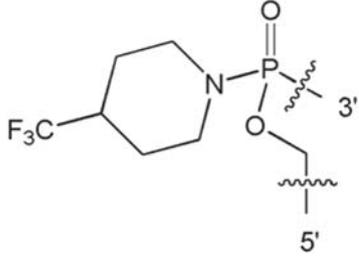
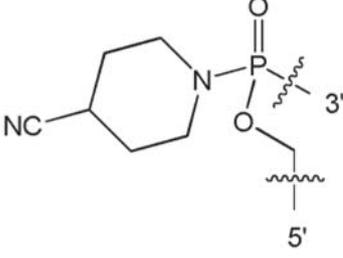
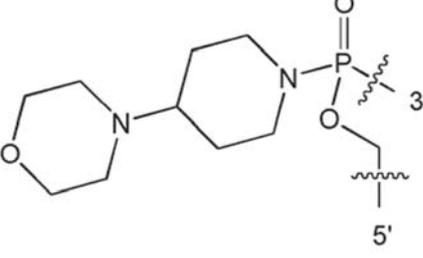
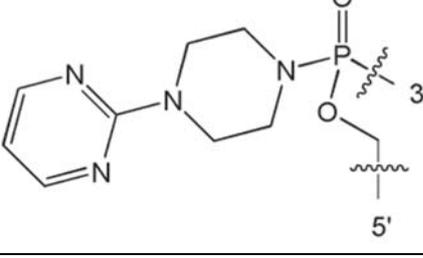
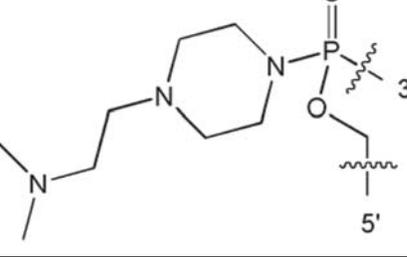
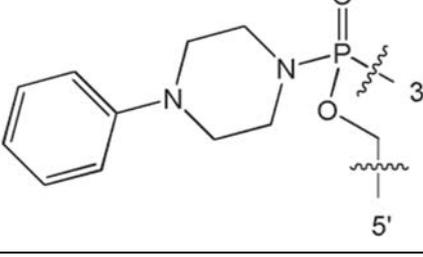
N.º	Nombre	Estructura
B8	PMO ^{dodec}	
B9	PMO ^{dihex}	
B10	PMO ^{apn} (a)	
B11	PMO ^{pir} (p)	
B12	PMO ^{pir} (sal HCl)	
B13	PMO ^{rba}	

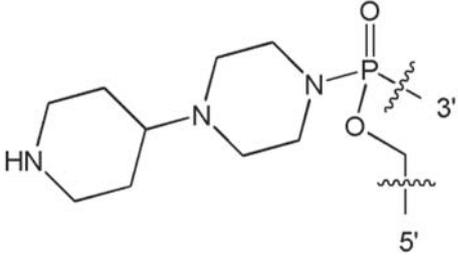
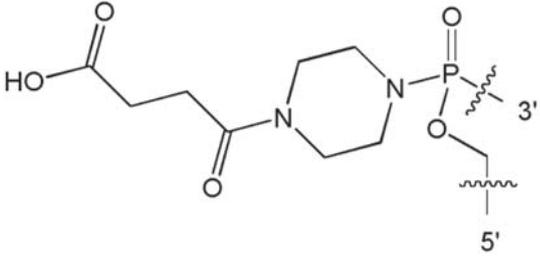
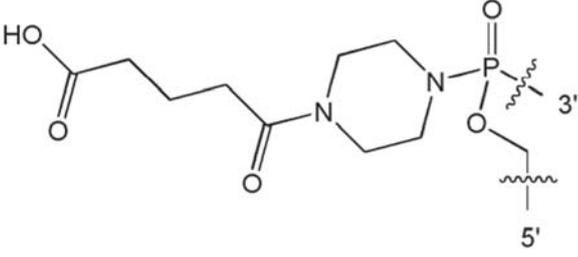
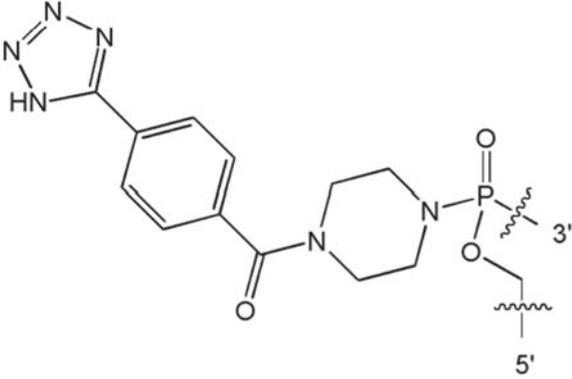
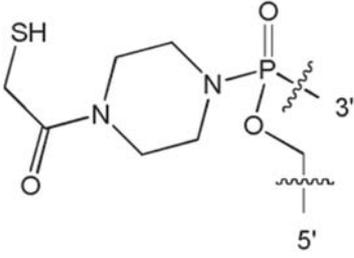
N.º	Nombre	Estructura
B14	PMO ^{sba}	
B15	PMO ^{dimetilapn}	
B16	PMO ^{etpip}	
B17	PMO ^{isrppip}	
B18	PMO ^{pirQMe}	
B19	PMO ^{cb}	

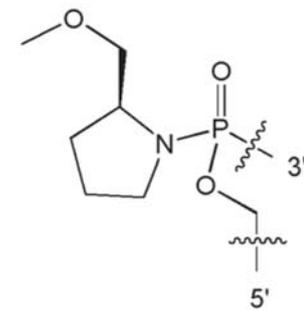
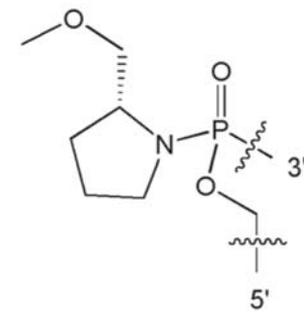
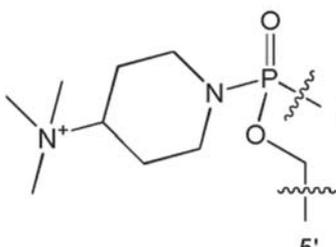
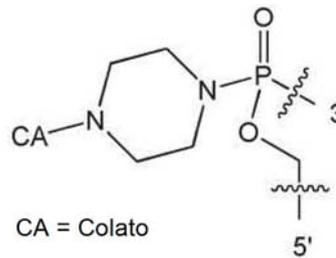
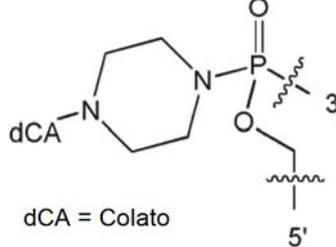
N.º	Nombre	Estructura
B20	PMO ^{ma}	
B21	PMO ^{bu}	
B22	PMO ^{bi}	
B23	PMO ^{pip}	
B24	PMO ^{odmb}	

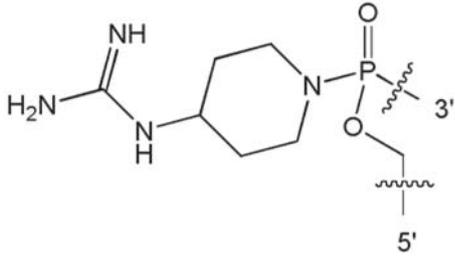
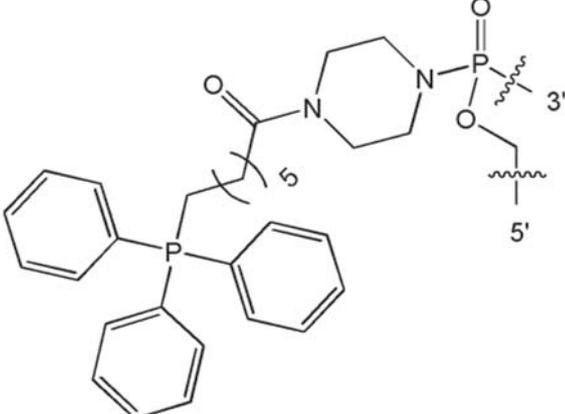
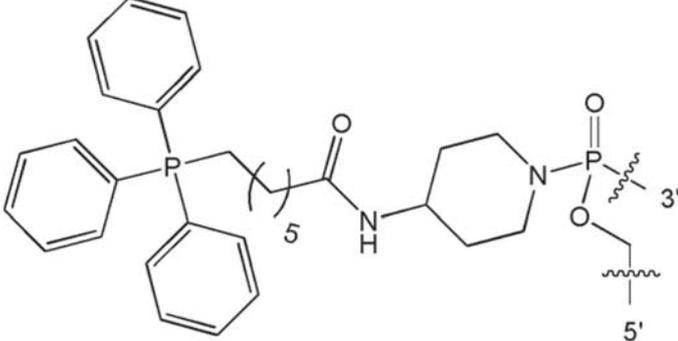
N.º	Nombre	Estructura
B25	PMO ^{ffb}	
B26	PMO ^{ctfb}	
B27	PMO ^{pftt}	
B28	PMO ^{dcb}	

N.º	Nombre	Estructura
B33	PMO ^q	
B34	PMO ^{npp}	
B35	PMO ^o	
B36	PMO ^{4ce}	
B37	PMO ^{5ce}	

N.º	Nombre	Estructura
B38	PMO ^{f3p}	
B39	PMO ^{Cyp}	
B40	PMO ^{mop}	
B41	PMO ^{pp}	
B42	PMO ^{dmepip}	
B43	PMO ^{NPpip}	

N.º	Nombre	Estructura
B44	PMO ^{bipip}	
B45	PMO ^{suc}	
46	PMO ^{glutámico}	
B47	PMO ^{tet}	
B48	PMO ^{tiol} (SH)	

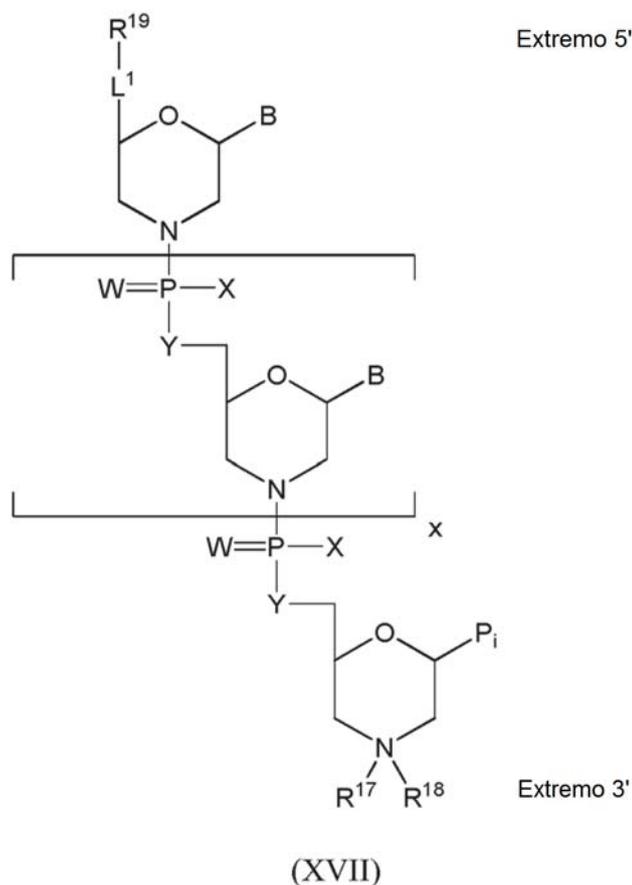
N.º	Nombre	Estructura
B49	PMO ^{pros}	
B50	PMO ^{pror}	
B51	PMO ^{lme}	
B52	PMO ^{ca}	 <p data-bbox="845 1467 989 1512">CA = Colato</p>
B53	PMO ^{dca}	 <p data-bbox="845 1736 1005 1780">dCA = Colato</p>

N.º	Nombre	Estructura
B54	PMO ^{guan} (g)	
B55	PMO ⁺ fos	
B56	PMO ^{apn} fos	

En las secuencias y el análisis siguientes, los nombres anteriores para las uniones se usan a menudo. Por ejemplo, una base que comprende una unión PMO^{apn} se ilustra como ^{apn}B, donde B es una base. Otras uniones se denominan de forma similar. Además, pueden usarse denominaciones abreviadas, por ejemplo, pueden usarse las denominaciones abreviadas en paréntesis anteriormente (por ejemplo, ^aB, se refiere a ^{apn}B). También pueden usarse otras abreviaturas fácilmente identificables.

Como se indica anteriormente, la presente divulgación también proporciona un oligómero que comprende grupos terminal modificados. Los solicitantes han descubierto que la modificación del extremo 3' y/o 5' del oligómero con diversos restos químicos proporciona propiedades terapéuticas beneficiosas (por ejemplo, potenciación del suministro celular, la potencia y/o la distribución tisular, etc.) a los oligómeros. En diversas realizaciones, los grupos terminales modificados comprenden un resto hidrófobo, mientras que, en otras realizaciones, los grupos terminales modificados comprenden un restos hidrófilo. Los grupos terminales modificados pueden presentar o no las uniones descritas anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los oligómeros comprenden uno o más grupos terminales modificados y uniones de tipo (A), por ejemplo, uniones en las que X es -N(CH₃)₂. En otras realizaciones, los oligómeros comprenden uno o más grupos terminales modificados y uniones de tipo (B), por ejemplo, uniones en las que X es 4-aminopiperidin-1-ilo (es decir, APN). En otras realizaciones más, los oligómeros comprenden uno o más grupos terminales modificados y una mezcla de uniones (A) y (B). Por ejemplo, los oligómeros pueden comprender uno o más grupos terminales modificados (por ejemplo, tritilo o trifetilacetilo) y uniones en las que X es -N(CH₃)₂ y uniones en las que X es 4-aminopiperidin-1-ilo. Otras combinaciones de grupos terminales modificados y uniones modificadas también proporcionan propiedades terapéuticas favorables a los oligómeros.

En una realización, los oligómeros que comprenden modificaciones terminales tienen la siguiente estructura (XVII):



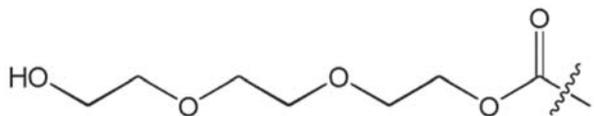
- 5 o una sal o isómero de la misma, en la que X, W e Y son como se definen anteriormente para cualquiera de las uniones (A) y (B) y:
 R^{17} es, en cada caso, independientemente inexistente, hidrógeno o alquilo C_1-C_6 ;
 R^{18} y R^{19} son, en cada caso, independientemente inexistentes, hidrógeno, un péptido de penetración celular, un aminoácido natural o no natural, alquilcarbonilo C_2-C_{30} , $-C(=O)OR^{21}$ o R^{20} ;
 10 R^{20} es, en cada caso, independientemente guanidinilo, heterociclilo, alquilo C_1-C_{30} , cicloalquilo C_3-C_8 ; arilo C_6-C_{30} , aralquilo C_7-C_{30} , alquilcarbonilo C_3-C_{30} , cicloalquilcarbonilo C_3-C_8 , cicloalquilalquilcarbonilo C_3-C_8 , arilcarbonilo C_7-C_{30} , aralquilcarbonilo C_7-C_{30} , alquiloxicarbonilo C_2-C_{30} , cicloalquiloxicarbonilo C_3-C_8 , ariloxicarbonilo C_7-C_{30} , aralquiloxicarbonilo C_8-C_{30} o $-P(=O)(R^{22})_2$;
 B es un resto de emparejamiento de bases;
 15 L^1 es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende enlaces seleccionados de alquilo, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, amida, éster, carbonilo, carbamato, fosforodiamidato, fosforoamidato, fosforotioato, piperazina y fosfodiéster; y
 x es un número entero de 0 o mayor; y en la que al menos uno de R^{18} o R^{19} es R^{20} ; y
 20 en la que al menos uno de R^{18} o R^{19} es R^{20} y con la condición de que tanto R^{17} como R^{18} no estén ausentes.

20 Los oligómeros con grupos terminales modificados pueden comprender incontables uniones de los tipos (A) y (B). Por ejemplo, los oligómeros pueden comprender únicamente uniones de tipo (A). Por ejemplo, X en cada unión puede ser $-N(CH_3)_2$. Como alternativa, los oligómeros pueden comprender únicamente uniones (B). En determinadas realizaciones, los oligómeros comprenden una mezcla de uniones (A) y (B), por ejemplo, de 1 a 4 uniones de tipo (B) y siendo el resto de las uniones de tipo (A). Las uniones a este respecto incluyen, pero sin limitación, uniones en las que X es aminopiperidinilo para el tipo (B) y dimetilamino para el tipo (A).

30 En algunas realizaciones, R^{17} está ausente. En algunas realizaciones, R^{17} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{17} es alquilo C_1-C_6 . En algunas realizaciones, R^{17} es metilo. En otras realizaciones más, R^{17} es etilo. En algunas realizaciones, R^{17} es alquilo C_3 . En algunas otras realizaciones, R^{17} es isopropilo. En otras realizaciones, R^{17} es alquilo C_4 . En otras realizaciones más, R^{17} es alquilo C_5 . En algunas otras realizaciones, R^{17} es alquilo C_6 .

En otras realizaciones, R¹⁸ está ausente. En algunas realizaciones, R¹⁸ es hidrógeno. En algunas realizaciones, R¹⁸ es un péptido de penetración celular como se describe en más detalle a continuación. En algunas realizaciones, R¹⁸ es un aminoácido natural o no natural, por ejemplo, trimetilglicina. En algunas realizaciones, R¹⁸ es R²⁰.

5 En otras realizaciones, R¹⁹ está ausente. En algunas realizaciones, R¹⁹ es hidrógeno. En algunas realizaciones, R¹⁹ es un péptido de penetración celular como se describe en más detalle a continuación. En algunas realizaciones, R¹⁹ es un aminoácido natural o no natural, por ejemplo, trimetilglicina. En algunas realizaciones, R¹⁹ es -C(=O)OR¹⁷, por ejemplo, R¹⁹ puede tener la siguiente estructura:



10 En otras realizaciones, R¹⁸ o R¹⁹ es alquilcarbonilo C₂-C₃₀, por ejemplo, -C(=O)(CH₂)_nCO₂H, donde n es de 1 a 6, por ejemplo, 2. En otros ejemplos, R¹⁸ o R¹⁹ es acetilo.

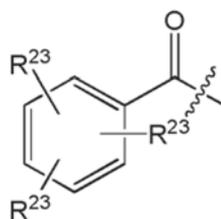
15 En algunas realizaciones, R²⁰ es, en cada caso, independientemente guanidinilo, heterociclilo, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₆-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀, -C(=O)OR²¹, o -P(=O)(R²²)₂, en la que R²¹ es alquilo C₁-C₃₀ que comprende uno o más restos de oxígeno o hidroxilo o combinaciones de los mismos y cada R²² es ariloxi C₆-C₁₂.

20 En otras determinadas realizaciones, R¹⁹ es -C(=O)OR²¹ y R¹⁸ es hidrógeno, guanidinilo, heterociclilo, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₇-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀ o -P(=O)(R²²)₂, en la que cada R²² es ariloxi C₆-C₁₂.

25 En otras realizaciones, R²⁰ es, en cada caso, independientemente guanidinilo, heterociclilo, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₇-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀ o -P(=O)(R²²)₂. Mientras que en otros ejemplos, R²⁰ es, en cada caso, independientemente guanidinilo, heterociclilo, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₇-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀ o -P(=O)(R²²)₂.

35 En algunas realizaciones, R²⁰ es guanidinilo, por ejemplo, monometilguanidinilo o dimetilguanidinilo. En otras realizaciones, R²⁰ es heterociclilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R²⁰ es piperidin-4-ilo. En algunas realizaciones, el piperidin-4-ilo está sustituido con grupos tritilo o Boc. En otras realizaciones, R²⁰ es cicloalquilo C₃-C₈. En otras realizaciones, R²⁰ es arilo C₆-C₃₀.

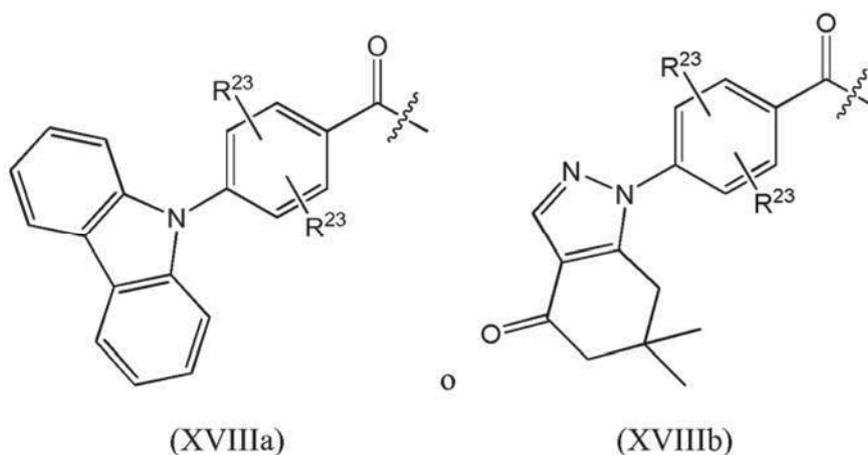
40 En algunas realizaciones, R²⁰ es arilcarbonilo C₇-C₃₀. Por ejemplo, En algunas realizaciones, R²⁰ tiene la siguiente estructura (XVIII):



(XVIII)

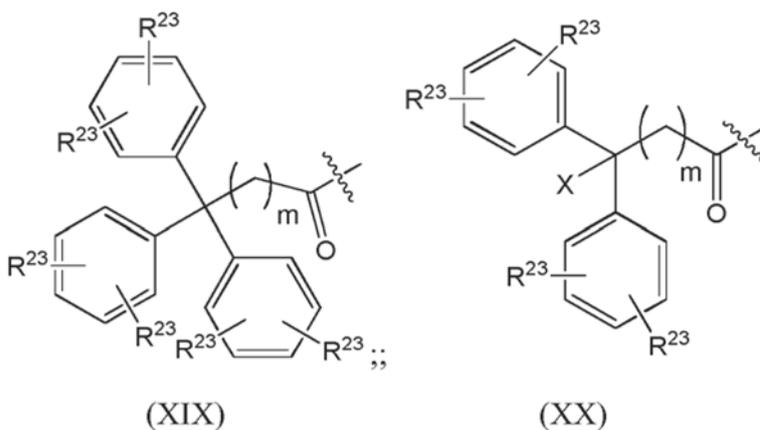
45 en la que R²³ es, en cada caso, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₃₀, alcoxi C₁-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₁-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, arilo, heteroarilo, heterociclilo o heterociclalquilo, y en la que un R²³ puede unirse con otro R²³ para formar un anillo heterociclilo. En algunas realizaciones, al menos un R²³ es hidrógeno, por ejemplo, en algunas realizaciones, cada R²³ es hidrógeno. En otras realizaciones, al menos un R²³ es alcoxi C₁-C₃₀, por ejemplo, en algunas realizaciones, cada R²³ es metoxi. En otras realizaciones, al menos un R²³ es heteroarilo, por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos un R²³ tiene una de las siguientes estructuras (XVIIIa) o (XVIIIb):

50

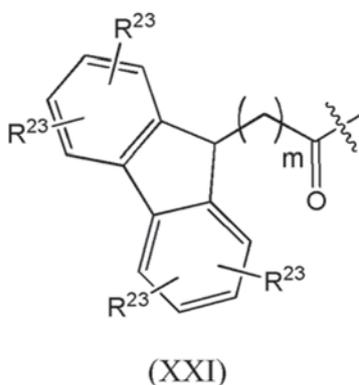


En otras realizaciones adicionales, un R^{23} se une con otro R^{23} para formar un anillo heterociclilo. Por ejemplo, en una realización, R^{20} es 5-carboxifluoresceína.

5 En otras realizaciones, R^{20} es aralquilarcarbonilo C_7-C_{30} . Por ejemplo, en diversas realizaciones, R^{20} tiene una de las siguientes estructuras (XIX), (XX) o (XXI):



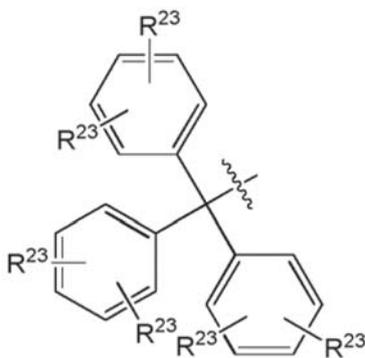
10 o



15 en la que R^{23} es, en cada caso, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{30} , alcoxi C_1-C_{30} , alquilocarbonilo C_1-C_{30} , aralquilo C_7-C_{30} , arilo, heteroarilo, heterociclilo o heterociclalquilo, en la que un R^{23} puede unirse con otro R^{23} para formar un anillo heterociclilo, X es -OH o halo y m es un número entero de 0 a 6. En algunas realizaciones específicas, m es 0. En otras realizaciones, m es 1, mientras que, en otras realizaciones, m es 2. En otras realizaciones, al menos un R^{23} es hidrógeno, por ejemplo, en algunas realizaciones, cada R^{23} es hidrógeno. En otras realizaciones, X es hidrógeno. En otras realizaciones, X es -OH. En otras realizaciones, X es Cl. En otras realizaciones, al menos un R^{23} es alcoxi C_1-C_{30} , por ejemplo, metoxi.

20

En otras realizaciones adicionales, R^{20} es aralquilo C_7-C_{30} , por ejemplo, tritilo. En otras realizaciones, R^{20} es metoxitritilo. En algunas realizaciones, R^{20} tiene la siguiente estructura (XXII):

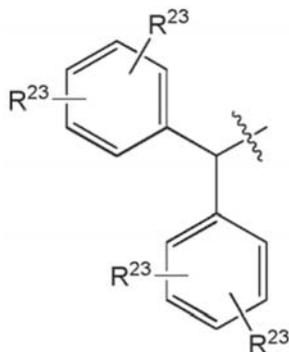


(XXII)

5 en la que R^{23} es, en cada caso, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{30} , alcoxi C_1-C_{30} , alquilocarbonilo C_1-C_{30} , aralquilo C_7-C_{30} , arilo, heteroarilo, heterociclilo o heterocicalquilo, y en la que un R^{23} puede unirse con otro R^{23} para formar un anillo heterociclilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cada R^{23} es hidrógeno. En otras

10

En otras realizaciones más, R^{20} es aralquilo C_7-C_{30} y R^{20} tiene la siguiente estructura (XXIII):

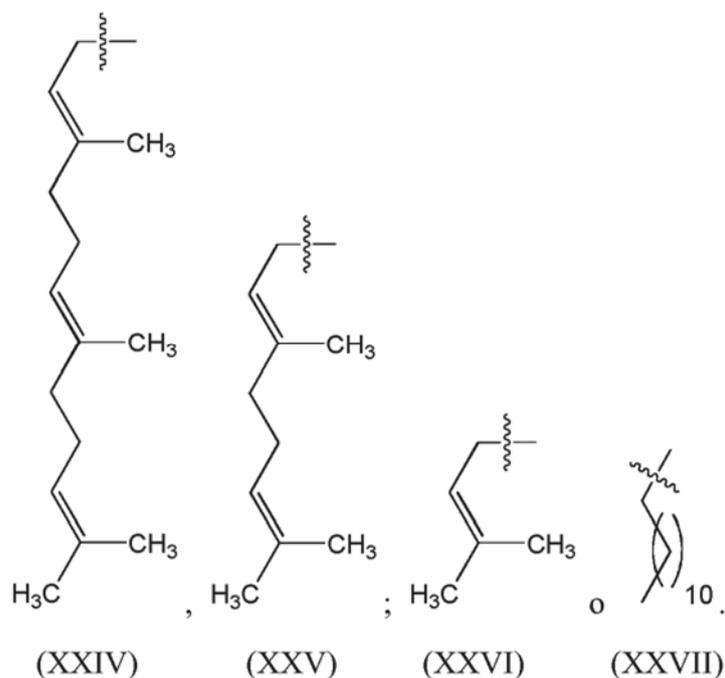


(XXIII)

15 En algunas realizaciones, al menos un R^{23} es halo, por ejemplo, cloro. En algunas otras realizaciones, un R^{23} es cloro en la posición para.

En otras realizaciones, R^{20} es alquilo C_1-C_{30} . Por ejemplo, En algunas realizaciones, R^{20} es un alquilo C_4-C_{20} y opcionalmente comprende uno o más dobles enlaces. Por ejemplo, En algunas realizaciones, R^{20} es un alquilo C_{4-10} que comprende un triple enlace, por ejemplo, un triple enlace terminal. En algunas realizaciones, R^{20} es hexin-6-ilo. En algunas realizaciones, R^{20} tiene una de las siguientes estructuras (XXIV), (XXV), (XXVI) o (XXVII):

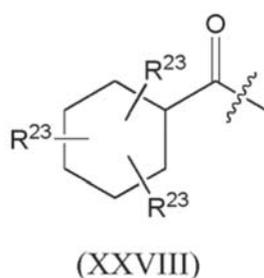
20



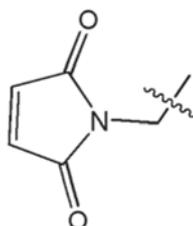
En otras realizaciones adicionales, R^{20} es un alquilcarbonilo C_3 - C_{30} , por ejemplo, un alquilcarbonilo C_3 - C_{10} . En algunas realizaciones, R^{20} es $-C(=O)(CH_2)_pSH$ o $-C(=O)(CH_2)_pSSHet$, en la que p es un número entero de 1 a 6 y Het es un heteroarilo. Por ejemplo, p puede ser 1 o p puede ser 2. En otro ejemplo Het es piridinilo, por ejemplo, piridin-2-ilo. En otras realizaciones, el alquilcarbonilo C_3 - C_{30} está sustituido con un oligómero adicional, por ejemplo, en algunas realizaciones, el oligómero comprende un alquilcarbonilo C_3 - C_{30} en la posición 3' que une el oligómero a la posición 3' de otro oligómero. Dichas modificaciones terminales se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación.

En otras realizaciones, R^{20} es un alquilcarbonilo C_3 - C_{30} que está sustituido adicionalmente con un resto arilfosforilo, por ejemplo, trifenilfosforilo. Los ejemplos de dichos grupos R^{20} incluyen la estructura 33 en la tabla 2.

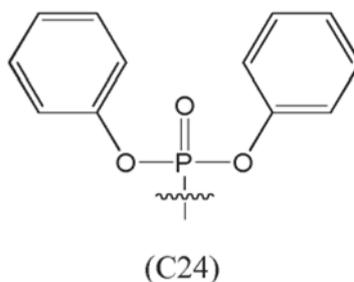
En otros ejemplos, R^{20} es cicloalquilcarbonilo C_3 - C_8 , por ejemplo, alquilcarbonilo C_5 - C_7 . En estas realizaciones, R^{20} tiene la siguiente estructura (XXVIII):



en la que R^{23} es, en cada caso, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C_1 - C_{30} , alcoxi C_1 - C_{30} , alquiloxicarbonilo C_1 - C_{30} , aralquilo C_7 - C_{30} , arilo, heteroarilo, heterociclilo o heterociclalquilo, y en la que un R^{23} puede unirse con otro R^{23} para formar un anillo heterociclilo. En algunas realizaciones, R^{23} es heterociclilalquilo, por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{23} tiene la siguiente estructura:



En algunas otras realizaciones, R^{20} es cicloalquilalquilcarbonilo C_3-C_8 . En otras realizaciones, R^{20} es alquiloxicarbonilo C_2-C_{30} . En otras realizaciones, R^{20} es cicloalquiloxicarbonilo C_3-C_8 . En otras realizaciones, R^{20} es ariloxicarbonilo C_7-C_{30} . En otras realizaciones, R^{20} es aralquiloxicarbonilo C_8-C_{30} . En otras realizaciones, R^{20} es $-P(=O)(R^{22})_2$, en la que cada R^{22} es ariloxi C_6-C^{12} , por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{20} tiene la siguiente estructura (C24):

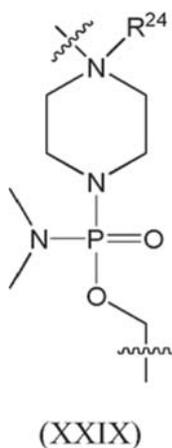


En otras realizaciones, R^{20} comprende uno o más átomos de halógeno. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{20} comprende un análogo perfluoro de cualquiera de los restos R^{20} anteriores. En otras realizaciones, R^{20} es p-trifluorometilfenilo, trifluorometiltritilo, perfluoropentilo o pentafluorofenilo.

En algunas realizaciones, el extremo 3' comprende una modificación y en otras realizaciones el extremo 5' comprende una modificación. En otras realizaciones, tanto el extremo 3' como el extremo 5' comprenden modificaciones. Por consiguiente, en algunas realizaciones, R^{18} está ausente y R^{19} es R^{20} . En otras realizaciones, R^{19} está ausente y R^{18} es R^{20} . En otras realizaciones más, R^{18} y R^{19} son cada uno R^{20} .

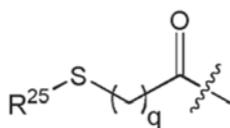
En algunas realizaciones, el oligómero comprende un péptido de penetración celular además de una modificación 3' o 5'. Por consiguiente, en algunas realizaciones, R^{19} es un péptido de penetración celular y R^{18} es R^{20} . En otras realizaciones, R^{18} es un péptido de penetración celular y R^{19} es R^{20} . En otras realizaciones de lo anterior, el péptido de penetración celular es un péptido rico en arginina.

En algunas realizaciones, el conector L^1 que une el grupo 5' terminal (es decir, R^{19}) al oligómero puede estar presente o ausente. El conector comprende incontables grupos funcionales y longitudes, con la condición de que el conector retenga su capacidad de unir el grupo 5' terminal al oligómero, y con la condición de que el conector no interfiera con la capacidad del oligómero de unirse a una secuencia diana de una manera específica de secuencia. En una realización, L comprende enlaces fosfordiamidato y piperazina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, L tiene la siguiente estructura (XXIX):



en la que R^{24} es inexistente, hidrógeno o alquilo C_1-C_6 . En algunas realizaciones, R^{24} está ausente. En algunas realizaciones, R^{24} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{24} es alquilo C_1-C_6 . En algunas realizaciones, R^{24} es metilo. En otras realizaciones, R^{24} es etilo. En otras realizaciones más, R^{24} es alquilo C_3 . En algunas otras realizaciones, R^{24} es isopropilo. En otras realizaciones más, R^{24} es alquilo C_4 . En algunas realizaciones, R^{24} es alquilo C_5 . En otras realizaciones más, R^{24} es alquilo C_6 .

En otras realizaciones más, R^{20} es alquilcarbonilo C_3-C_{30} y R^{20} tiene la siguiente estructura (XXX):



(XXX)

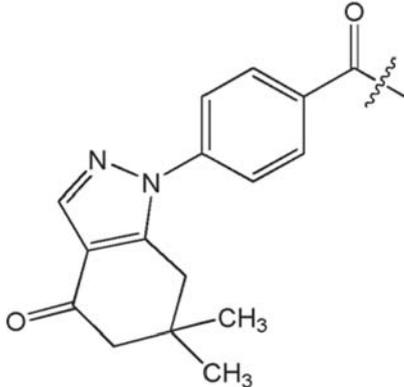
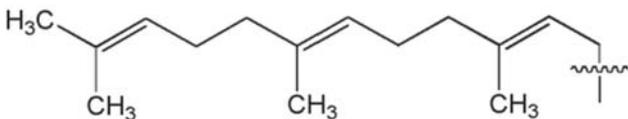
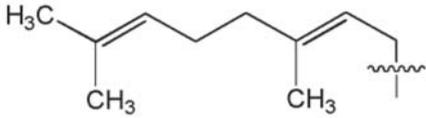
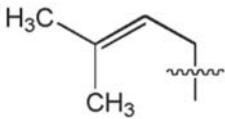
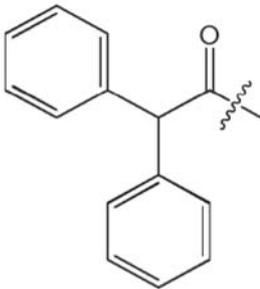
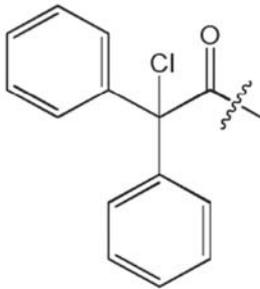
en la que R^{25} es hidrógeno o $-SR^{26}$, en la que R^{26} es hidrógeno, alquilo C_1-C_{30} , heterociclilo, arilo o heteroarilo, y q es un número entero de 0 a 6.

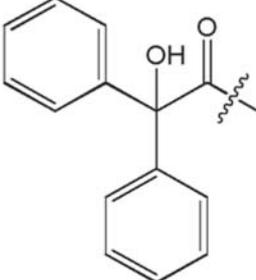
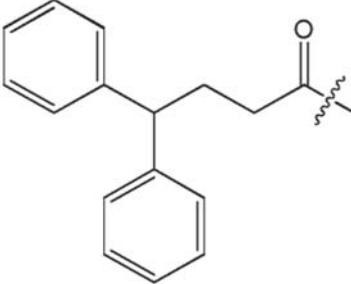
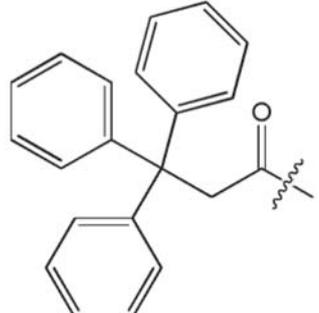
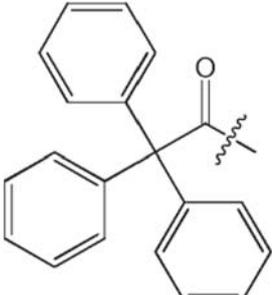
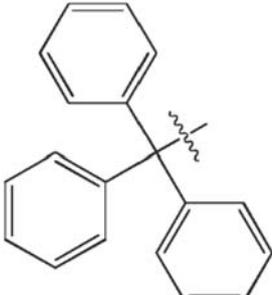
5 En otras realizaciones de cualquiera de las anteriores, R^{23} es, en cada caso, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{30} , alcoxi C_1-C_{30} , arilo, heteroarilo, heterociclilo o heterociclalquilo.

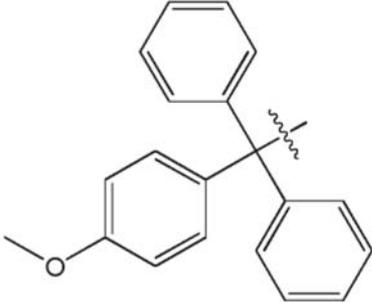
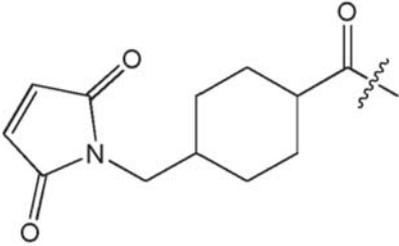
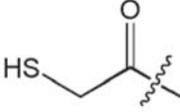
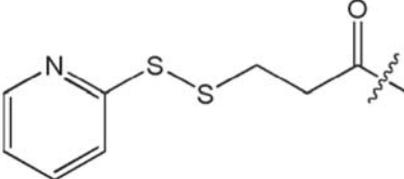
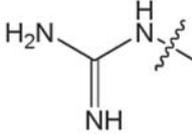
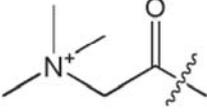
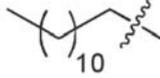
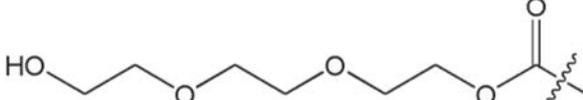
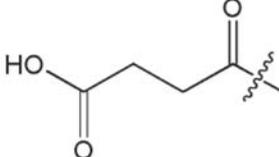
10 En algunas otras realizaciones, únicamente el extremo 3' del oligómero se conjuga con uno de los grupos indicados anteriormente. En algunas otras realizaciones, únicamente el extremo 5' del oligómero se conjuga con uno de los grupos indicados anteriormente. En otras realizaciones, tanto el extremo 3' como el extremo 5' comprenden uno de los grupos indicados anteriormente. El grupo terminal puede seleccionarse de uno cualquiera de los grupos indicados anteriormente o cualquiera de los grupos específicos ilustrados en la tabla 4.

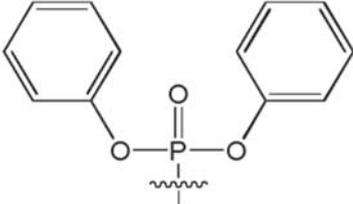
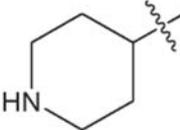
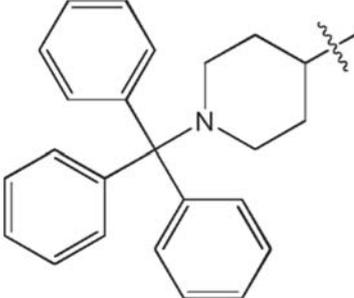
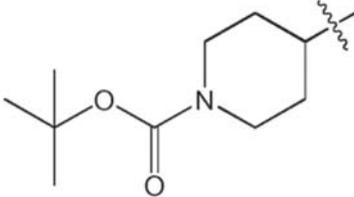
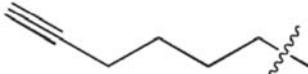
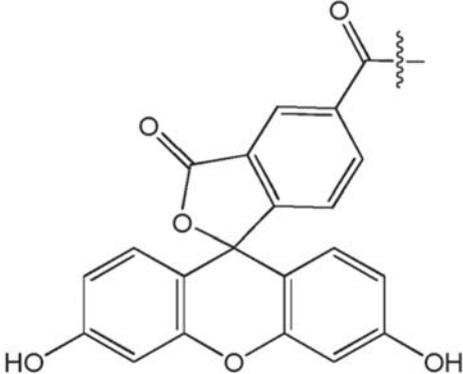
15 Tabla 4. Grupos terminales representativos

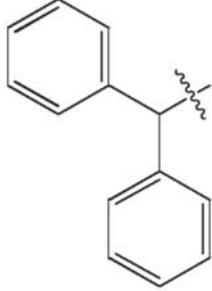
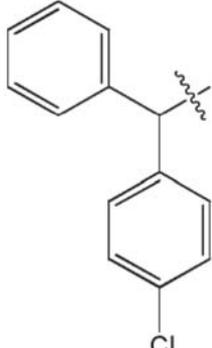
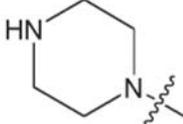
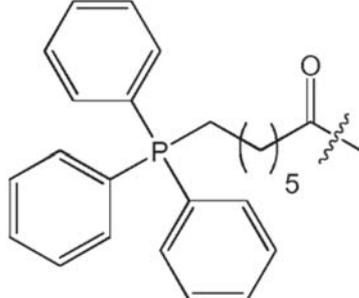
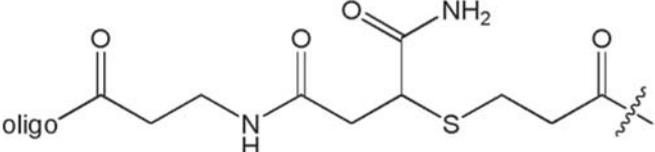
N.º	Nombre	Estructura
C1	Trimetoxibenzoílo	
C2	9-fluoreno-carboxilo	
C3	4-carbazolilbenzoílo	

N.º	Nombre	Estructura
C4	4-indazolilonebenzoilo	
C5	Farnesilo	
C6	Geranilo	
C7	Prenilo	
C8	Difenilacetilo	
C9	Clorodifenilacetilo	

N.º	Nombre	Estructura
C10	Hidroxidifenilacetilo	
C11	Trifenilpropionilo	
C12	Trifenilpropilo	
C13	Trifenilacetilo	
C14	Tritilo (Tr)	

N.º	Nombre	Estructura
C15	Metoxitritilo (MeOTr)	
C16	Metilsuccinimidilciclohexoilo	
C17	Tioacetilo	
C18	COCH ₂ CH ₂ SPPy	
C19	Guanidinilo	
C20	Trimetilglicina	
C21	Lauroílo	
C22	Trietilenglicolilo (EG3)	
C23	Succinicoacetilo	

N.º	Nombre	Estructura
C24	Difenilfosforilo	
C25	Piperidin-4-ilo	
C26	Tritilpiperidin-4-ilo	
C27	Boc-Piperidin-4-ilo	
C28	Hexin-6-ilo	
C29	5-carboxifluoresceína	

N.º	Nombre	Estructura
C30	Benzhidrilo	
C31	p-Clorobenzhidrilo	
C32	Piperazinilo (pip)	
C33	Trifenilfos	
C34	Dimerizado	 <p data-bbox="895 1704 1222 1733">Oligo = un oligómero adicional</p>

Transportadores peptídicos

5 De acuerdo con la invención, el presente oligómero se conjuga con un resto transportador peptídico de penetración celular, que es eficaz para potenciar el transporte del oligómero a las células. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el resto transportador peptídico es un péptido rico en arginina. En realizaciones adicionales, el resto transportador se adhiere al extremo 5' o 3' del oligómero. Cuando dicho péptido se conjuga con cualquier extremo, el extremo opuesto entonces está disponible para conjugación adicional con un grupo terminal modificado como se describe en el presente documento.

10 En algunas realizaciones de los anterior, el resto transportador peptídico comprende de 6 a 16 subunidades seleccionadas de subunidades X', subunidades Y' y subunidades Z',

donde

(a) cada subunidad X' representa independientemente lisina, arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de la estructura $R^{33}N=C(NH_2)R^{34}$, donde R^{33} es H o R; R^{34} es R^{35} , NH_2 , NHR o NR_{34} , donde R^{35} es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir adicionalmente oxígeno o nitrógeno; R^{33} y R^{34} pueden formar juntos un anillo; y la cadena lateral se une a dicho aminoácido mediante R^{33} o R^{34} ;

(b) cada subunidad Y' representa independientemente un aminoácido neutro $-C(O)-(CHR)_n-NH-$, donde n es de 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo; y

(c) cada subunidad Z' representa independientemente un α -aminoácido que tiene una cadena lateral aralquilo neutra;

en la que el péptido comprende una secuencia representada por uno de $(X'Y'X')_p$, $(X'Y')_m$, y $(X'Z'Z')_p$, donde p es de 2 a 5 y m es de 2 a 8.

En realizaciones seleccionadas, para cada X', el resto de la cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácido arginina (Arg). En realizaciones adicionales, cada Y' es $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$, donde n es de 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, abreviado en el presente documento como Ahx; cuando n es 2 y R es H, Y' es una subunidad de β -alanina.

En determinadas realizaciones, los péptidos de este tipo incluyen aquellos que comprenden dímeros de arginina que alternan con subunidades Y' individuales, donde Y' es Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula $(RY'R)_p$ o la fórmula $(RRY')_p$, donde Y' es Ahx. En una realización, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, R es arginina y p es 4.

En una realización adicional, cada Z' es fenilalanina, y m es 3 o 4.

En algunas realizaciones, el péptido conjugado se une a un extremo del oligómero mediante un conector Ahx-B, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de β -alanina.

En realizaciones seleccionadas, para cada X', el resto de la cadena lateral se selecciona independientemente del grupo que consiste en guanidilo ($HN=C(NH_2)NH-$), amidinilo ($HN=C(NH_2)C-$), 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo, y se selecciona preferentemente de guanidilo y amidinilo. En una realización, el resto de la cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácido arginina (Arg).

En algunas realizaciones, las subunidades Y' están contiguas, porque ninguna subunidad X' se interpone entre las subunidades Y', o se intercalan individualmente entre las subunidades X'. Sin embargo, en algunas realizaciones, la unión de subunidades puede ser entre subunidades Y'. En una realización, las subunidades Y' están en un extremo del transportador peptídico; en otras realizaciones, están flanqueadas por subunidades X'. En realizaciones adicionales, cada Y' es $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$, donde n es de 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, abreviado en el presente documento como Ahx. En realizaciones seleccionadas de este grupo, cada X' comprende un resto de cadena lateral guanidilo, como en una subunidad de arginina. Los péptidos ejemplares de este tipo incluyen aquellos que comprenden dímeros de arginina que alternan con subunidades Y' individuales, donde Y' es preferentemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula $(RY'R)_4$ o la fórmula $(RRY')_4$, donde Y' es preferentemente Ahx. En algunas realizaciones, el análogos de ácido nucleico se une a una subunidad Y' terminal, preferentemente en el extremo C. En otras realizaciones, el conector es de la estructura AhxB, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de β -alanina.

Los restos transportadores peptídicos como se describe anteriormente han demostrado potenciar enormemente la entrada en la célula de oligómeros adheridos, respecto a la captación del oligómero en ausencia del resto de transporte adherido, y respecto a la captación de un resto transportador adherido que carece de las subunidades Y' hidrófobas. Dicha captación potenciada puede evidenciarse por un aumento de al menos dos veces, o en otras realizaciones, un aumento de cuatro veces, en la captación del compuesto en células de mamífero respecto a la captación del agente por un resto de transporte adherido que carece de las subunidades Y' hidrófobas. En algunas realizaciones, la captación se potencia al menos veinte veces o al menos cuarenta veces, respecto al compuesto no conjugado.

Un beneficio adicional del resto de transporte peptídico es su capacidad esperada de estabilizar un dúplex entre un oligómero de antisentido y su secuencia de ácido nucleico diana. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, esta capacidad de estabilizar un dúplex puede resultar de la interacción electrostática entre el resto de transporte cargado positivamente y el ácido nucleico cargado negativamente. En algunas realizaciones, la cantidad de subunidades cargadas en el transportador es de menos de 14, como se indica anteriormente, o en otras realizaciones entre 8 y 11, ya que una cantidad demasiado alta de subunidades cargadas puede dar lugar a una reducción en la especificidad de secuencia.

La presente divulgación también incorpora conjugados de restos de transporte peptídico y análogos de ácido nucleico. Como se indica anteriormente, los restos de transporte peptídico en general son eficaces para potenciar la penetración celular de los análogos de ácido nucleico. Los solicitantes también han descubierto que incluir una subunidad de aminoácido glicina (G) o prolina (P) entre el análogo de ácido nucleico y el resto del resto de transporte peptídico (por ejemplo, en el extremo carboxi o amino del péptido portador) reduce la toxicidad del conjugado, mientras la eficacia permanece igual o se mejora respecto a conjugados con diferentes uniones entre el resto de transporte peptídico y el análogo de ácido nucleico. Por tanto, los conjugados actualmente divulgados tienen una mejor ventana terapéutica y son candidatos de fármaco más prometedores que otros conjugados de péptido-oligómero.

Además de la toxicidad reducida, se cree que la presencia de una subunidad de aminoácido glicina o prolina entre el análogo de ácido nucleico y el péptido portador proporciona ventajas adicionales. Por ejemplo, la glicina es barata y se acopla fácilmente al análogo de ácido nucleico (o conector opcional) sin ninguna posibilidad de racemización. De manera similar, la prolina se acopla fácilmente sin racemización y también proporciona péptidos portadores que no forman hélices. La hidrofobicidad de la prolina también puede conferir determinadas ventajas con respecto a la interacción del péptido portador con la bicapa lipídica de las células, y los péptidos portadores que comprenden múltiples prolinas (por ejemplo, en determinadas realizaciones) pueden resistir la formación de G cuádruple. Finalmente, en determinadas realizaciones, cuando el resto de prolina está adyacente a una subunidad de aminoácido arginina, el resto de prolina confiere estabilidad metabólica a los conjugados, ya que el enlace amida entre arginina-prolina no se puede escindir por las endopeptidasas comunes.

En algunas realizaciones, la conjugación de péptidos a oligonucleótidos de antisentido es como se describe en la publicación PCT WO2012/1150960. En una realización particular, por ejemplo, un oligonucleótido conjugado a péptido utiliza glicina como conector entre el CPP y el oligonucleótido de antisentido. Por ejemplo, los oligonucleótidos de antisentido de la invención pueden acoplarse a un péptido rico en arginina, tal como (Arg)₆Gly (6 argininas y 1 glicina unidas a un oligonucleótido). Como ejemplo, este péptido puede conjugarse a un PMO y se conoce como "R6-G-PMO".

Los transportadores peptídicos de penetración celular ricos en arginina ejemplares adicionales que comprenden diversos conectores (C, G, P, Ahx, B) se dan a continuación en la tabla 5. Como se divulga en la tabla 2 anterior, un transportador peptídico de penetración celular preferente es la SEQ ID NO: 45 conjugada con un PMO en el extremo 3' mediante un conector de glicina (R₆G). La unión de R₆G al extremo 5' también es una realización preferente.

Tabla 5. Transportadores peptídicos de penetración celular ricos en arginina

NOMBRE (DENOMINACIÓN)	SECUENCIA	SEQ ID NO. ^A
rTAT	RRRQRRKKR	39
Tat	RKKRRQRRR	40
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	41
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	42
R ₄	RRRR	43
R ₅	RRRRR	44
R ₆	RRRRRR	45
R ₇	RRRRRRR	46
R ₈	RRRRRRRR	47
R ₉	RRRRRRRRR	48
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXRXR	49
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	50
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	51
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP00002)	RAhxRRBRRAhxRRBR	52
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRRFFC	53
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRGRFFC	54

^ALas secuencias asignadas a las SEQ ID NO no incluyen la parte de unión (por ejemplo, C, G, P, Ahx, B, AhxB donde Ahx y B se refieren a ácido 6-aminohexanoico y beta-alanina, respectivamente).

Métodos de uso *in vitro*

En otro aspecto, dentro del contexto de la presente invención divulgada se divulgan métodos de uso de los oligonucleótidos de antisentido dirigidos a LMNA y/o HGPS descritos en el presente documento para tratar una célula o tejido *in vitro* para reducir la expresión de una o más isoformas de ARNm y/o proteínas mutantes de una manera beneficiosa. Las células o tejido que pueden modularse por los oligonucleótidos de antisentido de la presente invención son preferentemente células de mamífero, o más preferentemente células humanas. Dichas células puede ser de un estado sano o de un estado patológico, tal como células que expresan progerina. En determinados aspectos, la célula es una célula que expresa progerina, que provoca una laminopatía progeroide.

Dentro del contexto de la presente invención se divulgan, por lo tanto, métodos en general para reducir la expresión de ARNm de LMNA con corte y empalme anómalo *in vitro*, que comprende poner en contacto una célula con uno o más oligonucleótidos de antisentido descritos en el presente documento, o una composición que contiene los mismos, reduciendo de ese modo la expresión de progerina. Estos métodos y métodos relacionados pueden usarse para reducir la expresión de una cualquiera o más isoformas de ARNm de LMNA mutante descritas en el presente documento y conocidas en la técnica.

Los métodos *in vitro* pueden emplear composiciones que comprenden oligonucleótidos en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con células y/o tejidos sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcionado con una relación beneficio/riesgo razonable.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, auxiliar de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco, estearato de magnesio, calcio o cinc, o ácido esteárico), o material de encapsulación de disolvente. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para la célula o tejido que se pone en contacto.

Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua apirógena; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Aunque la invención anterior se ha descrito con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplos a efectos de claridad de comprensión, resultará fácilmente evidente para un experto en la materia ante los contenidos de la presente invención que puedan realizarse determinados cambios y modificaciones a la misma dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración únicamente y no a modo de limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

50 TABLA DEL LISTADO DE SECUENCIAS

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO:
LMNA exón 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGAGTA CAACCTGCGCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGACCTGCG GGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGA GCCCAGGTGGGCGGACCCATCTCCTCTGGCTCTTCTGC CTCCAGTGTACCGGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGG GGGGCAGTGGGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATCTGGTC ACCCGCTCCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCCGAAC CCAG	1

ES 2 674 929 T3

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO:
HGPS exón 11	GGCTCCCCTGTCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGAGTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGACCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGAGCCCAGGTGGGTGGACCCATCTCCTCTGGCTCTTCTGCTCCAGTGTACGGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATCTGGTCAACCGCTCCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCCCGAACCCAG	2
Exo11.25.133	CCGCTGGCAGATGCCTTGTCGGCAG	3
Exo11.25.138	CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC	4*
Exo11.25.142	GCTCCTGAGCCGCTGGCAGATGCCT	5*
Exo11.25.145	TGGGCTCCTGAGCCGCTGGCAGATG	6
Exo11.25.149	CACCTGGGCTCCTGAGCCGCTGGCA	7
Exo11.25.154	CCACCCACCTGGGCTCCTGAGCCGC	8
Exo11.25.158	GGGTCCACCCACCTGGGCTCCTGAG	9
Exo11.25.162	AGATGGGTCCACCCACCTGGGCTCC	10*
Exo11.25.166	GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG	11*
Exo11.25.170	GCCAGAGGAGATGGGTCCACCCACC	12
Exo11.25.174	AAGAGCCAGAGGAGATGGGTCCACC	13*
Exo11.25.177	CAGAAGAGCCAGAGGAGATGGGTCC	14*
Exo11.25.181	GAGGCAGAAGAGCCAGAGGAGATGG	15
Exo11.25.185	ACTGGAGGCAGAAGAGCCAGAGGAG	16*
Exo10SD.25.69	ACGTGGTGGTGATGGAGCAGGTCAT	17
Exo10SD.25.73	ACTCACGTGGTGGTGATGGAGCAGG	18
Exo10SD.25.79	GCTACCACTCACGTGGTGGTGATGG	19
Exo10SD.25.84	CGGCGGCTACCACTCACGTGGTGGT	20
Exo10SD.25.87	CAGCGGCGGCTACCACTCACGTGGT	21
Exo10SD.25.90	CCTCAGCGGCGGCTACCACTCACGT	22
Exo10SD.25.92	GGCCTCAGCGGCGGCTACCACTCAC	23
Exo10SD.25.96	GCTCGGCCTCAGCGGCGGCTACCAC	24
Exo11SA.25.779	CGAGTCTGGGACTGACCACTCAGGC	25
Exo11SA.25.796	AGGCTCAGGCGGGACGGCGAGTCTG	26
Exo11SA.25.801	AGACAAGGCTCAGGCGGGACGGCGA	27
Exo11SA.25.805	AGGGAGACAAGGCTCAGGCGGGACG	28
Exo11SA.25.809	GGGAAGGGAGACAAGGCTCAGGCGG	29
Exo11SA.25.814	GCCCTGGGAAGGGAGACAAGGCTCA	30
Exo11SA.25.820	GTGGGAGCCCTGGGAAGGGAGACAA	31
Exo11SA.25.828	CTGCTGCAGTGGGAGCCCTGGGAAG	32
Exo11SA.25.830	AGCTGCTGCAGTGGGAGCCCTGGGA	33
Exo11SA.25.836	CCCCGAGCTGCTGCAGTGGGAGCC	34
HsEx10	GCTACCACTCACGTGGTGGTGATGG-AcR ₆ G	35
HsEx11	GGGTCCACCCACCTGGGCTCCTGAG-AcR ₆ G	36
HsEx10-apn	GC ^{apn} TACCAC ^{apn} TCACG ^{apn} TGGTGG ^{apn} TGATGG	37
HsEx11-apn	GGG ^{apn} TCCACCCACC ^{apn} TGGGC ^{apn} TCC ^{apn} TGAG	38

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO:
rTAT	RRRQRRKKR	39*
Tat	RKKRRQRRR	40*
R ₉ F ₂	RRRRRRRRFF	41*
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRFFRRRR	42*
R ₄	RRRR	43*
R ₅	RRRRR	44*
R ₆	RRRRR	45*
R ₇	RRRRRR	46*
R ₈	RRRRRRR	47*
R ₉	RRRRRRRR	48*
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXR	49*
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	50*
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	51*
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	52*
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFFC	53*
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRRGRFFC	54*
* cubierto por las reivindicaciones		

Ejemplos

EJEMPLO 1

5

TRATAMIENTO DE CÉLULAS HGPS USANDO OLIGONUCLEÓTIDOS DE ANTISENTIDO, DIRIGIDOS A LMNA

Se usaron dos líneas primarias de fibroblastos, fibroblastos HGPS (HGADFN167) y fibroblastos de control (HGDFN168). Se sembraron células HGPS y de control en una placa de 24 pocillos a la densidad de aproximadamente 10 000 células/pocillo. Se introdujeron individualmente oligonucleótidos de morfolino dirigidos a los exones 11 y/o 10 del preARNm de lamina A en células HGPS cultivadas por captación libre o por nucleofección (Amaxa, por ejemplo). Para la captación libre, las células se cultivaron durante 1-2 semanas en un medio que contenía 25 µM o 50 µM o 80 µM de oligonucleótidos PMO. Esas células entonces se cribaron por inmunofluorescencia con anticuerpos antiprogerina o antilamina A/C. Las intensidades de fluorescencia de la tinción de progerina se cuantificaron usando un microscopio de fluorescencia Zeiss y un programa SPOT. Los experimentos se realizaron por triplicado, y los PMO que mostraron efectos en la regulación por disminución de progerina se seleccionaron para análisis adicional. El análisis incluía RT-PCR cuantitativa con cebador específico de progerina y análisis de transferencia de Western con anticuerpos antiprogerina.

EJEMPLO 2

TINCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA DE CÉLULAS HGPS DESPUÉS DE TRATAMIENTO CON OLIGONUCLEÓTIDOS DE ANTISENTIDO DIRIGIDOS A LMNA

Tinción de inmunofluorescencia: Para la inmunofluorescencia, las células se sembraron en portaobjetos de cámara de 4 pocillos. Después de fijación en paraformaldehído al 4 %/PBS a temperatura ambiente durante 15 min, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 %/PBS a temperatura ambiente durante 5 min, seguido de una incubación durante una noche en la solución de bloqueo a 4 °C (solución de bloqueo: BSA al 4 %/TBS). Las células se tiñeron con anticuerpo de ratón monoclonal antilamina A/C (MAB3211, Chemicon) y de conejo policlonal antiprogerina (anticuerpo peptídico personalizado, Yenzm) durante 3 horas a temperatura ambiente en el siguiente día. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor (Invitrogen). Los portaobjetos montados con medio de montaje Vectashield que contenía DAPI se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss. Los tiempos de exposición y los ajustes de adquisición se establecieron al inicio de cada serie de experimentos y se mantuvieron constantes para todos los tratamientos. Los resultados de los experimentos se exponen en la figura 2. Varios oligonucleótidos regularon por disminución la progerina de forma significativa.

EJEMPLO 3

SDS-PAGE Y ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA DE WESTERN DE CÉLULAS HGPS DESPUÉS DE TRATAMIENTO CON OLIGONUCLEÓTIDOS DE ANTISENTIDO DIRIGIDOS A LMNA

40

SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western: Se recogieron las células tratadas, se aclararon dos veces en PBS y después se lisaron en tampón de carga de SDS-PAGE de Laemmli. Las muestras se calentaron durante 15 minutos a 95 °C y después se cargaron en geles al 10 % de SDS-PAGE. En cuanto al análisis de transferencia de Western, las proteínas se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche al 5 %/TBST a 4 °C durante una noche y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en BSA al 4 %/TBST a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Después de lavados con TBST, las membranas se incubaron en anticuerpos secundarios diluidos a 1:5000 en leche al 1 %/TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. La quimioluminiscencia se detectó con un kit de detección de transferencia de Western ECL (Pierce). Los anticuerpos primarios usados incluyen anticuerpo de ratón monoclonal antilamina A/C (MAB3211, Chemicon), de conejo policlonal antiprogerina (anticuerpo peptídico personalizado, Yenzm) y de conejo policlonal antiactina (Pan-actin, Cell Signaling). Los resultados de los experimentos se exponen en la figura 3. El oligonucleótido correspondiente a 699 (SEQ ID NO: 4) mostró regulación por disminución significativa de progerina en el experimento, a pesar de retirarse de y no solapar con el sitio de corte y empalme críptico del exón 11 de LMNA.

EJEMPLO 4

ANÁLISIS DE RT-PCR CUANTITATIVA DE CÉLULAS HGPS DESPUÉS DE TRATAMIENTO CON OLIGONUCLEÓTIDOS DE ANTISENTIDO DIRIGIDOS A LMNA

RT-PCR cuantitativa: Los experimentos de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) se realizaron para medir los niveles de expresión de progerina, lamina A y β -actina en 164 fibroblastos (p13, HGPS clásico) después de tratamiento con oligonucleótido 699 (SEQ ID NO: 4) y 706 (SEQ ID NO: 11). Todas las reacciones se realizaron por triplicado en un sistema rápido de PCR en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems usando mezcla SYBR Green (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 ciclo de 2 min a 50 °C; 1 ciclo de 15 min a 95 °C; y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 57 °C y 45 s a 72 °C. La secuencia del cebador directo de β -actina es TCTTTGCAGCCACATTCCCG y el cebador inverso es GGCTTGCGGGTGTAAAAGC. La secuencia del cebador directo para amplificar progerina/lamina A es GCAACAAGTCCAATGAGGACCA. Los cebadores inversos específicos de progerina y lamina A se diseñaron de acuerdo con la estrategia del sistema de mutación resistente a amplificación, introduciendo una mutación en la penúltima base para aumentar la especificidad. La secuencia cebadora específica de progerina es CATGATGCTGCAGTTCTGGGGGCTCTGGAC, y para lamina A es CATGATGCTGCAGTTCTGGGGGCTCTGGAT. Los resultados de los experimentos se exponen en la figura 4.

EJEMPLO 5

SDS-PAGE Y ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA DE WESTERN DE CÉLULAS HGPS DESPUÉS DE TRATAMIENTO CON OLIGONUCLEÓTIDOS DE ANTISENTIDO DIRIGIDOS A LMNA

SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western: Se recogieron las células tratadas, se aclararon dos veces en PBS y después se lisaron en tampón de carga de SDS-PAGE de Laemmli. Las muestras se calentaron durante 15 minutos a 95 °C y después se cargaron en geles al 10 % de SDS-PAGE. En cuanto al análisis de transferencia de Western, las proteínas se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche al 5 %/TBST a 4 °C durante una noche y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en BSA al 4 %/TBST a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Después de lavados con TBST, las membranas se incubaron en anticuerpos secundarios diluidos a 1:5000 en leche al 1 %/TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. La quimioluminiscencia se detectó con un kit de detección de transferencia de Western ECL (Pierce). Los anticuerpos primarios usados incluyen anticuerpo de ratón monoclonal antilamina A/C (MAB3211, Chemicon), de conejo policlonal antiprogerina (anticuerpos peptídico personalizado, Yenzm) y antiactina conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Sigma). Los resultados de los experimentos se exponen en la figura 5. El oligonucleótido 699 (SEQ ID NO: 4) dio lugar a regulación por disminución de progerina y regulación por aumento de lamina A, a pesar de retirarse de y no solapar con el sitio de corte y empalme críptico del exón 11 de LMNA.

REFERENCIAS

- Cao, K., C. D. Blair, et al. (2011). "Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts." *J Clin Invest*.
- Egholm, M., O. Buchardt, et al. (1993). "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules." *Nature* 365(6446): 566-8.
- Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, et al. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." *Lancet Neurol* 8(10): 918-28.
- Osorio, F. G., C. L. Navarro, et al. (2011). "Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging." *Sci Transl Med* 3(106): 106ra107.

Scaffidi, P. y T. Misteli (2005). "Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Nat Med 11(4): 440-5.

5 Svasti, S., T. Suwanmanee, et al. (2009). "RNA repair restores hemoglobin expression in IVS2-654 thalassemic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 106(4): 1205-10.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Sarepta Therapeutics, Inc.
 <120> ANÁLOGOS OLIGONUCLEOTÍDICOS DIRIGIDOS A LMNA HUMANA
 <130> 120178.494WO
 15 <150> US 61/568.590
 <151> 08-12-2011
 <160> 54
 20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 270
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana de LMNA ejemplar
 30 <400> 1
 ggctcccact gcagcagctc gggggacccc gctgagtaca acctgcgctc gcgcaccgtg 60
 ctgtgcggga cctgcgggca gcctgccgac aaggcatctg ccagcggctc aggagcccag 120
 gtgggaggac ccattctctc tggctcttct gcctccagtg tcacgggtcac tcgcagctac 180
 cgcagtgtgg ggggcagtgg ggggtggcagc ttcggggaca atctgggtcac ccgctcctac 240
 ctctctgggca actccagccc ccgaaccag 270
 <210> 2
 35 <211> 270
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia diana de LMNA ejemplar
 <400> 2
 ggctcccact gcagcagctc gggggacccc gctgagtaca acctgcgctc gcgcaccgtg 60
 ctgtgcggga cctgcgggca gcctgccgac aaggcatctg ccagcggctc aggagcccag 120
 gtgggtggac ccattctctc tggctcttct gcctccagtg tcacgggtcac tcgcagctac 180
 cgcagtgtgg ggggcagtgg ggggtggcagc ttcggggaca atctgggtcac ccgctcctac 240
 ctctctgggca actccagccc ccgaaccag 270
 45 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 3
 5 cgcctggcag atgcctgtgc ggcag 25

 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 4
 15 ctgagccgct ggcagatgcc ttgtc 25

 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar
 25
 <400> 5
 gctcctgagc cgctggcaga tgct 25

 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar
 35
 <400> 6
 tgggctcctg agccgctggc agatg 25

 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencias de dirección a HGPS ejemplares
 45
 <400> 7
 50 cacctgggct cctgagccgc tggca 25

 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 8
 60 ccacccacct gggctcctga gccgc 25

 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 9
 5 ggggccaccc acctgggctc ctgag 25

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

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 10
 15 agatgggtcc acccacctgg gctcc 25

 <210> 11
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar
 25
 <400> 11
 gaggagatgg gtccaccac ctggg 25

 <210> 12
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar
 35
 <400> 12
 gccagaggag atgggtccac ccacc 25

 <210> 13
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar
 45
 <400> 13
 50 aagagccaga ggagatgggt ccacc 25

 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 14
 60 cagaagagcc agaggagatg ggtcc 25

 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 15
 5 gaggcagaag agccagagga gatgg 25

 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 16
 15 actggaggca gaagagccag aggag 25

 <210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 17
 25 acgtggtggt gatggagcag gtcac 25

 <210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 18
 35 actcacgtgg tggatgga gcagg 25

 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 19
 45 gctaccactc acgtggtggt gatgg 25

 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 20
 55 cggcggctac cactcacgtg gtgg 25

 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 21
 65 gctaccactc acgtggtggt gatgg 25

 <210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 70 <213> Artificial

ES 2 674 929 T3

<220>
<223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

5 <400> 21
cagcggcggc taccactcac gtggt 25

10 <210> 22
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

20 <400> 22
cctcagcggc ggctaccact cacgt 25

25 <210> 23
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

35 <400> 23
ggcctcagcg gcggctacca ctcac 25

40 <210> 24
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

50 <400> 24
gctcggcctc agcggcggct accac 25

55 <210> 25
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

65 <400> 25
cgagtctggg actgaccact caggc 25

70 <210> 26
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

75 <220>
<223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

80 <400> 26
aggctcaggc gggacggcga gtctg 25

85 <210> 27
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 27
 5 agacaaggct caggcgggac ggcga 25

 <210> 28
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 28
 15 agggagacaa ggctcaggcg ggacg 25

 <210> 29
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar
 25
 <400> 29
 gggaaggag acaaggctca ggcg 25

 <210> 30
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar
 35
 <400> 30
 gccctgggaa gggagacaag gctca 25

 <210> 31
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar
 45
 <400> 31
 50 gtgggagccc tgggaaggga gacaa 25

 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55

 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

 <400> 32
 60 ctgctgcagt gggagccctg ggaag 25

 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

5 <400> 33
 agctgctgca gtgggagccc tggga 25

10 <210> 34
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

20 <400> 34
 cccccgagct gctgcagtgg gagcc 25

25 <210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = un transportador peptídico de penetración celular preferente

40 <400> 35
 gctaccactc acgtggtggt gatggn 26

45 <210> 36
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = un transportador peptídico de penetración celular preferente

60 <400> 36
 ggggccaccc acctgggctc ctgagn 26

65 <210> 37
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

70 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

75 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n = unión entre subunidades apn

80 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = unión entre subunidades apn

ES 2 674 929 T3

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n = unión entre subunidades apn

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n = unión entre subunidades apn

15 <400> 37
 gcnaccacnc acnggtggn gatgg 25

20 <210> 38
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de dirección a HGPS ejemplar

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n = unión entre subunidades apn

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n = unión entre subunidades apn

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n = unión entre subunidades apn

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n = unión entre subunidades apn

50 <400> 38
 gggncaccc accnggcnc cngag 25

55 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

65 <400> 39

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
 1 5

60 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

ES 2 674 929 T3

<400> 40
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

5
<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

<400> 41
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
1 5 10

15
<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

<400> 42
25 Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30
<220>
<223> transportadores peptídicos de penetración celular ricos en arginina

35
<400> 43
Arg Arg Arg Arg
1

40
<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

45
<220>
<223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

<400> 44
Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

50
<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

55
<220>
<223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

ES 2 674 929 T3

<400> 45
Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

5
<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

<400> 46
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

15
<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

<400> 47
25 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 48
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

<400> 48
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

40
<210> 49
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

45
<220>
<223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

<220>
50 <221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Acp

<220>
55 <221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Acp

<220>
60 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Acp

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = Acp

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa = Acp

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa - Acp

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = Acp

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa = Acp

<400> 49

Arg Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15

30 <210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa - ácido 6-aminohexanoico

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<400> 50

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
 1 5 10

60

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico
 30
 <400> 51
 35
 Arg Xaa Arg
 1 5 10 15
 <210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = beta-alanina
 55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico
 60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = beta-alanina
 65

ES 2 674 929 T3

<400> 52

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

5 <210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> transportador de penetración celular rico en arginina

<400> 53

15 Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Phe Phe Cys
1 5 10 15

<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

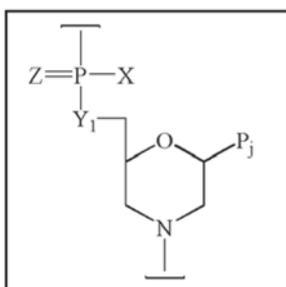
20 <220>
<223> transportador peptídico de penetración celular rico en arginina

25 <400> 54

Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Phe Phe Cys
1 5 10 15

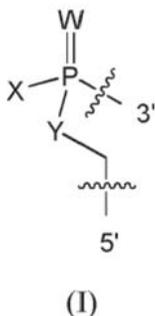
REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido de antisentido para reducir la expresión de ARNm de LMNA con corte y empalme anómalo, teniendo el oligonucleótido una estructura sustancialmente no cargada y estando compuesto de subunidades morfolino y uniones entre unidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono 5'-exocíclico de una subunidad adyacente, que contiene 25-40 bases, y que comprende una secuencia de dirección que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11, 13, 14 y 16, en el que el oligonucleótido de antisentido se adhiere covalentemente a un péptido de penetración celular y resto conector, en el que el resto conector se selecciona de glicina, cisteína, prolina, ácido 6-aminohexanoico (Ahx), β-alanina (B) y Ahx-B, y el péptido de penetración celular se selecciona de las SEQ ID NO: 39-54.
2. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que las subunidades morfolino en el oligonucleótido se unen por uniones que contienen fósforo, de acuerdo con la siguiente estructura:



- en la que Z es S u O,
 $X = NR^1R^2$ u OR^6 ,
 $Y = O$ o NR^7 ,
 Pj es un resto de emparejamiento de bases de purina o pirimidina,
 y cada una de dichas uniones se selecciona de:
- (a) unión no cargada (a), en la que cada uno de R^1 , R^2 , R^6 , y R^7 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;
- (b1) unión catiónica (b1), en la que $X = NR^1R^2$ e $Y = O$, y NR^1R^2 representa un grupo piperazino sustituido opcional, de modo que $R^1R^2 = -CHRCHR(N(R^3)(R^4))CHRCHR-$, en la que cada R^4 es H, CH_3 o no existe, y R^3 se selecciona de H, alquilo inferior, $C(=NH)NH_2$, $Z-L-NHC(=NH)NH_2$, y $[C(O)CHR'NH]_mH$, en el que cuando Z es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que tiene enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;
- (b2) unión catiónica (b2), en la que $X = NR^1R^2$ e $Y = O$, $R^1 = H$ o CH_3 , y $R^2 = LNR^3R^4R^5$, en la que L, R^3 , y R^4 se definen como anteriormente, y R^5 es H, alquilo inferior o (alcoxi)alquilo inferior; y
- (b3) unión catiónica (b3), en la que $Y = NR^7$ y $X = OR^6$, y $R^7 = LNR^3R^4R^5$, en la que L, R^3 , y R^4 y R^5 se definen como anteriormente, y R^6 es H o alquilo inferior; y al menos una de dichas uniones se selecciona de uniones catiónicas (b1), (b2) y (b3).
3. El oligonucleótido de la reivindicación 2, donde
- (i) cada uno de R^1 y R^2 , en las uniones de tipo (a), es metilo;
- (ii) al menos una unión es de tipo (b1), donde cada R es H, R^4 es H, CH_3 , o un par de electrones, y R^3 se selecciona de H, CH_3 , $C(=NH)NH_2$, y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$;
- (iii) al menos una unión es de tipo (b1), donde cada R es H, R^4 es un par de electrones, y R^3 se selecciona de $C(=NH)NH_2$ y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$;
- (iv) al menos una unión es de tipo (b1), donde cada R es H, R^4 es un par de electrones, y R^3 se selecciona de $C(=NH)NH_2$ y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$, y opcionalmente donde R^3 es $C(O)-L-NHC(NH)NH_2$, y L a un hidrocarburo que tiene la estructura $-(CH_2)_n-$, donde n es de 1 a 12; o
- (v) al menos una unión es de tipo (b1), donde cada R es H, y cada uno de R^3 y R^4 es independientemente H o CH_3 .
4. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el péptido de penetración celular se adhiere en su extremo C al extremo 5' o extremo 3' del oligonucleótido a través del resto conector.

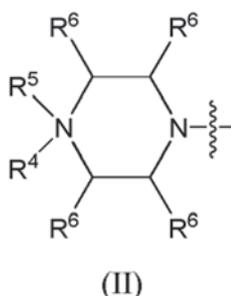
5. Un oligonucleótido de antisentido, en el que el oligonucleótido reduce la expresión del ARNm de LMNA con corte y empalme anómalo, comprendiendo el oligonucleótido una estructura, comprendiendo la estructura una secuencia de estructuras cíclicas de morfolino unidas por uniones entre subunidades, uniendo las uniones entre unidades un extremo 3' de una estructura cíclica de morfolino con un extremo 5' de una estructura cíclica de morfolino adyacente, en el que cada estructura cíclica de morfolino se une a un resto de emparejamiento de bases, de modo que el oligonucleótido puede unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico diana, que comprende una secuencia de dirección que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11, 13, 14 y 16, en el que las uniones entre subunidades tienen la siguiente estructura general (I):



- 10 o una sal o isómero de la misma, y en el que cada una de las uniones (I) entre subunidades son independientemente unión (A) o unión (B):

- 15 en el que para la unión (A):

W es, en cada caso, independientemente S u O;
 X es, en cada caso, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$ o;

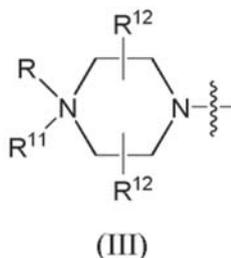


- 20 Y es, en cada caso, independientemente O o $-NR^2$;
 R^1 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;
 R^2 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o $-LNR^4R^5R^7$;
 25 R^3 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 ;
 R^4 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ o $-[C(O)CHR'NH]_mH$, donde Z es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;
 R^5 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones;
 30 R^6 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o metilo;
 R^7 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoialquilo C_1-C_6 ;
 L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende grupos alquilo, alcoxi o alquilamino, o combinaciones de los mismos; y

- 35 en el que para la unión (B):

- W es, en cada caso, independientemente S u O;
 X es, en cada caso, independientemente $-NR^8R^9$ u $-OR^3$; e
 Y es, en cada caso, independientemente O o $-NR^{10}$, o
 40 Y y W son cada uno O,
 R^8 es, en cada caso, independientemente hidrógeno o alquilo C_2-C_{12} ;
 R^9 es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} , aralquilo C_1-C_{12} o arilo;
 R^{10} es, en cada caso, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} o $-LNR^4R^5R^7$;

en el que R^8 y R^9 pueden unirse para formar un heterociclo mono- o bicíclico de 5-18 miembros o R^8 , R^9 o R^3 pueden unirse con R^{10} para formar un heterociclo de 5-7 miembros, y en el que, cuando X es 4-piparazino, X tiene la siguiente estructura (III):



- 5 en la que:
- R^{11} es, en cada caso, independientemente alquilo C_2-C_{12} , aminoalquilo C_1-C_{12} , alquilcarbonilo C_1-C_{12} , arilo, heteroarilo o heterocicilo; y
- 10 R es, en cada caso, independientemente un par de electrones, hidrógeno o alquilo C_1-C_{12} ; y
- R^{12} es, en cada caso, independientemente, hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} , aminoalquilo C_1-C_{12} , $-NH_2$, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}R^{14}R^{15}$, alquilcarbonilo C_1-C_{12} , oxo, $-CN$, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonil guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, $-SR^{13}$ o alcoxi C_1-C_{12} , en la que R^{13} , R^{14} y R^{15} son, en cada caso, independientemente alquilo C_1-C_{12} ;
- 15 en el que al menos una de las uniones entre subunidades es la unión (B), o en el que cada unión (B), si está presente, tiene la misma estructura en cada caso; y
- en el que el oligonucleótido de antisentido se adhiere covalentemente a un péptido de penetración celular y resto conector, en el que el resto conector se selecciona de glicina, cisteína, prolina, ácido 6-aminohexanoico (Ahx), β -alanina (B) y Ahx-B, y el péptido de penetración celular se selecciona de las SEQ ID NO: 39-54.
- 20
6. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la secuencia de dirección consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11, 13, 14 y 16.
- 25 7. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de dirección es la SEQ ID NO: 4.
8. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de dirección es la SEQ ID NO: 5.
- 30 9. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de dirección es la SEQ ID NO: 10.
10. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de dirección es la SEQ ID NO: 11.
- 35 11. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de dirección es la SEQ ID NO: 13.
- 40 12. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de dirección es la SEQ ID NO: 14.
13. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de dirección es la SEQ ID NO: 16.
- 45

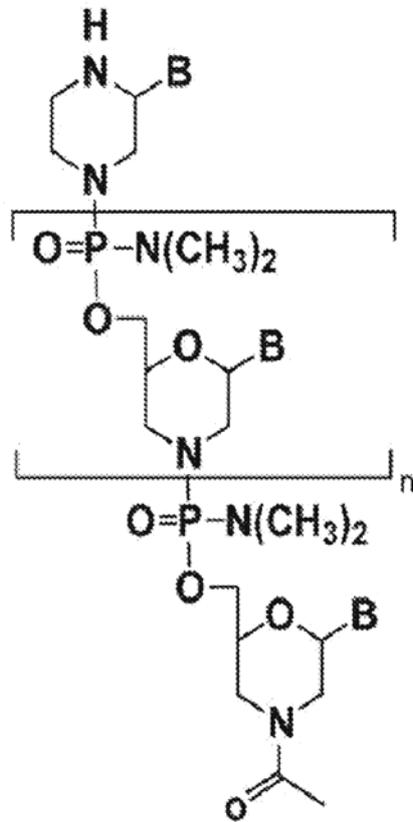


FIG. 1A

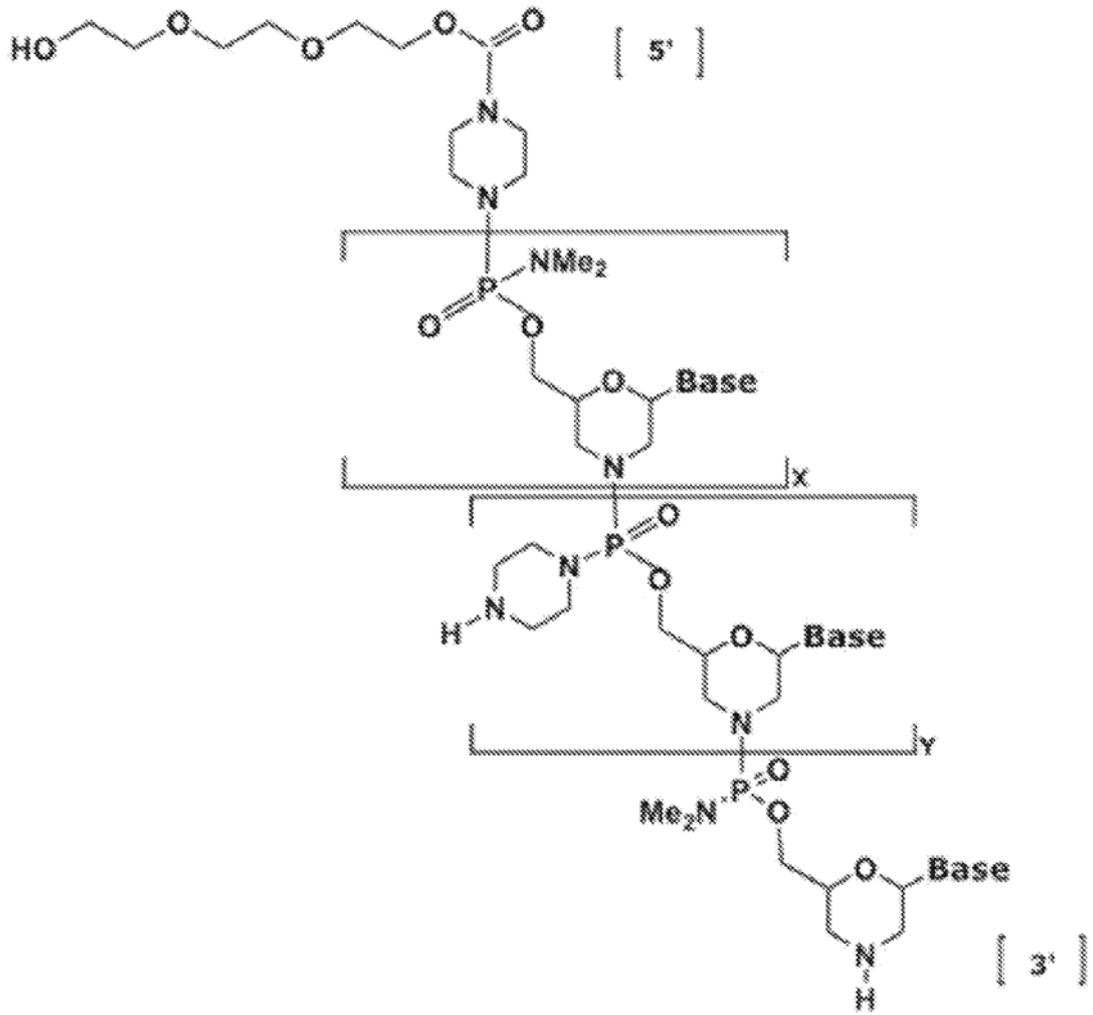


FIG. 1B

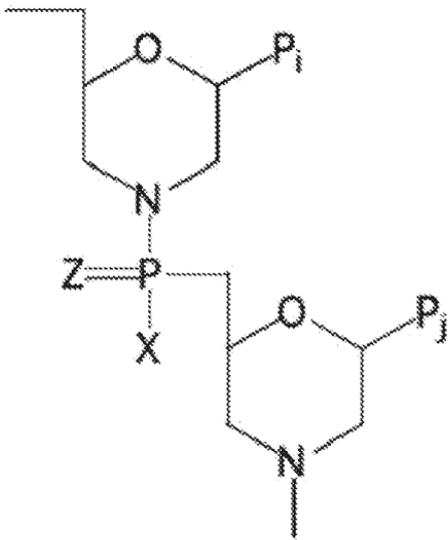


FIG. 1D

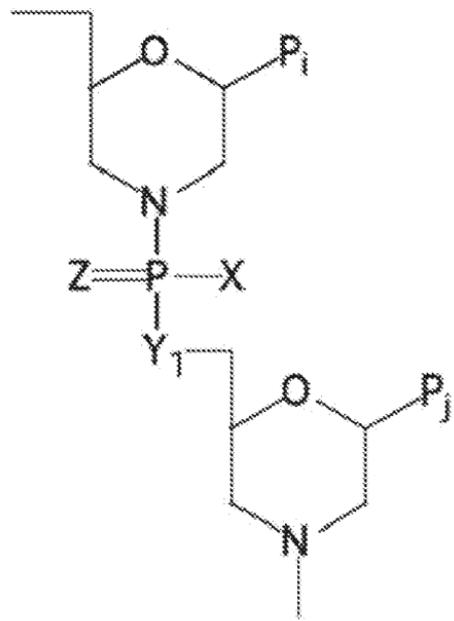


FIG. 1E

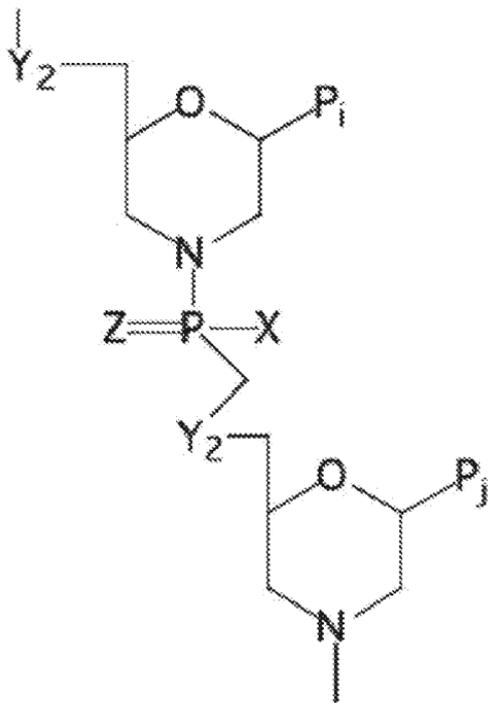


FIG. 1F

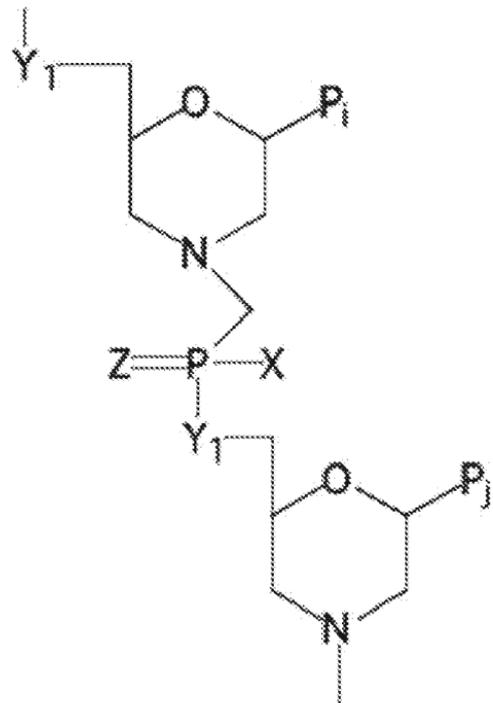
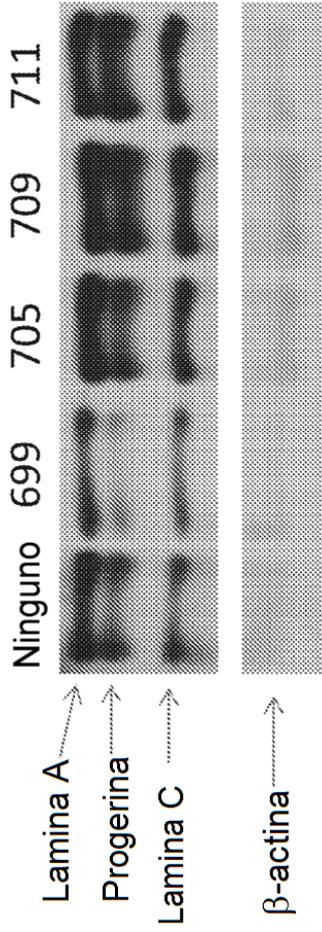


FIG. 1G

SSO n.º/SEQ ID NO:	Cribado IF inicial (6 días a 50 uM)	
	Lamina A/C (%)	Progerina (%)
Ninguno	100,000	100,000
711/16	*61,786	*59,663
709/14	108,805	*64,186
705/10	*108,207	*67,607
699/4	*87,305	*75,803
706/11	*115,919	*79,194
708/13	85,908	*82,588
700/5	91,136	*82,817
698/3	*77,241	89,421
707/12	*90,455	92,44
702/7	*111,877	95,114
703/8	*116,475	104,998
701/6	96,477	106,397
704/9	*136,971	111,343
710/15	99,673	*123,422

* Cambio significativo (p < 0,05)

FIG. 2



SSO n°/ SEQ ID	Cribado IF Inicial (6 días a 50 uM)		Cribado de Western (2 sem. a 80 uM)	
	Lamina A/C (%)	Progerina (%)	Lamina A (%)	Progerina (%)
Ninguno	100,000	100,000	100,000	100,000
711/16	*61,786	*59,663	74,139	168,78
709/14	108,805	*64,186	*40,411	61,869
705/10	*108,207	*67,607	49,431	61,706
699/4	*87,305	*75,803	68,654	*32,151
706/11	*115,919	*79,194		
708/13	85,908	*82,588		
700/5	91,136	*82,817		

FIG. 3

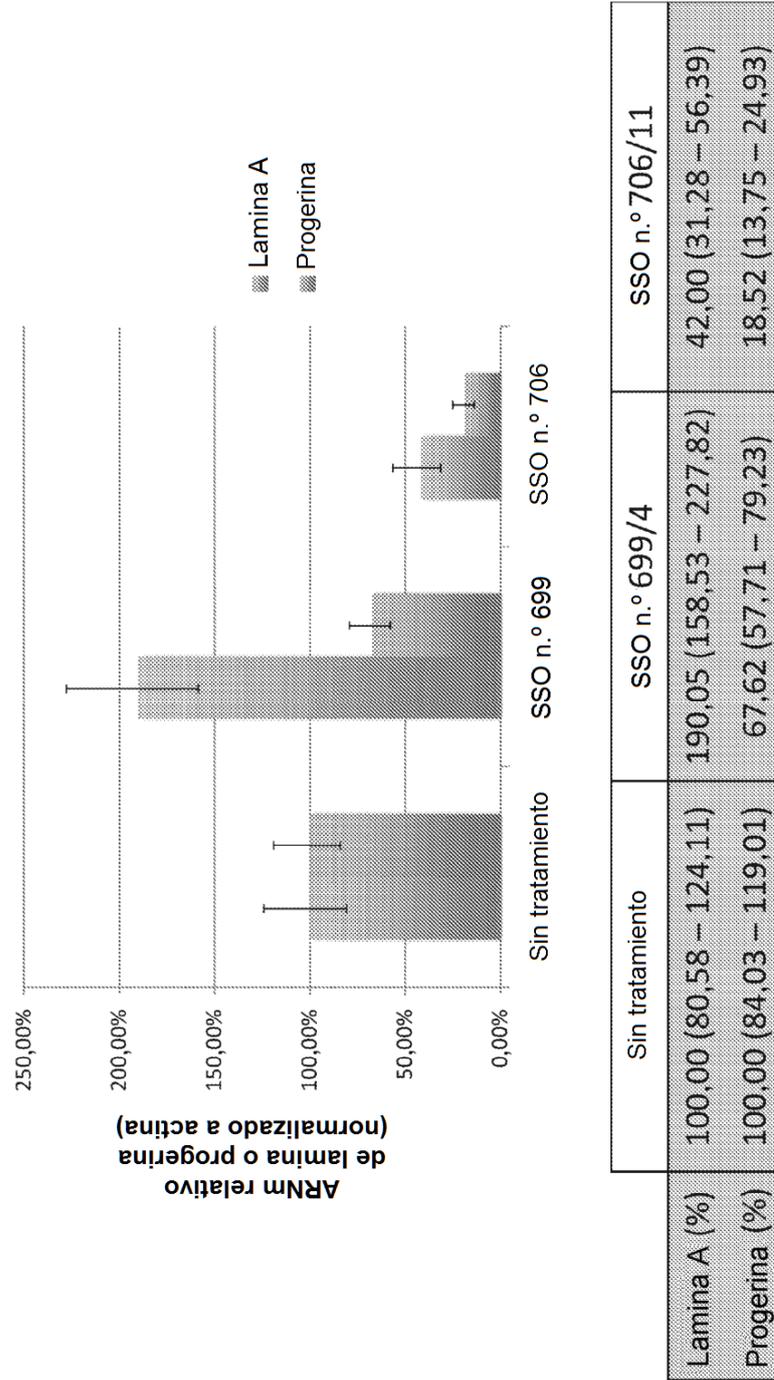
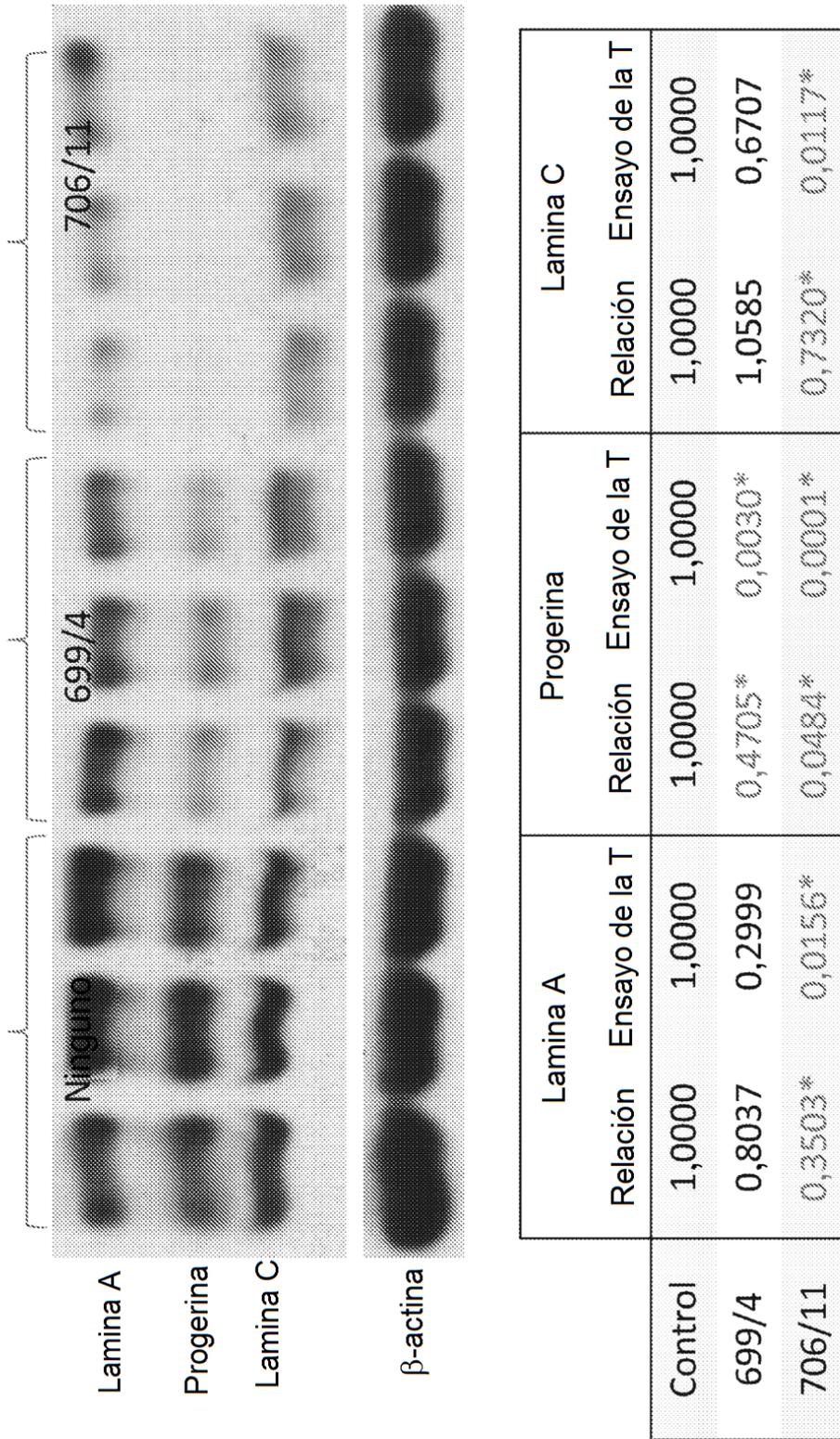


FIG. 4



* Regulación por disminución significativa

FIG. 5