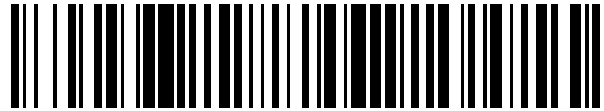


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 198**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2013 PCT/US2013/029684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13142087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 13765016 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2828395**

54 Título: **Conjugados de ácido borónico de análogos de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

**20.03.2012 US 201261613385 P**

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

**27.03.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HANSON, GUNNAR J.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 706 198 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

Conjugados de ácido borónico de análogos de oligonucleótidos

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona en genera; con análogos de oligonucleótidos (oligómeros) útiles como compuestos antisentido, y más particularmente con conjugados de ácido borónico de análogos de oligonucleótidos, y el uso de dichos análogos de oligonucleótidos en aplicaciones antisentido.

10

Descripción de la técnica relacionada.

Los oligómeros antisentido están diseñados en general para unirse al ADN o ARN de proteínas causantes de enfermedades para prevenir la producción de tales proteínas. Los requisitos para la implementación exitosa de terapias antisentido incluyen (a) estabilidad in vivo, (b) suficiente permeabilidad de membrana y captación celular, y (c) un buen equilibrio de afinidad de unión y especificidad de secuencia. Se han desarrollado muchos análogos de oligonucleótidos en los cuales los enlaces fosfodiéster del ADN nativo se reemplazan por otros enlaces que son resistentes a la degradación de las nucleasas (ver, por ejemplo, Barawkar, D.A. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95(19):11047-52 (1998); Linkletter, B.A. et al., Nucleic Acids Res. 29(11):2370-6 (2001); Micklefield, J., Curr. Med. Chem, 8(10):1157-79 (2001)). También se han preparado oligonucleótidos antisentido que tienen otras diversas modificaciones de la estructura principal (Crooke, S.T., Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, New York, Marcel Dekker (2001); Micklefield, J., Curr. Med. Chem, 8(10):1157-79 (2001); Crooke, S.T., Antisense Drug Technology, Boca Raton, CRC Press (2008)). Además, los oligonucleótidos se han modificado mediante la conjugación de péptidos para mejorar la captación celular (Moulton, H.M. et al., Bioconjug Chem 15(2):290-9 (2004); Nelson, M.H. et al., Bioconjug. Chem. 16(4):959-66 (2005); Moulton, H.M. et al., Biochim Biophys Acta (2010)).

El rendimiento de tales análogos de ácidos nucleicos como fármacos antisentido o antigénicos se ha visto obstaculizado por ciertas características de los diversos análogos. Por ejemplo, los análogos con enlaces cargados negativamente, incluidos los análogos ligados a fosforotioato, sufren una considerable repulsión electrostática entre las cargas negativas del oligómero y el objetivo de ADN o ARN. Los fosforotioatos también exhiben unión no específica a otros componentes celulares tales como proteínas. Estos atributos limitan la efectividad terapéutica de los oligómeros antisentido que comprenden ARN nativo, ADN nativo y análogos con carga negativa (Crooke, S.T., Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, New York, Marcel Dekker (2001); Crooke, S.T., Antisense Drug Technology, Boca Raton, CRC Press (2008)). Los análogos de oligonucleótidos ligados a metilfosfonato no iónicos se pueden transportar a las células mediante difusión pasiva y/o endocitosis en fase líquida, pero su uso se ve obstaculizado por la complejidad estereoisomérica y la escasa solubilidad (Crooke, S.T., Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, New York, Marcel Dekker (2001); Micklefield, J., Curr. Med. Chem, 8(10):1157-79 (2001)).

Varios grupos han informado sobre la síntesis de oligonucleótidos cargados positivamente Bailey, C.P. et al., Nucleic Acids Res. 26(21):4860-7 (1998); Micklefield, J., Curr. Med. Chem, 8(10):1157-79 (2001); Egli, M. et al., Biochemistry 44(25):9045-57 (2005)). Por ejemplo, se ha informado de una clase de nucleósidos ligados a guanidinio (denominados DNG), formados por la sustitución de los enlaces fosfato en el ADN y el ARN por grupos guanidino aquirales (Dempsy, R.O. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91(17):7864-8 (1994); Dempsy, R.O. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93(9):4326-30 (1996); Barawkar, D.A. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95(19):11047-52 (1998); Linkletter, B.A. et al., Nucleic Acids Res. 29(11):2370-6 (2001)). También se han informado de los oligómeros vinculados con enlaces de tiourea metilada con carga positiva (Arya, D.P. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96(8): 4384-9 (1999)). Se ha informado que el reemplazo de algunos de estos enlaces con enlaces de urea neutra reduce la tendencia de tales oligómeros cargados positivamente hacia la unión no específica de secuencia (Linkletter, B.A. et al., Bioorg. Med. Chem. 8(8):1893-901 (2000)). Los oligómeros de morfolino que contienen enlaces (1-piperazino) fosfinilidenoxi y (1-(4-( $\omega$ -guanidino-alcanoi)) -piperazino) fosfinilidenfenoxi se han descrito anteriormente (véase, por ejemplo, el documento WO2008036127).

El documento WO 00/56740 describe reactivos de ácido arilborónico útiles para la incorporación en oligonucleótidos y polinucleótidos modificados. Los oligonucleótidos y polinucleótidos modificados así producidos son útiles en reacciones de bioconjugación para la inmovilización y purificación de macromoléculas.

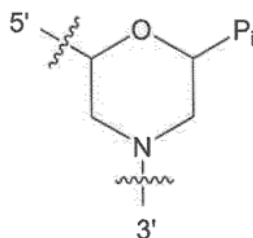
El documento WO 2010/019847 describe aptámeros basados en ADN modificado con ácido borónico que son útiles para explorar el efecto de los cambios en el patrón de glicosilación sobre la capacidad del fibrinógeno para mediar la coagulación de la sangre.

Aunque se ha logrado un progreso significativo, sigue existiendo una necesidad en la técnica de análogos de oligonucleótidos con rendimiento antisentido o antígeno mejorado. Dicho rendimiento antisentido o antígeno mejorado incluye; afinidad más fuerte por el ADN y el ARN sin comprometer la selectividad de secuencia; farmacocinética mejorada y distribución de tejido; Entrega celular mejorada y distribución in vivo confiable y controlable.

Breve resumen

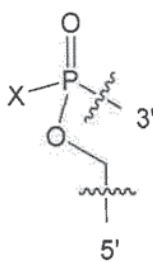
5 En general, la presente invención proporciona análogos de oligonucleótidos que proporcionan mejoras sobre las moléculas antisentido existentes en la técnica. En este sentido, los presentes inventores han encontrado que la conjugación de un ácido borónico o una fracción éster borónica con uno o más de los enlaces intersubunitarios y/o el terminal 5' y/o 3' de un análogo de oligonucleótido, por ejemplo un oligonucleótido morfolino, resulta en un oligómero antisentido que tiene propiedades superiores. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los oligómeros divulgados tienen un suministro celular, una potencia y/o una distribución de tejidos mejorados en comparación con otros análogos de oligonucleótidos y/o se pueden administrar eficazmente a los órganos objetivo. Estas propiedades superiores dan lugar a índices terapéuticos favorables, una reducción de la dosificación clínica y un menor coste de los productos.

15 En una realización, la presente divulgación proporciona un análogo de oligonucleótidos que comprende una estructura principal, un terminal 3' y un terminal 5', la estructura principal comprende una secuencia de estructuras anulares morfolino unidas por enlaces intersubunitarios, los enlaces intersubunitarios unen un extremo 3' de una estructura de anillo morfolino a un extremo 5' de una estructura de anillo morfolino adyacente, en el que cada estructura de anillo morfolino está unida a una fracción de emparejamiento de bases, de modo que el análogo de oligonucleótidos puede unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico objetivo, en el que al menos uno de los enlaces intersubunitarios, el 3' terminal o el 5' terminal comprende una fracción de éster borónico o un ácido borónico unida covalentemente a los mismos, por lo menos una de las estructuras de anillo morfolino tiene la siguiente estructura (i):



(i)

25 en el que  $P_i$  es, en cada aparición, independientemente una fracción de emparejamiento de bases; los enlaces intersubunitarios tienen la siguiente estructura (III):



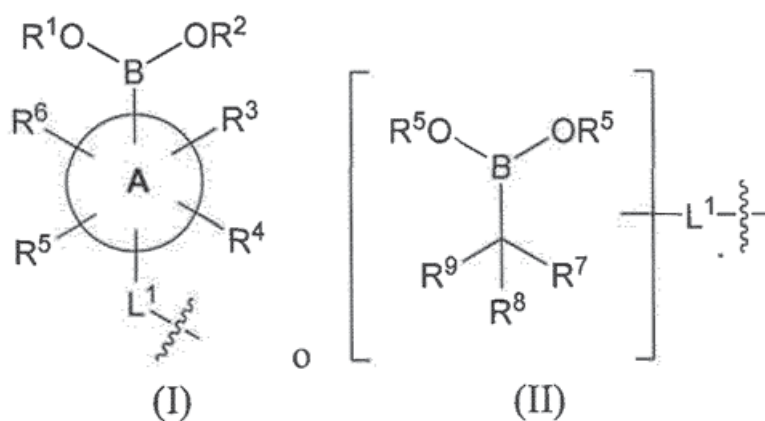
(III)

30 en el que:

X es, en cada aparición, independientemente de la estructura (I), estructura (II) o  $-NR^{10}R^{11}$ ;

35  $R^{10}$  y  $R^{11}$  son, en cada aparición, independientemente hidrógeno o alquilo  $C_1-C_6$ ;

el ácido borónico o la fracción de éster borónico tiene, en cada aparición, independientemente una de las siguientes estructuras (I) o (II):



o una de sus sales, estereoisómeros o tautómeros farmacéuticamente aceptables, en la que:

5 R<sup>1</sup> es, en cada aparición, independientemente H o alquilo;

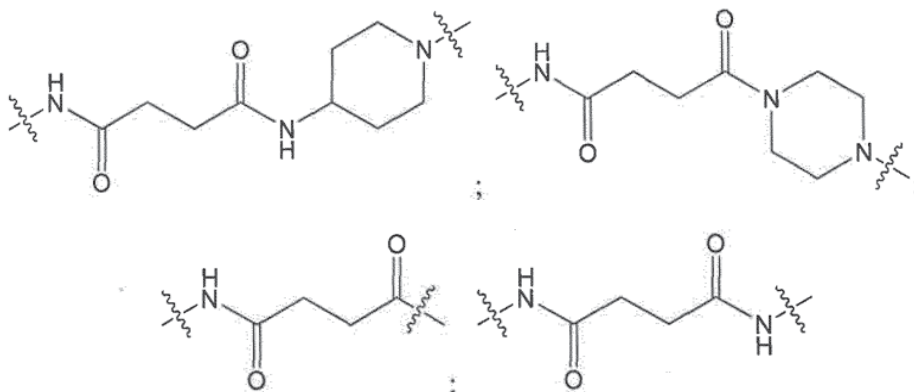
R<sup>2</sup> es H o alquilo, en el que R<sup>2</sup> puede unirse con uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> para formar un anillo;

10 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> están, en cada aparición, independientemente ausentes, H, alquilo, arilo, hidroxilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxi, alcoxialquilo, ariloxi, halo, nitro, ciano, amidilo, amino, alquilamino, aminoalquilo, arilamino, aralquilo, aralquilamino, aralquioxycarbonilaminilo, alquioxycarbonilaminilo, ariloxycarbonilaminilo, -CO<sub>2</sub>H, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquioxycarbonilo, ariloxycarbonilo, alquioxiimino o heteroarilo, en el que uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> puede unirse a otro de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico y en el que uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> puede unirse a A para formar un anillo heterocíclico;

15 R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son, en cada aparición, independientemente alquilo o alquilamino;

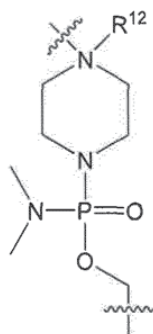
20 A representa, en cada aparición, independientemente un anillo arilo o heteroarilo de 6 miembros; y

L<sup>1</sup> es, en cada aparición, una de las siguientes estructuras:



25

o



en el que R<sub>12</sub> está ausente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

5 En otra realización, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un análogo de oligonucleótidos descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 También se proporcionan métodos para preparar los oligómeros y su uso. En particular, la presente divulgación proporciona el análogo de oligonucleótidos descrito anteriormente para uso en el tratamiento de una enfermedad, en el que la enfermedad es preferiblemente una enfermedad neuromuscular y la enfermedad neuromuscular es preferiblemente distrofia muscular de Duchenne.

15 Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada. Para este fin, se exponen varias referencias en el presente documento que describen con más detalle cierta información de antecedentes, procedimientos, compuestos y/o composiciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra secuencias cortas de conjugados de ejemplo de ácido borónico-nucleótido.

20 La figura 2 muestra secuencias cortas de conjugados de ejemplo de ácido borónico-nucleótido.

Descripción detallada

I. Definiciones

25 En la siguiente descripción, ciertos detalles específicos se exponen para proporcionar una comprensión completa de varias realizaciones. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que la invención puede ponerse en práctica sin estos detalles. En otros casos, las estructuras bien conocidas no se han mostrado o descrito en detalle para evitar oscurecer innecesariamente las descripciones de las realizaciones. A menos que el contexto requiera lo contrario, a lo largo de la especificación y las reivindicaciones que siguen, la palabra "comprende" y sus variaciones, tales como "comprende" y "que comprende" se deben interpretar en un sentido abierto e incluyente, es decir, como "que incluye , pero no limitado a. Además, los encabezados que se proporcionan en este documento son solo por conveniencia y no interpretan el alcance o significado de la invención reivindicada.

35 La referencia en esta especificación a "una realización" o "una realización" significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la realización se incluye en al menos una realización. Por lo tanto, las apariciones de las frases "en una realización" o "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, las características, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones. Además, tal como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. También se debe tener en cuenta que el término "o" se emplea en general en su sentido, incluido "y/o", a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

45 Los términos a continuación, como se usan en este documento, tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

"Amino" se refiere al radical -NH<sub>2</sub>.

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

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

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

"Nitro" se refiere al radical -NO<sub>2</sub>.

"Oxo" se refiere al sustituyente =O.

60 Un "ácido borónico" es un resto que comprende un radical -B(OH)<sub>2</sub>.

Un "éster borónico" es un resto que comprende un radical - (OR<sub>a</sub>)<sub>2</sub>, en donde R<sub>a</sub> es, en cada caso, independientemente H o un radical alquilo como se define a continuación.

65 "Alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado que es saturado o insaturado (es decir, contiene uno o más enlaces dobles y/o triples), que tiene de uno a treinta átomos de carbono. Se incluyen los alquilos

que comprenden cualquier número de átomos de carbono de 1 a 30. Un alquilo que comprende hasta 30 átomos de carbono se denomina alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, así como, por ejemplo, un alquilo que comprende hasta 12 átomos de carbono es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>. Los alquilos (y otras fracciones definidos en el presente documento) que comprenden otros números de átomos de carbono se representan de manera similar. Los grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>. Los grupos alquilo representativos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (iso-propilo), n-butilo, i-butilo, s-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butil), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo, etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo, etenilo, propinilo, but-2-inilo, but-3-inilo, pentinilo, hexinilo y similares. Los alquilos incluyen alquilos (cicloalquil) saturados, insaturados y cíclicos. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

“Alquilenos” o “cadena de alquilenos” se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada que enlaza el resto de la molécula a un grupo radical. Los alquilenos pueden estar saturados o insaturados (es decir, contienen uno o más enlaces dobles y/o triples). Los alquilenos representativos incluyen, pero no se limitan a, alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, alquilenos C<sub>1</sub>. Los grupos alquilenos representativos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno, y similares. La cadena de alquilenos está unida al resto de la molécula a través de un enlace simple o doble y al grupo radical a través de un enlace simple o doble. Los puntos de unión de la cadena de alquilenos al resto de la molécula y al grupo radical pueden ser a través de un carbono o cualquiera de los dos carbonos dentro de la cadena. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, una cadena de alquilenos puede estar opcionalmente sustituida como se describe a continuación.

“Alcoxi” se refiere a un radical de la fórmula -OR<sub>a</sub> donde R<sub>a</sub> es un radical alquilo como se define. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alcoxi puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

Alcoxialquilo se refiere a un radical de la fórmula -R<sub>b</sub>OR<sub>a</sub> donde R<sub>a</sub> es un radical alquilo como se define y donde R<sub>b</sub> es un radical alquilenos como se define. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alcoxialquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

“Alquilcarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula -C(=O)R<sub>a</sub> donde R<sub>a</sub> es un radical alquilo como se definió anteriormente. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

“Alquiloxicarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula -C(=O)OR<sub>a</sub> donde R<sub>a</sub> es un radical alquilo como se define. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

“Alquiloxicarbonilaminilo” se refiere a un radical de la fórmula -NR<sub>a</sub>C(=O)OR<sub>b</sub> donde R<sub>a</sub> es hidrógeno o un radical alquilo como se definió anteriormente y R<sub>b</sub> es un radical alquilo como se define. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

“Alquiloxiimino” se refiere a un radical de la fórmula -C(=NH)O-R<sub>a</sub>, donde R<sub>a</sub> es un radical alquilo como se definió anteriormente. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquiloxiimino puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

“Alquilamino” se refiere a un radical de la fórmula -NHR<sub>a</sub> o -NR<sub>a</sub>R<sub>a</sub> donde cada R<sub>a</sub> es, independientemente, un radical alquilo como se definió anteriormente. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquilamino puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

“Amidilo” se refiere a un radical de la fórmula -N(R<sub>a</sub>)C(=O)R<sub>b</sub> donde R<sub>a</sub> es hidrógeno o un radical alquilo o arilo y R<sub>b</sub> es un radical alquilo o arilo como se define aquí. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo amidilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

“Aminoalquilo” se refiere a un radical de la fórmula -R<sub>b</sub>-NR<sub>a</sub>R<sub>a</sub> donde R<sub>b</sub> es un radical alquilenos como se definió anteriormente, y cada R<sub>a</sub> es independientemente un hidrógeno o un radical alquilo.

“Aminocarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula -C(=O)NH<sub>2</sub>.

“Alquilaminocarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula -C(=O)NR<sub>a</sub>R<sub>a</sub>, donde cada R<sub>a</sub> es independientemente un radical alquilo como se define aquí. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo alquilaminocarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.

- 5 “Ariilo” se refiere a un radical derivado de un sistema de anillo de hidrocarburo que comprende hidrógeno, 6 a 30 átomos de carbono y al menos un anillo aromático. El radical arilo puede ser un sistema anular monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas anulares fusionados o puenteados. Los radicales arilo incluyen, pero no se limitan a, radicales arilo derivados de los sistemas de anillos hidrocarbonados de aceantrileno, acenaftileno, acefenantirileno, antraceno, azuleno, benceno, crisenno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, indeno, naftaleno, fenaleno, fenantreno, pleiadenno, pireno y trifenileno. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, el término “arilo” o el prefijo “ar-” (como en “aralquilo”) pretende incluir radicales arilo que están opcionalmente sustituidos.
- 10 “Aralquilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-R_b-R_c$  donde  $R_b$  es una cadena de alquileo como se definió anteriormente y  $R_c$  es uno o más radicales arilo como se definió anteriormente, por ejemplo, bencilo, difenilmetilo, tritilo y similares. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo aralquilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 15 “Arilamino” se refiere a un radical de la fórmula  $-NHR_a$  o  $-NR_aR_a$  donde  $R_a$  es, independientemente, un radical arilo como se definió anteriormente. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo arilamino puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 20 “Arlaminocarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-C(=O)NR_aR_b$ , donde  $R_a$  es un radical arilo como se define aquí y  $R_b$  es hidrógeno o cualquier radical alquilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo arilaminocarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 25 “Aralquilamino” se refiere a un radical de la fórmula  $-NR_bR_a$  donde cada  $R_a$  es un radical arilo y  $R_b$  es una cadena de alquileo como se definió anteriormente. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo arilamino puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 30 “Aralquilaminocarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-C(=O)NR_bR_a$  donde  $R_a$  es un radical arilo y  $R_b$  es una cadena de alquileo como se definió anteriormente. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo arilamino puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 35 “Arlilcarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-C(=O)R_c$ , donde  $R_c$  es uno o más radicales arilo como se definió anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo arilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 40 “Arliloxicarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-C(=O)OR_c$ , donde  $R_c$  es uno o más radicales arilo como se definió anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo ariloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 45 “Aralquilcarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-C(=O)R_b-R_c$  donde  $R_b$  es una cadena de alquileo como se definió anteriormente y  $R_c$  es uno o más radicales arilo como se definió anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo aralquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 50 “Aralquiloxicarbonilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-C(=O)OR_b-R_c$ , donde  $R_b$  es una cadena de alquileo como se definió anteriormente y  $R_c$  es uno o más radicales arilo como se definió anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo aralquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 55 “Aralquiloxicarbonilaminilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-NR_aC(=O)OR_b-R_c$  donde  $R_a$  es hidrógeno o un radical alquilo,  $R_b$  es una cadena de alquileo como se definió anteriormente y  $R_c$  es uno o más radicales arilo como se definió anteriormente, por ejemplo fenilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo aralquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 60 “Arliloxi” se refiere a un radical de la fórmula  $-OR_c$  donde  $R_c$  es uno o más radicales arilo como se definió anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, un grupo arilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 65 “Cicloalquilo” se refiere a un anillo carbocíclico estable, no aromático, monocíclico o policíclico, que puede incluir sistemas de anillos fusionados o puenteados, que están saturados o insaturados, y se unen al resto de la molécula mediante un enlace simple. Los cicloalquilos representativos incluyen, pero no se limitan a, 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 lo contrario específicamente en la especificación, un grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido.

“Carbocíclico” incluye cicloalquilos y arilos como se definió anteriormente.

“Fusionado” se refiere a cualquier estructura de anillo descrita en el presente documento que se fusiona a una estructura de anillo existente. Cuando el anillo fusionado es un anillo heterociclilo o un anillo heteroarilo, cualquier átomo de carbono en la estructura del anillo existente que se convierte en parte del anillo de heterociclilo fusionado o el anillo heteroarilo fusionado puede reemplazarse con un átomo de nitrógeno.

“Heterociclilo”, “heterociclo” o “anillo heterocíclico” se refiere a un radical de anillo no aromático estable de 3 a 24 miembros que comprende de 2 a 23 átomos de carbono y de 1 a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. A menos que se indique lo contrario específicamente en la especificación, el radical heterociclilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillo fusionados o puenteados; 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 dichos radicales heterociclilo incluyen, pero no se limitan a, dioxolanilo, tienilo [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, tetrahidrofurilo, tritianoilo, 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 lo contrario específicamente en la especificación, un grupo heterociclilo puede estar opcionalmente sustituido.

“Heteroarilo” es un tipo de heterociclo y se refiere a un radical del sistema de anillo de 5 a 14 miembros que comprende átomos de hidrógeno, uno a trece átomos de carbono, 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 esta invención, el radical heteroarilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillo fusionado o con puente; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heteroarilo pueden estar oxidados opcionalmente; El átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, acridinilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo [b] [1,4] dioxepinilo, 1,4-benzodioxanilo, benzonafthofuranilo, 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-1H-pirrolilo, fenazinilo, fenotin azinilo, 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 lo contrario específicamente en la especificación, un grupo heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido.

“Hidroalquilo” se refiere a un radical de la fórmula  $-R_b-OH$  donde  $R_b$  es un radical alquileo como se definió anteriormente. Los hidroalquilos incluyen alquil alcoholes primarios, secundarios y terciarios.

Todos los grupos anteriores pueden estar sustituidos o no sustituidos. El término “sustituido” como se usa en el presente documento significa cualquiera de los grupos anteriores (es decir, alquilo, alquileo, alcoxi, alcoxialquilo, alquilcarbonilo, alquiloxicarbonilo, alkyloxy-carbonylaminy, alquiloxiimino, alquilamino, amidilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilo, aralquilo, arilamino, arilaminocarbonilo, aralquilamino, aralquilaminocarbonilo, arilcarbonilo, ariloxicarbonilo, aralquilcarbonilo, aralquiloxicarbonilo, aralkyloxy-carbonylaminy, ariloxi, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo y/o hidroalquilo), puede funcionalizarse adicionalmente en donde al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un sustituyente que no es un átomo de hidrógeno. A menos que se indique específicamente en la especificación, un grupo sustituido puede incluir uno o más sustituyentes seleccionados entre: oxo (= O),  $-CO_2H$ , nitrilo, nitro,  $-CONH_2$ , hidroxilo, halo, tiooxi (= S), alquilo, alquileo, alcoxi, alcoxialquilo, 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 triarilsililo, grupos dialquilarilsililo, grupos alquildiarilsililo, grupos triarilsililo, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi, por ejemplo, trifluorometilo o trifluorometoxi. “Sustituido” también significa cualquiera de los grupos anteriores en los que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados por un enlace de orden superior (por ejemplo, un enlace doble o triple) a un heteroátomo como el oxígeno en oxo, carbonilo, carboxilo y grupos éster; y nitrógeno en grupos tales como iminas, oximas, hidrazonas y nitrilos. Por ejemplo, “sustituido” incluye cualquiera de los grupos anteriores en los que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados 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 significa cualquiera de los grupos anteriores en el que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados con  $-C(=O)R_g$ ,  $-C(=O)OR_g$ ,  $-CH_2SO_2R_g$ ,



$-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NR}_g\text{R}_h$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{SR}_g$  o  $-\text{SSR}_g$ . En lo que antecede,  $R_g$  y  $R_h$  son iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, tioalquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, haloalquilo, heterociclilo, N-heterociclilo, heterocicilalquilo, heteroarilo, o N-heteroarilo y/o heteroarilalquilo. Además, cada uno de los sustituyentes anteriores también puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los sustituyentes anteriores.

5 Además, cualquiera de los grupos anteriores puede estar sustituido para incluir uno o más átomos internos de oxígeno o azufre. 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.

10 Los términos "oligómero antisentido" o "compuesto antisentido" se usan de manera intercambiable y se refieren a una secuencia de subunidades, cada una de las cuales tiene una base portada en una subunidad de la estructura principal compuesta de ribosa u otro grupo de azúcar pentosa o morfolino, y donde los grupos de la estructura principal están unidos por enlaces intersubunitarios que permiten que las bases en el compuesto se hibriden con una secuencia objetivo en un ácido nucleico (típicamente un ARN) mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico: oligómero dentro de la secuencia objetivo. El oligómero puede tener una complementariedad de secuencia exacta con la secuencia objetivo o casi una complementariedad. Dichos oligómeros antisentido están diseñados para bloquear o inhibir la traducción del ARNm que contiene la secuencia objetivo, y se puede decir que están "dirigidos a" una secuencia con la que se hibrida.

20 Un "oligómero morfolino" o "PMO" se refiere a una molécula polimérica que tiene una estructura principal que soporta bases capaces de formar enlaces de hidrógeno a polinucleótidos típicos, en donde el polímero carece de una fracción de la estructura principal de azúcar pentosa, y más específicamente una estructura principal de ribosa ligada por enlaces fosfodiéster que es típico de los nucleótidos y nucleósidos, pero en su lugar contiene un anillo de nitrógeno con acoplamiento a través del anillo de nitrógeno. Un oligómero "morfolino" de ejemplo comprende estructuras de subunidad de morfolino ligadas entre sí por enlaces de (tio) fosforamidato o (tio) fosforodiamidato, que une el nitrógeno morfolino de una subunidad al carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente, cada subunidad comprende una fracción de emparejamiento base de purina o pirimidina eficaz para unirse, mediante enlaces de hidrógeno específicos de base, a una base en un polinucleótido. Los oligómeros de morfolino (incluidos los oligómeros antisentido) se detallan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 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, solicitud de patente de EE.UU. pub. Nos. 2009/0131632; 2009/0131624; y 2012/0065169; y la publicación PCT número WO/2009/064471. Los PMO representativos incluyen los PMO en los que los enlaces intersubunitarios comprenden una fracción dimetilamino.

35 Un grupo "fosforamidato" comprende fósforo que tiene tres átomos de oxígeno unidos y un átomo de nitrógeno unido, mientras que un grupo "fosforamiamato" (ver, por ejemplo, las figuras 1D-E) comprende fósforo que tiene dos átomos de oxígeno unidos y dos átomos de nitrógeno unidos. En los enlaces intersubunitarios no cargados o modificados de los oligómeros descritos en el presente documento y en tramitación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 61/349,783 y Ser. No. 11/801,885, un nitrógeno está siempre pendiente de la cadena principal. El segundo nitrógeno, en un enlace de fosforodiamidato, es típicamente el nitrógeno del anillo en una estructura de anillo morfolino.

40 "Enlace intersubunitario" se refiere al enlace que conecta dos subunidad de morfolino, por ejemplo, la estructura (I).

45 Un oligonucleótido u oligómero antisentido "hibrida específicamente" a un polinucleótido objetivo si el oligómero hibrida a el objetivo en condiciones fisiológicas, con una  $T_m$  superior a 37 °C, superior a 45 °C, preferiblemente al menos 50 °C, y típicamente 60 °C-80 °C o superior. La " $T_m$ " de un oligómero es la temperatura a la que el 50% hibrida con un polinucleótido complementario. La  $T_m$  se determina bajo condiciones estándar en solución salina fisiológica, como se describe, por ejemplo, en Miyada et al., *Methods Enzymol.* 154:94-107 (1987). Dicha hibridación puede ocurrir con un complemento "cercano" o "sustancial" del oligómero antisentido a la secuencia objetivo, así como con una complementariedad exacta.

50 Los polinucleótidos se describen como "complementarios" cuando se produce una hibridación en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos de cadena sencilla. La complementariedad (el grado en que un polinucleótido es complementario con otro) es cuantificable en términos de la proporción de bases en cadenas opuestas que se espera que formen enlaces de hidrógeno entre sí, de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases generalmente aceptadas.

55 Una primera secuencia es una "secuencia antisentido" con respecto a una segunda secuencia si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia se une específicamente o hibrida específicamente con la segunda secuencia de polinucleótidos en condiciones fisiológicas.

60 El término "secuencia de direccionamiento" es la secuencia en el análogo de oligonucleótidos que es complementaria (lo que significa, además, sustancialmente complementaria) a la secuencia objetivo en el genoma de ARN. La secuencia completa, o solo una parte, del compuesto análogo puede ser complementaria a la secuencia objetivo. Por ejemplo, en un análogo que tiene 20 bases, solo 12-14 pueden ser secuencias de direccionamiento. Típicamente, la secuencia de direccionamiento está formada por bases contiguas en el análogo, pero alternativamente puede estar

formada por secuencias no contiguas que cuando se colocan juntas, por ejemplo, desde los extremos opuestos del análogo, constituyen una secuencia que abarca la secuencia objetivo.

Las secuencias de direccionamiento y objetivo se describen como "complementarias" entre sí cuando se produce la hibridación en una configuración antiparalela. Una secuencia de direccionamiento puede tener una complementariedad "cercana" o "sustancial" a la secuencia objetivo y aún funcionar con el propósito de los métodos descritos actualmente, es decir, aún ser "complementario". Preferiblemente, los compuestos análogos de oligonucleótidos empleados en los métodos actualmente descritos tienen como máximo una falta de emparejamiento con la secuencia objetivo de 10 nucleótidos, y preferiblemente como máximo una falta de emparejamiento de 20. Alternativamente, los oligómeros antisentido empleados tienen al menos un 90% de homología de secuencia, y preferiblemente al menos un 95% de homología de secuencia, con las secuencias de direccionamiento de ejemplo como se designa en este documento. Para los fines de unión complementaria a una objetivo de ARN, y como se explica más adelante, una base de guanina puede ser complementaria a una base de ARN de citosina o uracilo.

Un "heterodúplex" se refiere a un dúplex entre un análogo de oligonucleótidos y la porción complementaria de un ARN objetivo. Un "heterodúplex resistente a las nucleasas" se refiere a un heterodúplex formado por la unión de un oligómero antisentido a su objetivo complementario, de modo que el heterodúplex es sustancialmente resistente a la degradación in vivo por nucleasas intracelulares y extracelulares, como la RNAsa H, que son capaces de cortar complejos de doble cadena de ARN/ARN o ARN/ADN.

Un agente es "captado activamente por células de mamíferos" cuando el agente puede entrar en la célula por un mecanismo distinto a la difusión pasiva a través de la membrana celular. El agente puede ser transportado, por ejemplo, por "transporte activo", refiriéndose al transporte de agentes a través de una membrana celular de mamífero, por ejemplo, un mecanismo de transporte dependiente de ATP, o por "transporte facilitado", que se refiere al transporte de agentes antisentido a través de la membrana celular por un mecanismo de transporte que requiere la unión del agente a una proteína de transporte, que luego facilita el paso del agente unido a través de la membrana .

Los términos "expresión moduladora" y/o "actividad antisentido" se refieren a la capacidad de un oligómero antisentido para mejorar o, más típicamente, reducir la expresión de una proteína dada, al interferir con la expresión o traducción del ARN. En el caso de la expresión reducida de proteínas, el oligómero antisentido puede bloquear directamente la expresión de un gen dado, o contribuir a la degradación acelerada del ARN transcrito de ese gen. Se cree que los oligómeros de morfolino como se describen aquí actúan a través del mecanismo anterior (bloqueo estérico). Los objetivos antisentido preferidos para los oligómeros de bloqueo estérico incluyen la región del codón de inicio ATG, los sitios de empalme, las regiones muy adyacentes a los sitios de empalme y la región 5' no traducida de ARNm, aunque otras regiones se han dirigido exitosamente utilizando oligómeros de morfolino.

Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de oligómero antisentido administrada a un sujeto mamífero, ya sea como una dosis única o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado, típicamente por inhibición de la traducción de una secuencia de ácido nucleico objetivo seleccionada.

El "tratamiento" de un individuo (por ejemplo, un mamífero, como un ser humano) o una célula es cualquier tipo de intervención utilizada en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula. El tratamiento incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica, y puede realizarse de manera profiláctica o posterior al inicio de un evento patológico o al contacto con un agente etiológico.

## II. Oligómeros antisentido

### A. Oligómeros que comprenden ácido borónico o fracciones de éster borónico

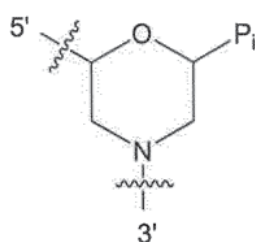
Como se indicó anteriormente, una realización de la presente divulgación está dirigida a análogos de oligonucleótidos (denominados en este documento "oligómeros") que comprenden fracciones de ácido borónico o éster borónico. Se sabe que los ácidos borónicos tienen una afinidad especial por los carbohidratos: se unen de forma covalente y bidentada a la unidad de 1,2-diol o 1,3-diol presente en los azúcares. Los ácidos borónicos pueden considerarse lectinas sintéticas. La superficie de una célula eucariota o procariota contiene muchas estructuras de carbohidratos disponibles para la reacción con ácidos borónicos. Los compuestos de la presente invención son oligómeros de fosfordiamidato antisentido (PMO) que contienen ácidos borónicos (o ésteres borónicos que se espera que se escindan a los ácidos borónicos in vivo) que están destinados a unirse covalentemente a los carbohidratos de la superficie celular, grupos de cabeza de fosfato y polisacáridos sulfatados; Una vez unidos, los compuestos de la invención experimentan captación e internalización en el interior de la célula, seguidos de la translocación al citoplasma y el núcleo donde tiene lugar la acción biológica. Se espera que la presencia de una porción de ácido (s) borónico resuelva un problema técnico muy importante y de larga data: el suministro celular. Los compuestos de la presente invención son capaces de: 1) penetrar eficazmente las membranas celulares y translocarse al citoplasma y al núcleo; y 2) obtener largos tiempos de residencia en el plasma, evitando así la excreción y acumulación en el riñón. Las características y propiedades estructurales de los diversos tipos de enlace y oligómeros se describen con más detalle en la siguiente discusión.

Las figuras 1 y 2 proporcionan ejemplos de oligómeros de la invención. Para propósitos de simplicidad, los oligómeros representados son más cortos que los típicos. Típicamente, los oligómeros comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 subunidades (es decir, bases). En algunas realizaciones, los oligómeros comprenden de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 subunidades. Además, los ejemplos proporcionados en las Figs. 1 y 2 representan conjugados de ácido borónico tanto en el extremo terminal como en los enlaces intersubunitarios. En la práctica real de la invención, la fracción de ácido borónico (o éster) puede estar en el extremo 5' terminal, extremo 3' terminal o el enlace intersubunidad, o cualquier combinación de los mismos. El número real de conjugados de ácido borónico o éster borónico en un oligómero no es crítico, siempre que el oligómero comprenda al menos uno de estos conjugados. Las características y propiedades estructurales de los diversos tipos de enlace y oligómeros se describen con más detalle en la siguiente discusión.

En ciertas realizaciones, la presente invención se dirige a un análogo de oligonucleótidos ("oligómero") que comprende una estructura principal, un terminal 3' y un terminal 5', la estructura principal que comprende una secuencia de estructuras anulares morfolino unidas por enlaces intersubunitarios, la intersubunidad enlaces que unen un extremo 3' de una estructura de anillo morfolino a un extremo 5' de una estructura de anillo morfolino adyacente, en el que cada estructura de anillo morfolino está unida a una fracción de emparejamiento de bases, de manera que el análogo de oligonucleótidos puede unirse en una secuencia forma específica para un ácido nucleico objetivo, en donde al menos uno de los enlaces intersubunitarios, el 3' terminal o el 5' terminal comprende un ácido borónico o una fracción éster borónico unido covalentemente al mismo.

En algunos ejemplos, el oligómero comprende al menos un enlace que comprende una fracción de éster borónico o un ácido borónico unido covalentemente al mismo (un "enlace que contiene boro"). En algunas otras realizaciones, el oligómero incluye al menos dos enlaces que contienen nacidos consecutivos. En realizaciones adicionales, al menos el 5% de los enlaces en el oligómero nacen conteniendo enlaces; por ejemplo, en algunas realizaciones, 5% -95%, 10% a 90%, 10% a 50%, o 10% a 35% de los enlaces pueden ser enlaces que contienen boro.

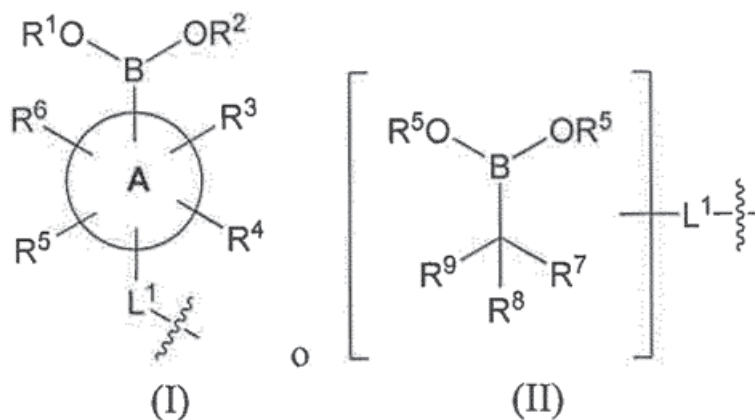
En los análogos de oligonucleótidos de la invención, por lo menos una de las estructuras de anillo morfolinilo tiene la siguiente estructura (i):



(i)

en la que  $P_i$  es, en cada aparición, independientemente una fracción de emparejamiento de bases.

En los análogos de oligonucleótidos de la invención, la fracción de éster borónico o ácido borónico tiene, en cada aparición, independientemente una de las siguientes estructuras (I) o (II):



(I)

(II)

o una de sus sales, estereoisómeros o tautómeros farmacéuticamente aceptables, en los que:

R<sup>1</sup> es, en cada aparición, independientemente H o alquilo;

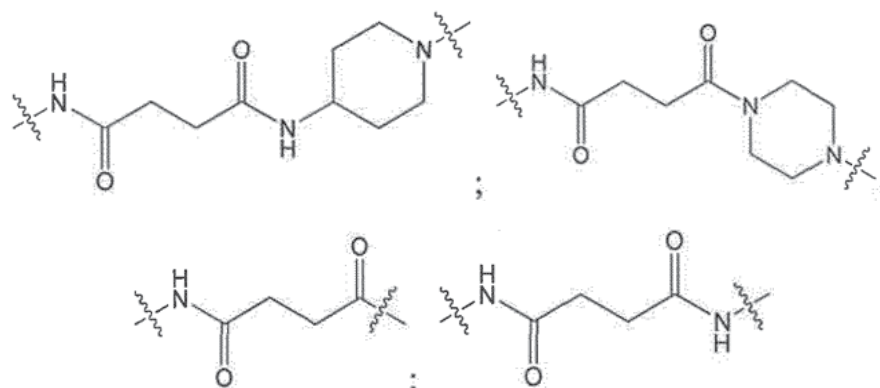
R<sup>2</sup> es H o alquilo, en el que R<sup>2</sup> puede unirse con uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> para formar un anillo;

5 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> están, en cada aparición, independientemente ausentes, H, alquilo, hidroxil, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxi, ariloxi, halo, nitro, ciano amidilo, amino, alquilamino, arilamino, aralquilamino, aralquiloxicarbonilaminilo, alquiloxicarbonilaminilo, ariloxicarbonilaminilo, -CO<sub>2</sub>H, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo, alquiloxiimino o heteroarilo, en el  
10 que uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> puede unirse a otro de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> para formar un anillo heterocíclico o carbocíclico, y en el que uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> puede unirse a R<sup>2</sup> para formar un anillo heterocíclico;

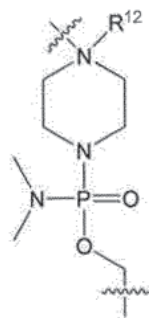
R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son, en cada aparición, independientemente alquilo o alquilamino;

A representa, en cada aparición, independientemente un anillo arilo o heteroarilo de 6 miembros; y

15 L<sup>1</sup> es, en cada aparición,

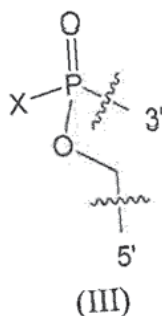


o



en el que R<sup>12</sup> es ausente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

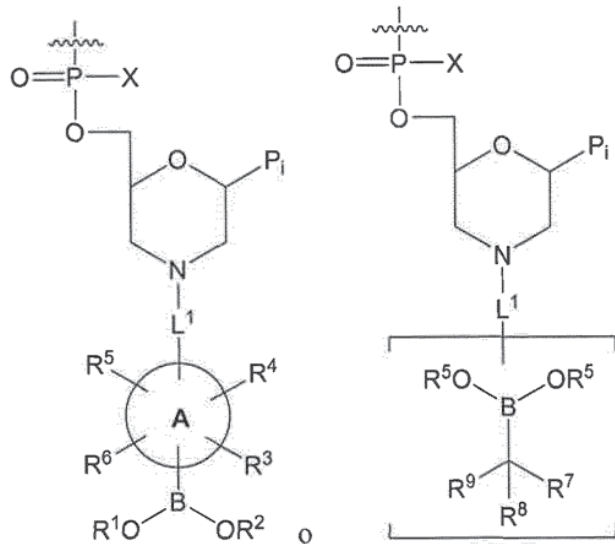
En los análogos de oligonucleótidos de la invención, los enlaces intersubunitarios tienen la siguiente estructura (III):



En ciertas realizaciones, al menos un X es estructura (I) o (II). Cuando X es la estructura (I) o (II), L<sup>1</sup> sirve como enlace para unir covalentemente el átomo de P en la estructura (III) al resto de las estructuras (I) o (II). En ciertas otras realizaciones, al menos un X es -N (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones más específicas, X es la estructura (I) o (II) o -N

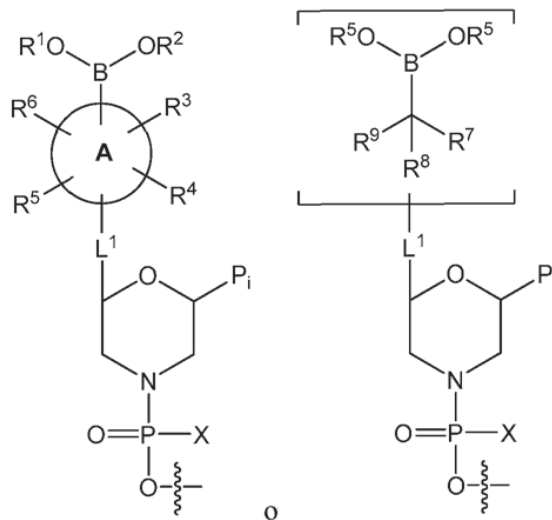
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, es decir, cada X que no es la estructura (I) o (II) es -N (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. En aún otras realizaciones, el análogo de oligonucleótidos comprende de 1 a 5 enlaces intersubunitarios que comprenden la estructura (I) o (II), por ejemplo en algunas realizaciones X en 1 a 5 de los enlaces intersubunitarios es la estructura (I) o (II).

- 5 En ciertas realizaciones, el extremo 3' está covalentemente unido a la estructura (I) o estructura (II) (a través del enlazante L<sup>1</sup>) y tiene una de las siguientes estructuras (IV) o (V):



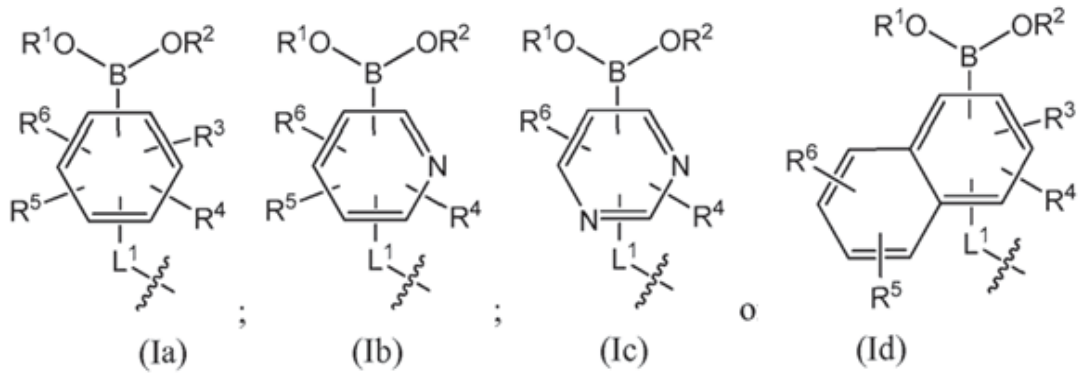
- 10 en el que P<sub>i</sub> es una fracción de emparejamiento de bases.

En otras realizaciones, el terminal 5' está covalentemente unido a la estructura (I) o (II) (a través del enlazante L<sup>1</sup>) y tiene una de las siguientes estructuras (VI) o (VII):



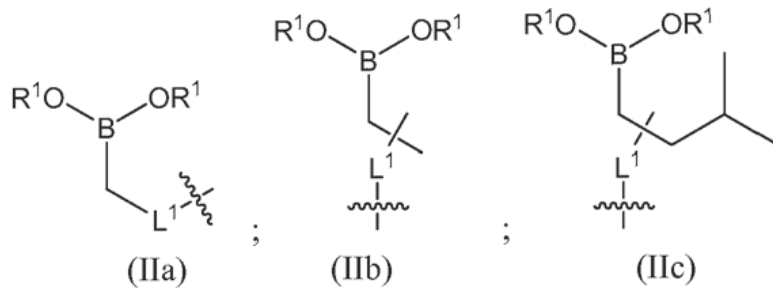
- 15 en el que P<sub>i</sub> es una fracción de emparejamiento de bases.

- 20 En otras realizaciones más, la estructura (I) tiene una de las siguientes estructuras (Ia), (Ib), (Ic) o (Id):

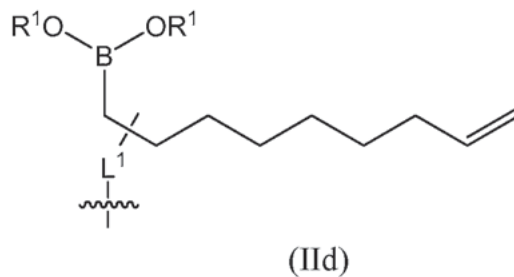


Otras realizaciones incluyen ejemplos en los que la estructura (II) tiene una de las siguientes estructuras (IIa), (IIb), (IIc) o (IId):

5

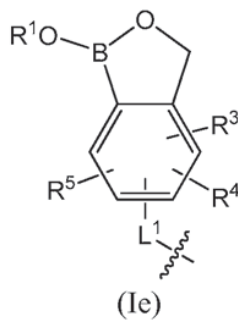


o



10

En cualquiera de las realizaciones anteriores de la estructura (I), donde R<sup>2</sup> se une con uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> para formar un anillo heterocíclico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la estructura (I) tiene la siguiente estructura (Ie):



15

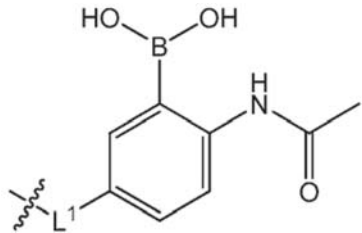
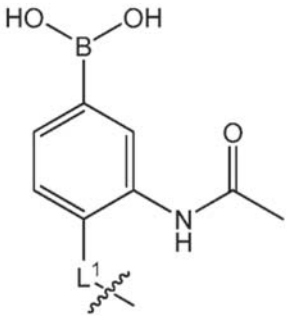
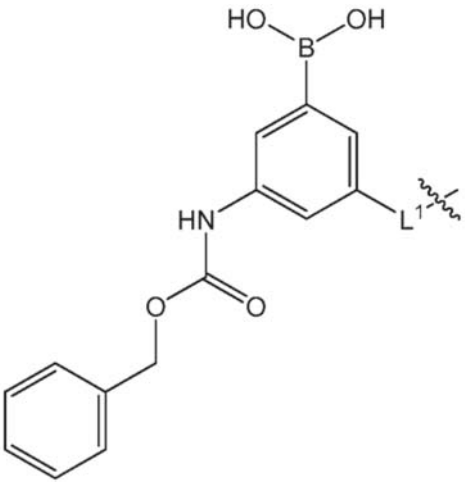
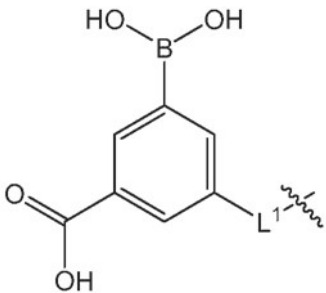
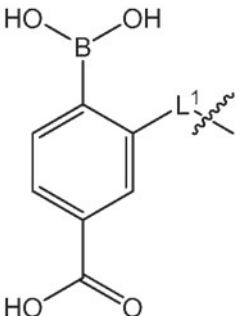
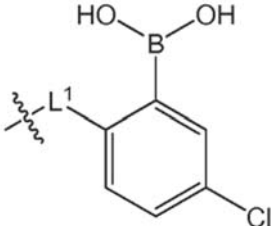
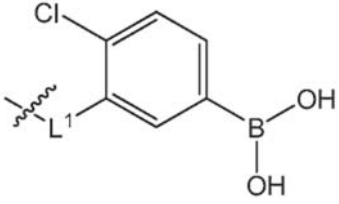
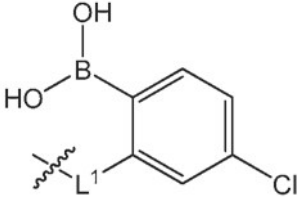
En ciertas realizaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores de las estructuras (I) o (II), al menos un R<sup>1</sup> es H o R<sup>2</sup> es H. Por ejemplo, en algunas realizaciones cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es H.

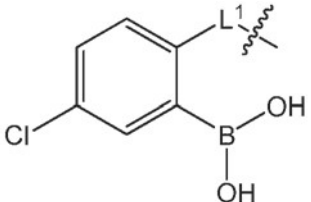
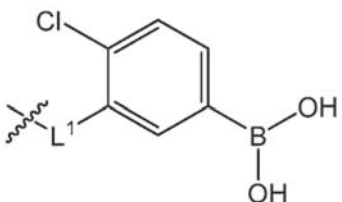
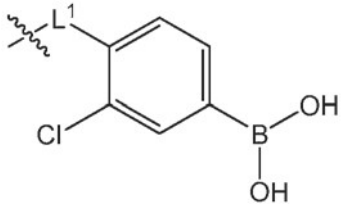
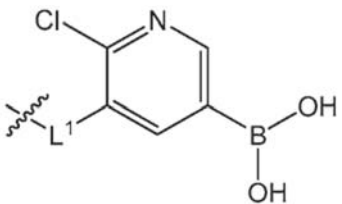
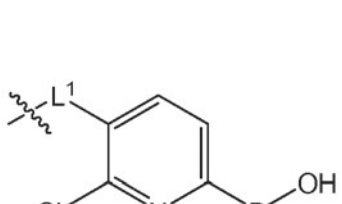
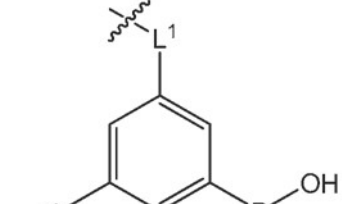
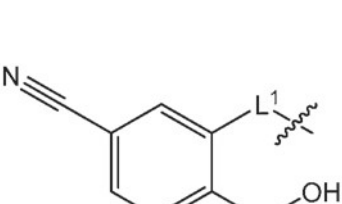
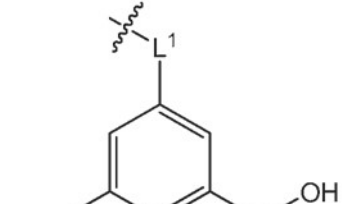
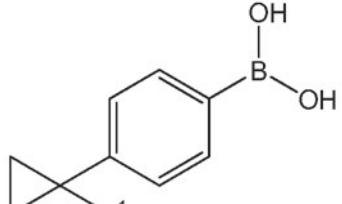
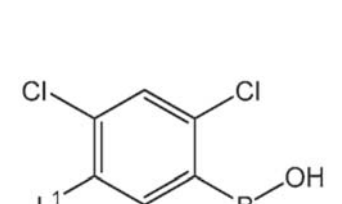
20 En aún otras realizaciones de lo anterior, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> están cada uno independientemente ausentes, H, hidroxilo, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxi, ariloxi, halo, nitro, ciano amidilo, amino, alquilamino, ariloxycarbonilaminilo, -CO<sub>2</sub>H, alquiloxy-carbonilo, alquiloxy-imino o heteroarilo.

En realizaciones más específicas de lo anterior, la estructura (I) tiene una estructura seleccionada de cualquiera de las que se muestran en la Tabla 1 a continuación.

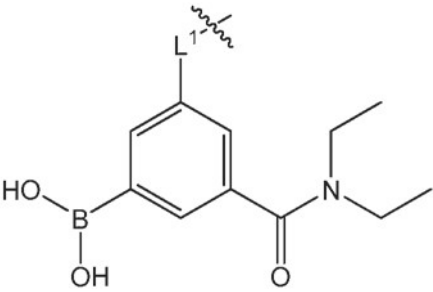
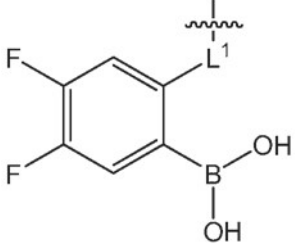
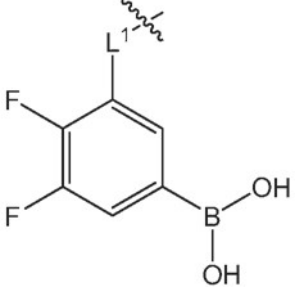
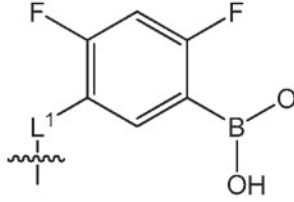
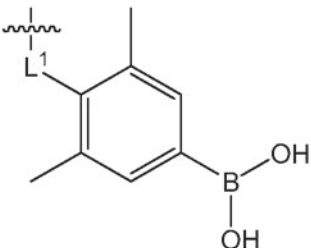
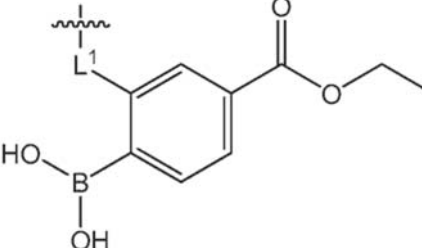
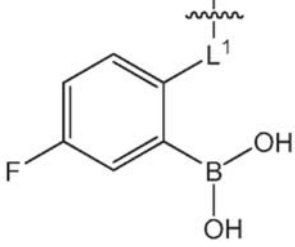
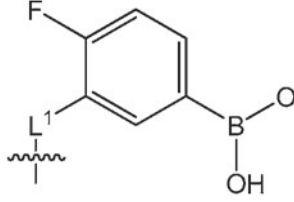
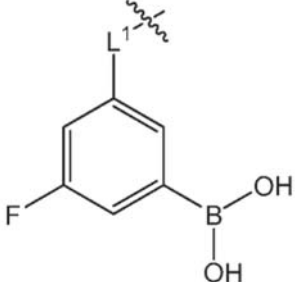
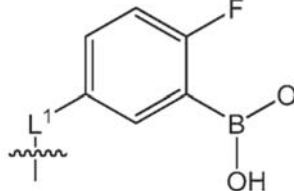
5

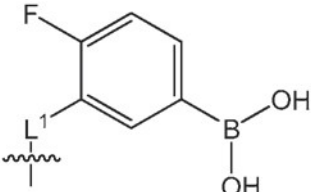
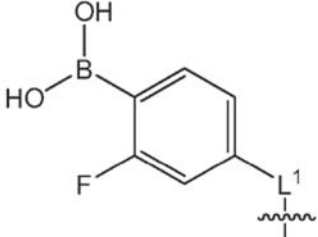
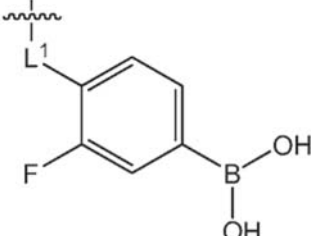
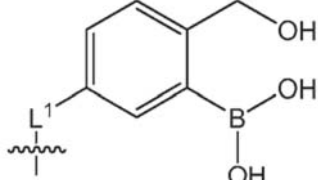
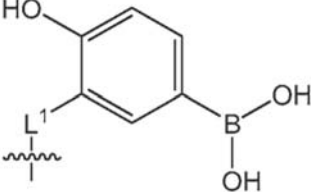
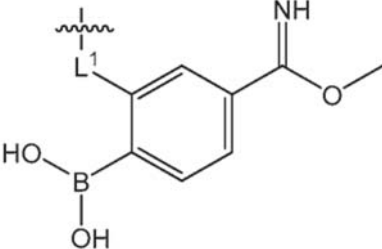
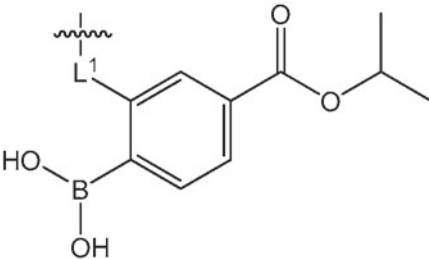
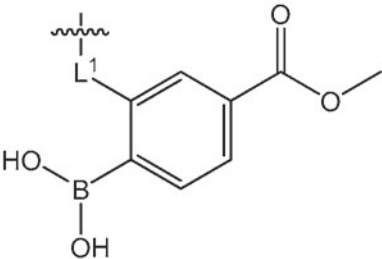
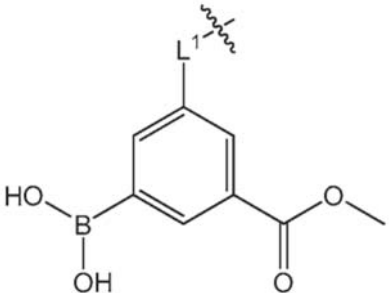
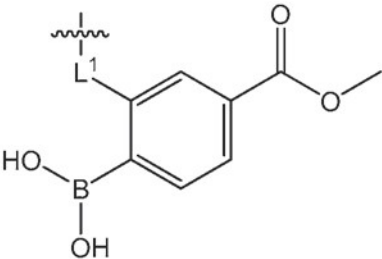
Tabla 1. Fracciones representativas que contienen boro

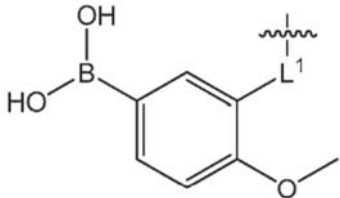
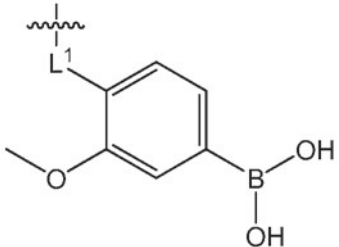
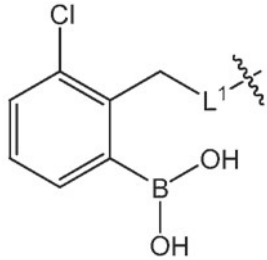
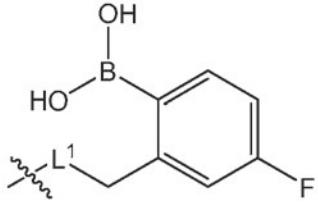
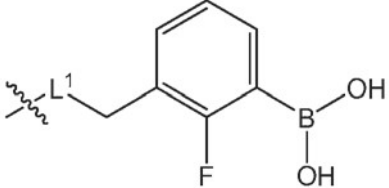
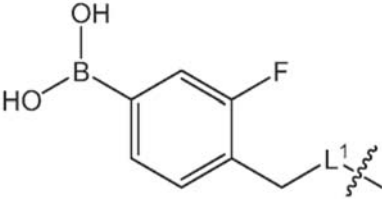
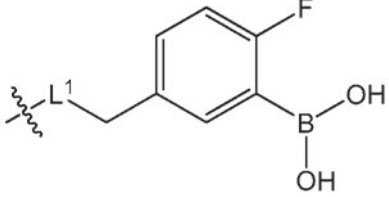
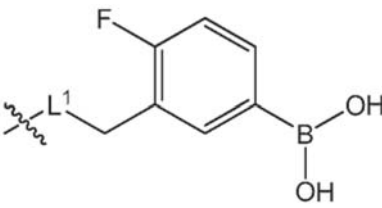
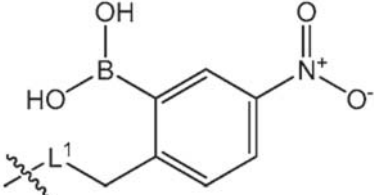
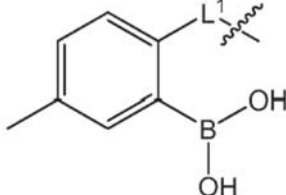
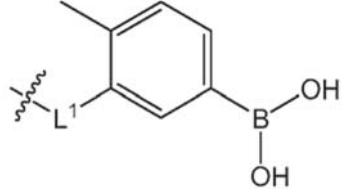
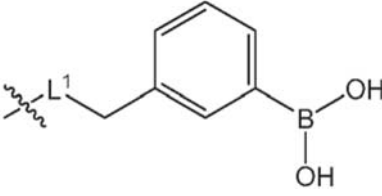
No.	Estructura	No.	Estructura
1		2	
3		4	
5		6	
7		8	

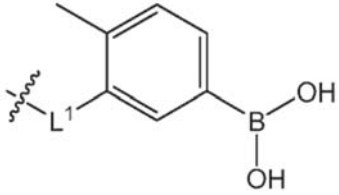
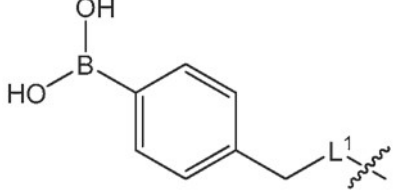
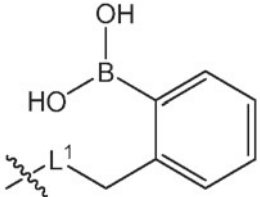
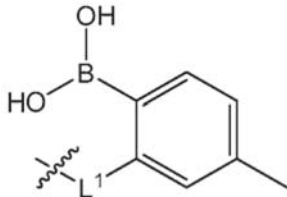
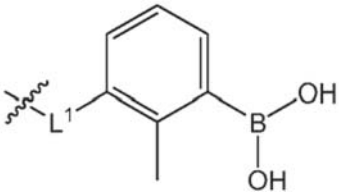
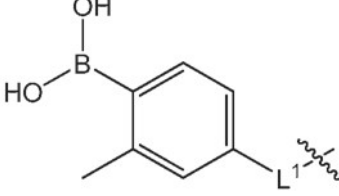
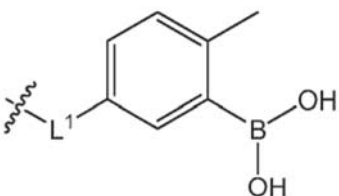
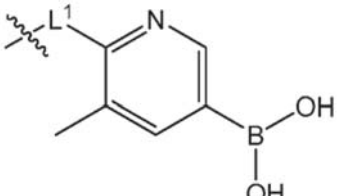
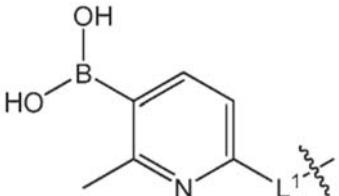
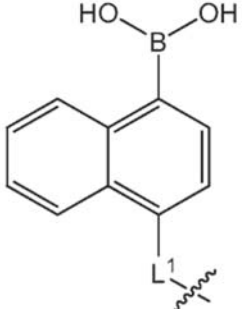
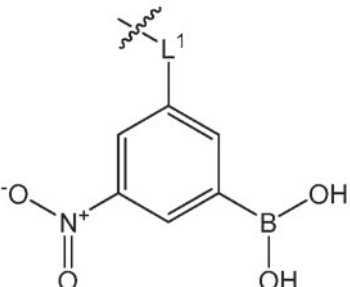
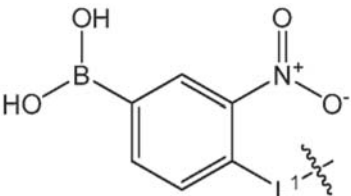
No.	Estructura	No.	Estructura
9		10	
11		12	
13		14	
15		16	
17		18	

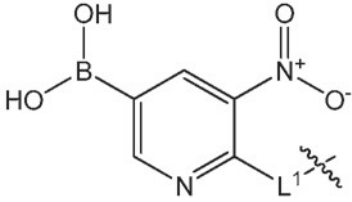
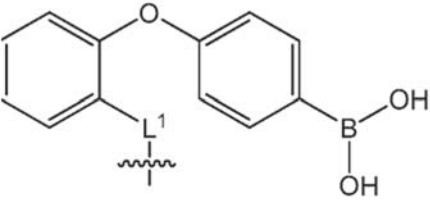
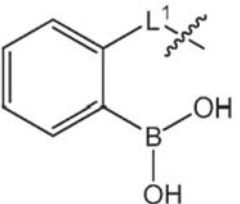
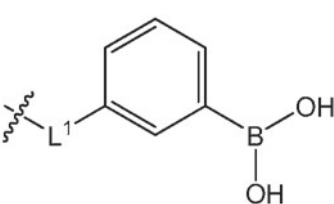
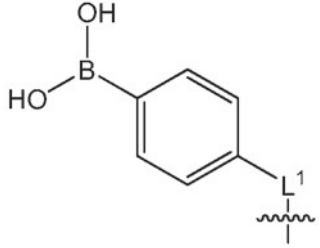
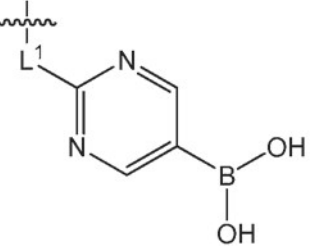
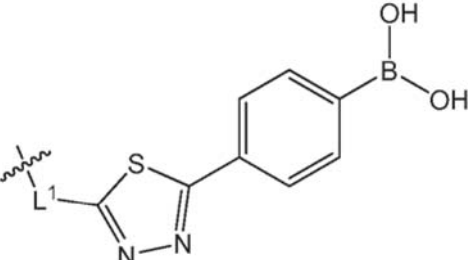
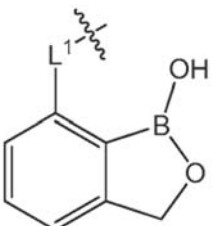
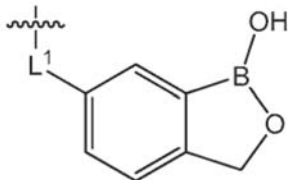
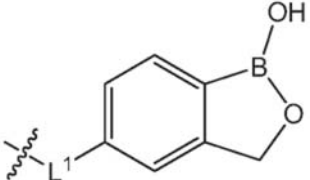
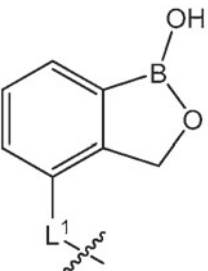


No.	Estructura	No.	Estructura
19		20	
21		22	
23		24	
25		26	
27		28	

No.	Estructura	No.	Estructura
29		30	
31		32	
33		34	
35		36	
37		38	

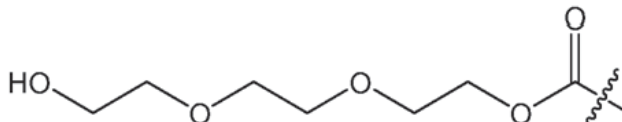
No.	Estructura	No.	Estructura
39		40	
41		42	
43		44	
45		46	
47		48	
49		50	

No.	Estructura	No.	Estructura
51		52	
53		54	
55		56	
57		58	
59		60	
61		62	

No.	Estructura	No.	Estructura
63		64	
65		66	
67		68	
69		70	
71		72	
73			

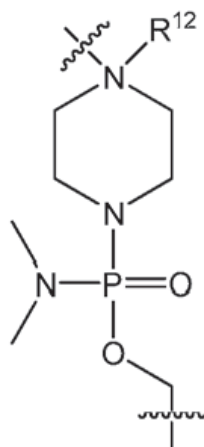
En algunos casos de los oligómeros anteriores, el extremo 3' o 5' terminal puede modificarse para contener una fracción para mejorar la solubilidad. Tales fracciones incluyen trietilenglicol, que puede estar unido al oligonucleótido a través de un enlazante L<sup>1</sup>. Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen análogos de oligonucleótidos que tienen la siguiente fracción unida covalentemente en el extremo 3' o 5'-terminal.

5



En realizaciones específicas, la fracción trietilenglicol anterior está unido covalentemente en el extremo 5' terminal a través del siguiente enlazante L<sup>1</sup>:

10



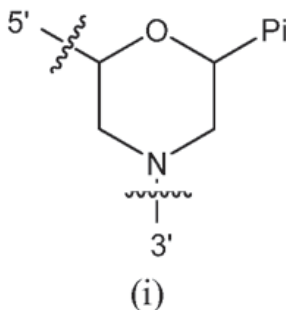
También se contemplan composiciones que comprenden el análogo de oligonucleótidos de una cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas se describen con más detalle a continuación.

15

#### B. Propiedades de los oligómeros

Como se indicó anteriormente, la presente divulgación está dirigida a un oligómero que comprende fracciones de ácido borónico o éster borónico que imparten propiedades deseables (por ejemplo, mejor penetración celular, tiempo de residencia, etc.) a los oligómeros. En ciertas realizaciones, el oligómero comprende una estructura principal que comprende una secuencia de estructuras de anillo morfolino unidas por enlaces intersubunitarios, los enlaces intersubunitarios que unen un extremo 3' de una estructura de anillo morfolino a un extremo 5' de una estructura de anillo morfolino adyacente, en donde cada uno La estructura del anillo morfolino está unida a una fracción de emparejamiento de bases, de manera que el oligómero puede unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico objetivo. Las estructuras de anillo morfolino pueden tener la siguiente estructura (i):

25



en la que Pi es, en cada aparición, independientemente una fracción de emparejamiento de bases.

30

Cada estructura de anillo morfolino soporta una fracción de emparejamiento de bases (Pi), para formar una secuencia de restos de emparejamiento de bases que está diseñado típicamente para hibridar con un objetivo antisentido seleccionado en una célula o en un sujeto que se está tratando. El resto de emparejamiento de bases puede ser una purina o pirimidina que se encuentra en el ADN o ARN nativo (A, G, C, T o U) o un análogo, como la hipoxantina (el componente base del nucleósido inosina) o 5-metilcitosina. También se pueden utilizar bases analógicas que confieren

35

una afinidad de unión mejorada al oligómero. Los análogos de ejemplo a este respecto incluyen pirimidinas modificadas con propinilo C5, 9- (aminoetoxi) fenoxazina (clamp G) y similares.

5 Como se indicó anteriormente, el oligómero se puede modificar, de acuerdo con un aspecto de la invención, para incluir uno o más enlaces que comprenden la estructura (I) o (II), por ejemplo, hasta aproximadamente 1 por cada 2-5 enlaces, por lo general 3-5 por cada 10 enlaces. Ciertas realizaciones también incluyen uno o más enlaces que comprenden la estructura (I) o (II).

10 En un caso, los enlaces que comprenden la estructura (I) o (II) se intercalan a lo largo de la estructura principal. En algunas realizaciones, el oligómero no tiene un patrón estrictamente alternativo de enlaces que comprende enlaces de estructura (I) o (II) a lo largo de toda su longitud. Los oligómeros pueden comprender opcionalmente una estructura (I) o (II) unida covalentemente al extremo 5' y/o 3'.

15 Los oligómeros para uso en aplicaciones antisentido generalmente varían en longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 subunidades, más preferiblemente de aproximadamente 15 a 25 subunidades. Por ejemplo, un oligómero de la invención que tiene 19-20 subunidades, una longitud útil para un oligómero antisentido, puede tener idealmente de dos a siete, por ejemplo, cuatro a seis, o tres a cinco, enlaces que comprenden la estructura (I) o (II). Un oligómero que tiene 14-15 subunidades puede tener idealmente de dos a cinco, por ejemplo, 3 o 4, enlaces que comprenden la estructura (I) o (II).

20 En algunas realizaciones para aplicaciones antisentido, el oligómero puede ser 100% complementario a la secuencia objetivo de ácido nucleico, o puede incluir faltas de emparejamiento, por ejemplo, para acomodar variantes, siempre que un heterodúplex formado entre el oligómero y la secuencia objetivo de ácido nucleico sea suficientemente estable para resistir la acción de las nucleasas celulares y otros modos de degradación que pueden ocurrir in vivo. Las faltas de emparejamiento, si están presentes, son menos desestabilizadoras hacia las regiones finales del dúplex híbrido que en el medio. El número faltas de emparejamiento permitidos dependerá de la longitud del oligómero, el porcentaje de pares de bases G:C en el dúplex y la posición del emparejamiento en el dúplex, de acuerdo con los principios bien entendidos de la estabilidad del dúplex. Aunque dicho oligómero antisentido no es necesariamente complementario al 100% de la secuencia objetivo del ácido nucleico, es eficaz para unirse de forma estable y específica a la secuencia objetivo, de modo que una actividad biológica de el objetivo del ácido nucleico, por ejemplo, la expresión de proteínas codificadas ), está modulado.

25 La estabilidad del dúplex formado entre un oligómero y la secuencia objetivo es una función de la unión  $T_m$  y la susceptibilidad del dúplex a la escisión enzimática celular. La  $T_m$  de un compuesto antisentido con respecto al ARN de secuencia complementaria puede medirse mediante métodos convencionales, como los descritos por Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp. 107-108 o como se describe en Miyada CG. y Wallace RB, 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques, Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107.

30 En algunas realizaciones, cada oligómero antisentido tiene una  $T_m$  de unión, con respecto a un ARN de secuencia complementaria, mayor que la temperatura corporal o en otras realizaciones superiores a 50 °C. En otras realizaciones, las  $T_m$  están en el rango de 60-80 °C o mayor. De acuerdo con principios bien conocidos, la  $T_m$  de un compuesto oligomérico, con respecto a un híbrido de ARN de base complementaria, se puede aumentar al aumentar la proporción de bases pareadas C: G en el dúplex y/o al aumentar la longitud (en pares base) del heterodúplex. Al mismo tiempo, con el fin de optimizar la captación celular, puede ser ventajoso limitar el tamaño del oligómero. Por esta razón, los compuestos que muestran una  $T_m$  alta (50 °C o más) a una longitud de 20 bases o menos son generalmente preferidos a los que requieren más de 20 bases para valores de  $T_m$  altos. Para algunas aplicaciones, oligómeros más largos, por ejemplo, más de 20 bases pueden tener ciertas ventajas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los oligómeros más largos pueden encontrar una utilidad particular para su uso en la omisión de exones o la modulación de empalme.

35 Las bases de secuencia de direccionamiento pueden ser bases de ADN normales o análogos de las mismas, por ejemplo, uracilo e inosina que son capaces de emparejar bases de Watson-Crick con bases de ARN de secuencia objetivo.

40 Los oligómeros también pueden incorporar bases de guanina en lugar de adenina cuando el nucleótido objetivo es un residuo de uracilo. Esto es útil cuando la secuencia objetivo varía según las diferentes especies virales y la variación en cualquier residuo de nucleótido dado es citosina o uracilo. Al utilizar guanina en el oligómero de direccionamiento en la posición de variabilidad, se puede aprovechar la capacidad bien conocida de la guanina para formar un par de bases con uracilo (denominado emparejamiento de bases C/U:G). Al incorporar guanina en estas ubicaciones, un solo oligómero puede dirigirse de manera efectiva a un rango más amplio de variabilidad objetivo de ARN.

45 Los oligómeros pueden existir en diferentes formas isoméricas, por ejemplo, isómeros estructurales (por ejemplo, tautómeros). Con respecto a los estereoisómeros, los compuestos pueden tener centros quirales y pueden aparecer como racematos, mezclas enantioméricamente enriquecidas, enantiómeros individuales, mezclas o diastereómeros o diastereómeros individuales. Todas estas formas isoméricas se incluyen dentro de la presente invención, incluyendo mezclas de las mismas. Los compuestos también pueden poseer quiralidad axial que puede dar lugar a atropisómeros.

Además, algunas de las formas cristalinas de los compuestos pueden existir como polimorfos, que se incluyen en la presente invención. Además, algunos de los compuestos también pueden formar solvatos con agua u otros solventes orgánicos. Tales solvatos se incluyen de manera similar dentro del alcance de esta invención.

5 Los oligómeros descritos en el presente documento se pueden usar en métodos para inhibir la producción de una proteína o la replicación de un virus. De acuerdo con lo anterior, en una realización, un ácido nucleico que codifica dicha proteína se expone a un oligómero como se divulga en el presente documento. En realizaciones adicionales de lo anterior, el oligómero antisentido comprende restos de emparejamiento de bases B que forman una secuencia eficaz para hibridar con una porción de un ácido nucleico objetivo en una ubicación eficaz para inhibir la producción de la proteína. En una realización, la ubicación es una región de codón de inicio ATG de un ARNm, un sitio de empalme de un pre-ARNm, o una secuencia objetivo viral como se describe a continuación.

10 En una realización, el oligómero tiene una  $T_m$  con respecto a la unión a la secuencia objetivo de más de aproximadamente 50 °C, y es captado por células de mamíferos o células bacterianas. La preparación y propiedades de los oligómeros de morfolino se describen con más detalle a continuación y en la Patente de EE.UU. 5.185.444 y WO/2009/064471.

### C. Formulación y administración de los oligómeros.

20 La presente descripción también proporciona la formulación y el suministro del oligómero divulgado. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la presente divulgación se dirige a una composición que comprende un oligómero como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 El suministro efectivo del oligómero antisentido al ácido nucleico objetivo es un aspecto importante del tratamiento. Las rutas de administración de oligómeros antisentido incluyen, pero no se limitan a, varias rutas sistémicas, que incluyen vías orales y parenterales, por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular, así como inhalación, transdérmica y tópica. La ruta apropiada puede ser determinada por un experto en la técnica, según sea apropiado para la condición del sujeto bajo tratamiento. Por ejemplo, una vía apropiada para la administración de un oligómero antisentido en el tratamiento de una infección viral de la piel es la administración tópica, mientras que la administración de un oligómero antisentido para uso en el tratamiento de una infección respiratoria viral es por inhalación. El oligómero también puede administrarse directamente al sitio de la infección viral o al torrente sanguíneo.

35 El oligómero antisentido se puede administrar en cualquier vehículo conveniente que sea fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede incluir cualquiera de una variedad de portadores farmacéuticamente aceptables estándar empleados por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), agua, etanol acuoso, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua o emulsiones de triglicéridos, comprimidos y cápsulas. La elección del portador fisiológicamente aceptable adecuado variará dependiendo del modo de administración elegido.

40 Los compuestos (por ejemplo, oligómeros) de la presente invención pueden utilizarse generalmente como el ácido libre o la base libre. Alternativamente, los compuestos de esta invención se pueden usar en forma de sales de adición de ácido o base. Las sales de adición de ácido de los compuestos amino libres de la presente invención se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica, y se pueden formar a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, metanosulfónico, acético, trifluoroacético, oxálico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, láctico, mandélico, cinámico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutámico y bencenosulfónico. Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico y nítrico. Las sales de adición de base incluyen aquellas sales que se forman con el anión carboxilato e incluyen sales formadas con cationes orgánicos e inorgánicos, como los elegidos de los metales alcalinos y alcalinotérreos (por ejemplo, litio, sodio, potasio, magnesio, bario y calcio), como así como el ion amonio y sus derivados sustituidos (por ejemplo, dibencilamonio, bencilamonio, 2-hidroxietilamonio y similares). Por lo tanto, el término "sal farmacéuticamente aceptable" de la estructura (I) pretende abarcar cualquiera y todas las formas de sal aceptables.

55 En algunos casos, se pueden emplear liposomas para facilitar la captación del oligonucleótido antisentido en las células. (Véase, por ejemplo, Williams, S.A., *Leukemia* 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., *Antiviral Res.* 23:119, 1994; Uhlmann et al., *antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle*, *Chemical Reviews*, Volume 90, No. 4, pages 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp. 287-341, Academic Press, 1979). Los hidrogeles también pueden usarse como vehículos para la administración de oligómeros antisentido, por ejemplo, como se describe en el documento WO 93/01286. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden administrarse en microesferas o micropartículas. (Véase, por ejemplo, Wu, G.Y. and Wu, C.H., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432, 1987). Alternativamente, el uso de microburbujas llenas de gas complejadas con los oligómeros antisentido puede mejorar el suministro a los tejidos objetivo, como se describe en la Patente de EE.UU. No. 6,245,747. También se pueden usar composiciones de liberación sostenida. Estos pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados tales como películas o microcápsulas.



En una realización, la inhibición antisentido es eficaz en el tratamiento de la infección de un animal huésped por un virus, al poner en contacto una célula infectada con el virus con un agente antisentido eficaz para inhibir la replicación del virus específico. El agente antisentido se administra a un sujeto mamífero, por ejemplo, un animal humano o doméstico, infectado con un virus dado, en un portador farmacéutico adecuado. Se contempla que el oligonucleótido antisentido detiene el crecimiento del virus ARN en el huésped. El virus de ARN puede disminuir en número o eliminarse con poco o ningún efecto perjudicial sobre el crecimiento o desarrollo normal del huésped.

En un aspecto del uso descrito anteriormente, el sujeto es un sujeto humano, por ejemplo, un paciente diagnosticado con una infección viral localizada o sistémica. La condición de un paciente también puede dictar la administración profiláctica de un oligómero antisentido de la invención, por ejemplo, en el caso de un paciente que (1) está inmunocomprometido; (2) es una víctima quemada; (3) tiene un catéter permanente; o (4) está a punto de someterse o se ha sometido recientemente a una cirugía. En una realización preferida, el oligómero es un oligómero de morfolino fosforodiamidato, contenido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se administra por vía oral. En otra realización preferida, el oligómero es un oligómero de morfolino fosforodiamidato, contenido en un portador farmacéuticamente aceptable, y se administra por vía intravenosa (i.v.).

En otra aplicación del uso descrito anteriormente, el sujeto es un animal de ganado, por ejemplo, un pollo, pavo, cerdo, vaca o cabra, etc., y el tratamiento es profiláctico o terapéutico. La invención también incluye una composición alimenticia para ganado y aves de corral que contiene un grano alimenticio suplementado con una cantidad subterapéutica de un compuesto antisentido antiviral del tipo descrito anteriormente. También se contempla, en un método para alimentar ganado y aves de corral con un grano alimenticio suplementado con niveles terapéuticos de un antiviral, una mejora en la cual el grano alimenticio se complementa con una cantidad terapéutica de una composición de oligonucleótido antiviral como se describió anteriormente.

En una realización, el compuesto antisentido se administra en una cantidad y manera eficaces para dar como resultado una concentración en sangre máxima de al menos 200-400 nM de oligómero antisentido. Típicamente, se administran una o más dosis de oligómero antisentido, generalmente a intervalos regulares, durante un período de aproximadamente una a dos semanas. Las dosis preferidas para la administración oral son de aproximadamente 1-1000 mg de oligómero por 70 kg. En algunos casos, pueden ser necesarias dosis de más de 1000 mg de oligómero/paciente. Para administración i.v., las dosis preferidas son de aproximadamente 0.5 mg a 1000 mg de oligómero por 70 kg. El oligómero antisentido se puede administrar a intervalos regulares durante un corto período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante dos semanas o menos. Sin embargo, en algunos casos, el oligómero se administra de manera intermitente durante un período de tiempo más largo. La administración puede ser seguida por, o simultáneamente con, la administración de un antibiótico u otro tratamiento terapéutico. El régimen de tratamiento puede ajustarse (dosis, frecuencia, ruta, etc.) según se indique, en función de los resultados de los inmunoensayos, otras pruebas bioquímicas y el examen fisiológico del sujeto en tratamiento.

Un régimen de tratamiento in vivo efectivo que use los oligonucleótidos antisentido de la invención puede variar según la duración, la dosis, la frecuencia y la vía de administración, así como la afección del sujeto bajo tratamiento (es decir, administración profiláctica versus administración en respuesta a infección sistémica o localizada). De acuerdo con lo anterior, tal terapia in vivo a menudo requerirá un control mediante pruebas apropiadas para el tipo particular de infección viral en tratamiento, y los ajustes correspondientes en la dosis o el régimen de tratamiento, para lograr un resultado terapéutico óptimo. El tratamiento puede ser monitoreado, por ejemplo, por indicadores generales de enfermedad y/o infección, como hemograma completo (CBC), métodos de detección de ácido nucleico, pruebas de inmunodiagnóstico, cultivo viral o detección de heterodúplex.

La eficacia de un oligómero antisentido antiviral administrado in vivo de la invención para inhibir o eliminar el crecimiento de uno o más tipos de virus de ARN puede determinarse a partir de muestras biológicas (tejido, sangre, orina, etc.) tomadas de un sujeto antes, durante y posterior a la administración del oligómero antisentido. Los ensayos de tales muestras incluyen (1) monitorear la presencia o ausencia de formación de heterodúplex con secuencias objetivo y no objetivo, usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, un ensayo de movilidad de gel electroforético; (2) controlar la cantidad de producción de proteína viral, según lo determinado por técnicas estándar como ELISA o transferencia de Western, o (3) medir el efecto sobre el título viral, por ejemplo, por el método de Spearman-Kärber. (Ver, por ejemplo, Pari, G.S. et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 39(5):1157-1161, 1995; Anderson, K.P. et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 40(9):2004-2011, 1996, Cottral, G.E. (ed) in: *Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology*, pp. 60-93, 1978).

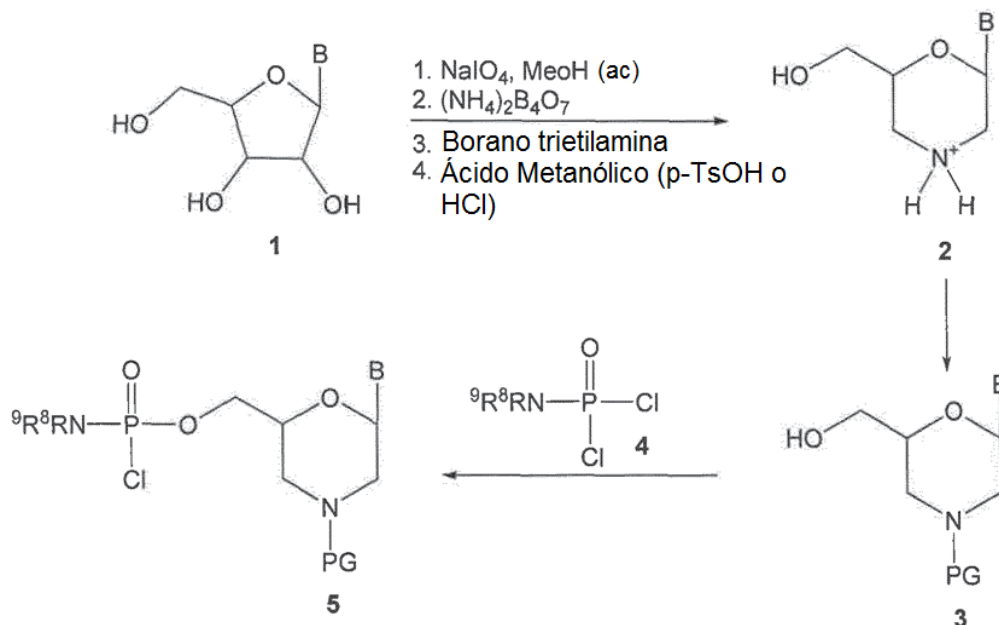
En algunas realizaciones, el oligómero es absorbido activamente por células de mamíferos. En realizaciones adicionales, el oligómero puede conjugarse con una fracción de transporte (por ejemplo, péptido de transporte) como se describe en el presente documento para facilitar dicha captación.

#### D. Preparación de los oligómeros.

Las subunidades de morfolino, los enlaces intersubunitarios modificados y los oligómeros que comprenden los mismos pueden prepararse como se describe en los ejemplos y en la patente de EE.UU. Nos. 5,185,444 y 7,943,762 que se

incorporan aquí como referencia en su totalidad. Las subunidad de morfolino se pueden preparar de acuerdo con el siguiente Esquema I de Reacción general.

Esquema de reacción 1. Preparación de subunidades Morfolino



Con referencia al Esquema 1 de Reacción, en donde B representa una fracción de emparejamiento de bases y PG representa un grupo protector, las subunidades morfolino pueden prepararse a partir del ribinucleósido (1) correspondiente como se muestra. La subunidad (2) de morfolino puede protegerse opcionalmente por reacción con un precursor de grupo protector adecuado, por ejemplo cloruro de tritilo. El grupo 3' protector se elimina generalmente durante la síntesis de oligómeros en estado sólido como se describe con más detalle a continuación. La fracción de emparejamiento de bases puede protegerse adecuadamente para la síntesis de oligómeros en fase vendida. Los grupos protectores adecuados incluyen benzoilo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina y pivaloiloximetilo para hipoxantina (I). El grupo pivaloiloximetilo se puede introducir en la posición N1 de la base heterocíclica de hipoxantina. Aunque se puede emplear una subunidad de hipoxantina no protegida, los rendimientos en las reacciones de activación son muy superiores cuando la base está protegida. Otros grupos protectores adecuados incluyen los divulgados en la solicitud de EE. UU. No. 12/271,040, (publicado como US2009/0131624A).

La reacción de 3 con el compuesto 4 de fósforo activado, da como resultado subunidad de morfolino que la fracción (5) de enlace deseada. Los compuestos de la estructura 4 se pueden preparar utilizando cualquier número de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, tales compuestos pueden prepararse por reacción de la correspondiente amina y oxicloriguro de fósforo. A este respecto, el material de partida de amina se puede preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos en los Ejemplos y en las Patentes de EE.UU. No. 7,943,762. Aunque el esquema anterior representa la preparación de enlaces de tipo (B) (por ejemplo, X es  $-\text{NR}^8\text{R}^9$ ), los enlaces de tipo (A) (por ejemplo, X es dimetil amina) se pueden preparar de manera análoga.

Los compuestos de estructura 5 se pueden usar en la síntesis de oligómeros automatizados en fase sólida para la preparación de oligómeros que comprenden los enlaces intersubunitarios. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. En resumen, un compuesto de estructura 5 puede modificarse en el extremo 5' para contener un enlazante a un soporte sólido. Por ejemplo, el compuesto 5 puede estar ligado a un soporte sólido mediante un enlazante que comprende  $\text{L}^1$ . Un método de ejemplo se demuestra en las figuras 3 y 4. De esta manera, el oligo puede comprender una modificación en el 5' terminal después de que se completa la síntesis del oligómero y el oligómero se escinde del soporte sólido. Una vez soportado, el grupo protector de 5 (por ejemplo, tritilo) se elimina y la amina libre se hace reaccionar con una fracción de fósforo activado de un segundo compuesto de estructura 5. Esta secuencia se repite hasta obtener la longitud deseada de oligo. El grupo protector en el extremo 5' terminal puede eliminarse o dejarse encendido si se desea una modificación en 5'. El oligo se puede eliminar del soporte sólido utilizando cualquier número de métodos, o un ejemplo de tratamiento con una base para romper el enlace con el soporte sólido.

La preparación de oligómeros de morfolino que contienen ácido borónico o fracciones éster de ácido borónico se describe con más detalle en los ejemplos. En general, la fracción de ácido borónico (o éster) se prepara de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Un enlace adecuado, por ejemplo una fracción que contiene ácido carboxílico, se une covalentemente a la fracción de ácido borónico. La conjugación de la fracción de ácido borónico se completa

luego mediante la activación del ácido borónico con un agente activador adecuado (por ejemplo, EDC y similares) en presencia de un oligómero que contiene una amina libre.

#### E. Uso de oligómeros en el tratamiento de enfermedades

En otras realizaciones, la presente invención se dirige al análogo de oligonucleótidos como se describe en el presente documento para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto mamífero.

La presente descripción también proporciona un análogo de oligonucleótidos como se describe anteriormente para uso en la inhibición de la producción de una proteína, comprendiendo el uso exponer un ácido nucleico que codifica la proteína al análogo de oligonucleótido. De acuerdo con lo anterior, en una realización, un ácido nucleico que codifica una proteína de este tipo se expone a un oligómero antisentido que comprende al menos una fracción éster de ácido borónico o ácido borónico, como se divulga en este documento, donde las fracciones de emparejamiento de bases Pi forman una secuencia eficaz para hibridar con una porción del ácido nucleico en una ubicación efectiva para inhibir la producción de la proteína. El oligómero puede dirigirse, por ejemplo, a una región del codón de inicio ATG de un ARNm, un sitio de empalme de un pre-ARNm, o una secuencia objetivo viral como se describe a continuación.

En otro caso, la divulgación proporciona un análogo de oligonucleótidos con actividad antisentido mejorada en comparación con un oligómero que tiene una secuencia de subunidad de morfolino, unidas por enlaces intersubunitarios, que soportan fracciones de emparejamiento, la mejora de la actividad antisentido es una consecuencia de la modificación de un oligómero como se describe en el presente documento para incluir al menos un ácido borónico o una fracción de éster borónico.

En algunas realizaciones, la mejora de la actividad antisentido puede evidenciarse por:

(i) una disminución en la expresión de una proteína codificada, en relación con la proporcionada por un oligómero no modificado correspondiente, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia objetivo es efectiva para bloquear un codón de inicio de la traducción para la proteína codificada, o

(ii) un aumento en la expresión de una proteína codificada, en relación con la proporcionada por un oligómero no modificado correspondiente, cuando la unión del oligómero antisentido a su secuencia objetivo es eficaz para bloquear un sitio de empalme aberrante en un pre-ARNm que codifica dicha proteína cuando se empalma correctamente. Los ensayos adecuados para medir estos efectos se describen más adelante. En una realización, la modificación proporciona esta actividad en un ensayo de traducción libre de células, un ensayo de traducción de corrección de empalme en cultivo celular, o una ganancia de corrección de empalme de la función del sistema modelo animal como se describe en el presente documento. En una realización, la actividad se potencia por un factor de al menos dos, al menos cinco o al menos diez.

A continuación se describen diversas aplicaciones de ejemplo de los oligómeros de la invención. Esta descripción no pretende limitar la invención de ninguna manera, sino que sirve para ejemplificar el rango de afecciones de enfermedades humanas y animales que pueden abordarse utilizando oligómeros que comprenden los enlaces intersubunitarios modificados descritos en el presente documento.

#### 1. Enfermedades neuromusculares

En ciertas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad neuromuscular, por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne. En algunas realizaciones, el análogo de oligonucleótidos para tratar la enfermedad neuromuscular se puede seleccionar del grupo que consiste en:

(a) un oligómero antisentido dirigido contra la miostatina humana, que tiene una secuencia de bases complementaria de al menos 12 bases contiguas en una región objetivo del ARNm de miostatina humana identificada por la SEQ ID NO: 1, para tratar una condición de desgaste muscular, como se describió anteriormente (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. No. 12/493,140, publicado como US 2010/0016215A, y publicación PCT WO2006/086667). Las secuencias de direccionamiento de murinos de ejemplo se enumeran como SEQ ID NOs: 2-4.

(b) un oligómero antisentido capaz de producir omisión de exón en la proteína DMD (distrofina), tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID No. 5-18 y 39, para restaurar la actividad parcial de la proteína distrofina, para tratar la DMD, como se describió anteriormente (Ver, por ejemplo, PCT Publicación Nos. WO/2010/048586 y WO/2006/000057 o la publicación de patente de EE. UU. No. 09/061,960, publicada como patente de Estados Unidos 6,024,138).

Varias otras enfermedades neuromusculares pueden tratarse usando los oligómeros de la presente invención. Los compuestos de ejemplo para tratar la atrofia del músculo espinal (SMA) y la distrofia miotónica (DM) se discuten a continuación.

La SMA es una enfermedad autosómica recesiva provocada por la pérdida crónica de neuronas motoras alfa en la médula espinal y puede afectar tanto a niños como a adultos. La expresión reducida de la neurona motora de supervivencia (SMN) es responsable de la enfermedad (Hua, Sahashi et al. 2010). Las mutaciones que provocan SMA están ubicadas en el gen SMN1, pero un gen paralógico, SMN2, puede permitir la viabilidad compensando la pérdida de SMN1 si se expresa desde una forma de empalme alternativa que carece del exón 7 (delta7 SMN2). Se ha demostrado que todos los compuestos antisentido dirigidos al intrón 6, el exón 7 y el intrón 7 inducen la inclusión del exón 7 en diversos grados. Los compuestos antisentido dirigidos al intrón 7 se emplean en ciertas realizaciones (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT núm. WO/2010/148249, WO/2010/120820, WO/2007/002390 y Patente de EE.UU. No. 7838657). Las secuencias antisentido de ejemplo que se dirigen al pre-ARNm de SMN2 e inducen una inclusión mejorada del exón 7 se enumeran a continuación como SEQ ID NO: 19-21. Se contempla que las modificaciones seleccionadas de estas secuencias de oligómeros que usan el ácido borónico o las fracciones de éster borónico descritas en este documento tendrían propiedades mejoradas en comparación con las conocidas en la técnica. Además, se contempla que cualquier oligómero dirigido al intrón 7 del gen SMN2 y que incorporan las características de la presente invención tiene el potencial de inducir la inclusión del exón 7 y proporcionar un beneficio terapéutico a los pacientes con SMA. La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) y el tipo 2 (DM2) son trastornos hereditarios dominantes provocados por la expresión de un ARN tóxico que conduce a la degeneración neuromuscular. La DM1 y la DM2 están asociadas con repeticiones largas de polyCUG y polyCCUG en las regiones 3'-UTR e intrón 1 de la transcripción de proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK) y proteína 9 de dedo de zinc (ZNF9), respectivamente (véase, por ejemplo, el documento WO2008/036406). Mientras que los individuos normales tienen hasta 30 repeticiones de CTG, los pacientes con DM1 tienen un número mayor de repeticiones que van desde 50 hasta miles. La gravedad de la enfermedad y la edad de inicio se correlacionan con el número de repeticiones. Los pacientes con inicios adultos muestran síntomas más leves y tienen menos de 100 repeticiones, los pacientes con DM1 de inicio juvenil tienen hasta 500 repeticiones y los casos congénitos generalmente tienen alrededor de mil repeticiones de CTG. Las transcripciones expandidas que contienen repeticiones de CUG forman una estructura secundaria, se acumulan en el núcleo en forma de focos nucleares y secuestran proteínas de unión a ARN (RNA-BP). Varios RNA-BP se han implicado en la enfermedad, incluidas las proteínas de tipo músculo-ciego (MBNL) y la proteína de unión a CUG (CUGBP). Las proteínas MBNL son homólogas a las proteínas de músculo-ciego Drosophila (Mbl) necesarias para el fotorreceptor y la diferenciación muscular. MBNL y CUGBP se han identificado como reguladores de empalme antagónicos de las transcripciones afectadas en la DM1, como la troponina T cardíaca (cTNT), el receptor de insulina (IR) y el canal de cloruro específico del músculo (C1C-1).

Se sabe en la técnica que los oligonucleótidos antisentido dirigidos a las repeticiones expandidas del gen DMPK pueden desplazar el secuestro de ARN-BP y revertir los síntomas de mionía en un modelo animal de DM1 (documento WO2008/036406). Se contempla que los oligómeros que incorporan características de la presente invención proporcionarían una actividad y un potencial terapéutico mejorados para los pacientes con DM1 y DM2. Las secuencias de ejemplo dirigidas a las repeticiones polyCUG y polyCCUG descritas anteriormente se enumeran a continuación como SEQ ID NOs: 22-38 y se describen más detalladamente en la solicitud de EE.UU. No. 13/101,942 publicada como US 2011/0269665.

Se anticipan realizaciones adicionales de la presente invención para tratar trastornos neuromusculares e incluyen oligómeros diseñados para tratar otros trastornos genéticos de inestabilidad de repetición de ADN. Estas enfermedades incluyen la enfermedad de Huntington, la ataxia espino-cerebelosa, la atrofia muscular espinal y bulbar ligada al cromosoma X y la ataxia espinocerebelosa tipo 10 (SCA10) como se describe en el documento WO2008/018795.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos de ejemplo

Nombre	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO
huMSTN objetivo	GAAAAAAGATTATATTGATTTTAAAATCATGCA AAACTGCAACTCTGTGTT	1
muMSTN25-104	CATACATTTGCAGTTTTTGCATCAT	2
muMSTN25-183	TCATTTTTAAAATCAGCACAATCTT	3
muMSTN25-194	CAGTTTTTGCATCATTTTTAAAATC	4
Exón44-A	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	5
Exón44-B	AAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	6
Exón44-C	TTGTGTCTTTCTGAGAACTGTTCA	7

ES 2 706 198 T3

Nombre	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO
Exón45-A	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	8
Exón45-B	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	9
Exón45-C	CA TTCAA TGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT	10
Exón50-A	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	11
Exón50-B	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCC	12
Exón50-C	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	13
Exón5 1 -A	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTTTGG	14
Exón51-B	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	15
Exón51-C	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	16
Exón53-A	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	17
Exón53-B	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGA	18
SMN2-A	CTTTCATAATGCTGGCAG	19
SMN2-B	CATAATGCTGGCAG	20
SMN2-C	GCTGGCAG	21
CAG 9mero	CAG CAG CAG	22
CAG 12mero	CAG CAG CAG CAG	23
CAG 15mero	CAG CAG CAG CAG CAG	24
CAG 18mero	CAG CAG CAG CAG CAG CAG	25
AGC 9mero	AGC AGC AGC	26
AGC 12mero	AGC AGC AGC AGC	27
AGC 15mero	AGC AGC AGC AGC AGC	28
AGC 18mero	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	29
GCA 9mero	GCA GCA GCA	30
GCA 12mero	GCA GCA GCA GCA	31
GCA 15mero	GCA GCA GCA GCA GCA	32
GCA 18mero	GCA GCA GCA GCA GCA GCA	33
AGC 25mero	AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC A	34
CAG 25mero	CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG C	35
CAGG 9mero	CAG GCA GGC	36
CAGG 12mero	CAG GCA GGC AGG	37

Nombre	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO
CAGG 24mero	CAG GCA GGC AGG CAG GCA GGC AGG	38
M23D	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	39

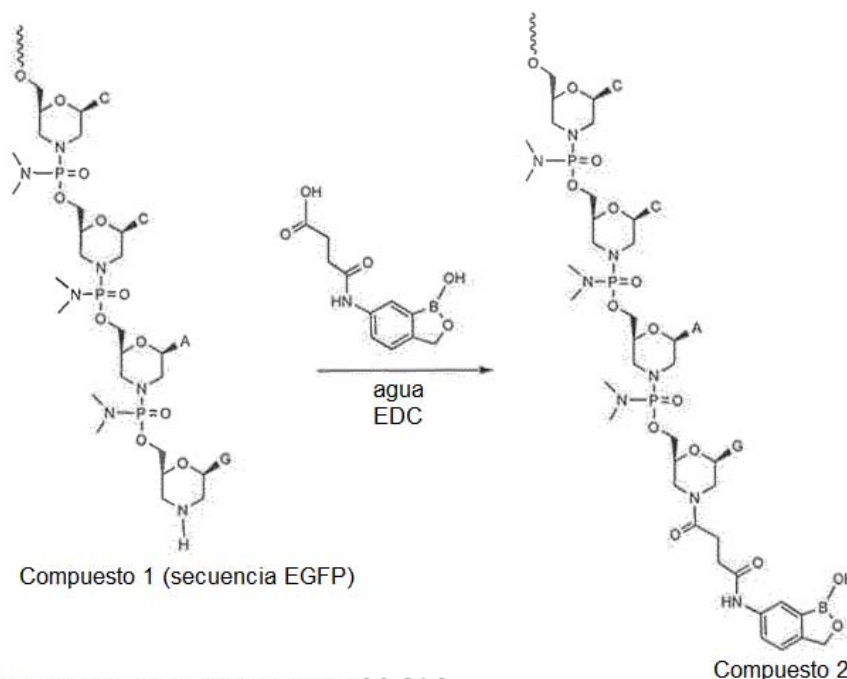
### Ejemplos

5 A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich-Fluka. La benzoil adenosina, la benzoil citidina y la fenilacetil guanosina se obtuvieron de Carbosynth Limited, Reino Unido.

La síntesis de PMO y PMO que contiene modificaciones de enlace adicionales como se describe en el presente documento se realizó utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en las patentes de EE. UU. No. 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, solicitud de patente de EE.UU. pub. Nos. 2009/0131632; 2009/0131624; y 2012/0065169; y la publicación PCT número WO/2009/064471.

#### Ejemplo 1

15 Conjugación del ácido borónico al extremo de 5'-terminal



Secuencia EGFP: 5'-EG3: GCT ATT ACC TTA ACC CAG  
(SEQ ID NO: 40)

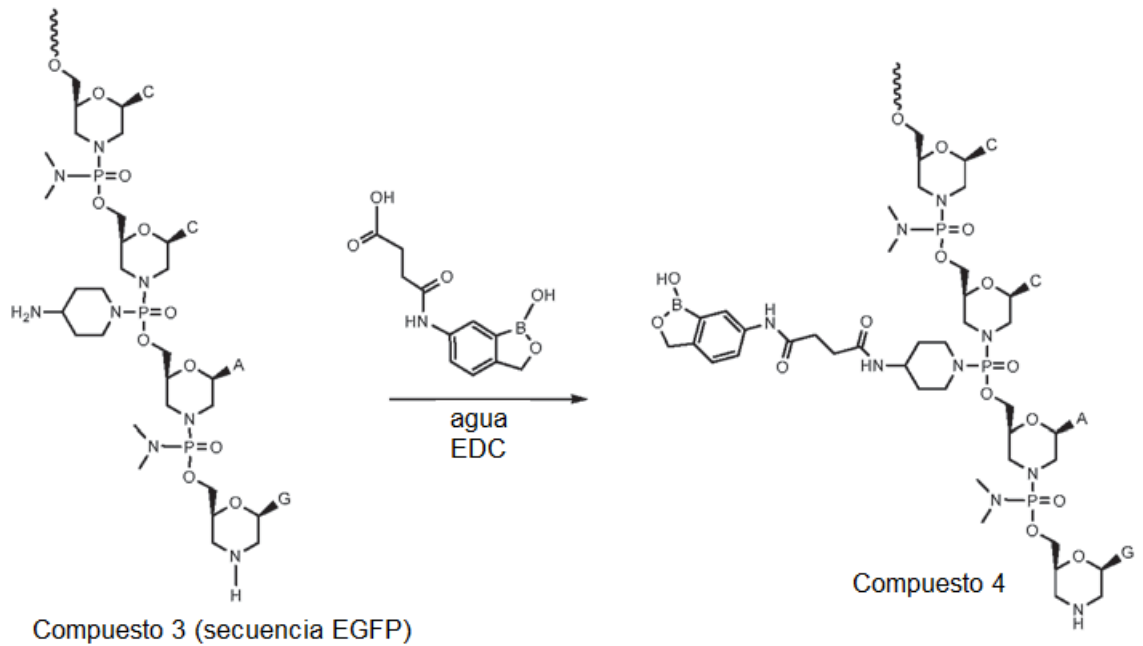
20 El Compuesto 1, un 5-EG3-PMO (EG3 = trietilenglicol) con la secuencia de EGFP (base 3' libre, 30 mg, 4.8 mmol) se disuelve en agua (500 ml) a temperatura ambiente. A esto se agrega EDC (4 mg, 24 mmol) y N-succinil-5-aminoboronofalida (6 mg, 24 mmol), preparado por el método de: WJ Lennarz y HR Snyder, Journal of the American Chemical Society (1960), 82, 2172. La mezcla de reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. El progreso de la reacción es monitoreado por LC-MS (ESI).

25 Una vez completado, se agrega agua (1.5 ml) a la mezcla de reacción, y esta solución se carga en una columna SPE (2 cm). La columna se enjuagó con agua (3 x 2 ml). El producto, compuesto 2, se eluye con acetonitrilo al 45% en agua (6 ml). Las fracciones que contenían el compuesto PMO-BA se identificaron mediante medición de densidad óptica UV. El producto se aísla por liofilización. La pureza y la identidad se determinan mediante MALDI-MS, LC-MS (ESI) y HPLC (C-18 y/o SAX).

30 La conjugación de ácido borónico o fracciones de éster borónico con el extremo 5' se realiza de manera análoga.

#### Ejemplo 2

Preparación de PMO que contiene enlace intersubunitario de ácido borónico



Secuencia EGFP: 5'-EG3: GCT ATT ACC TTA ACC CAG

(SEQ ID NO: 40)

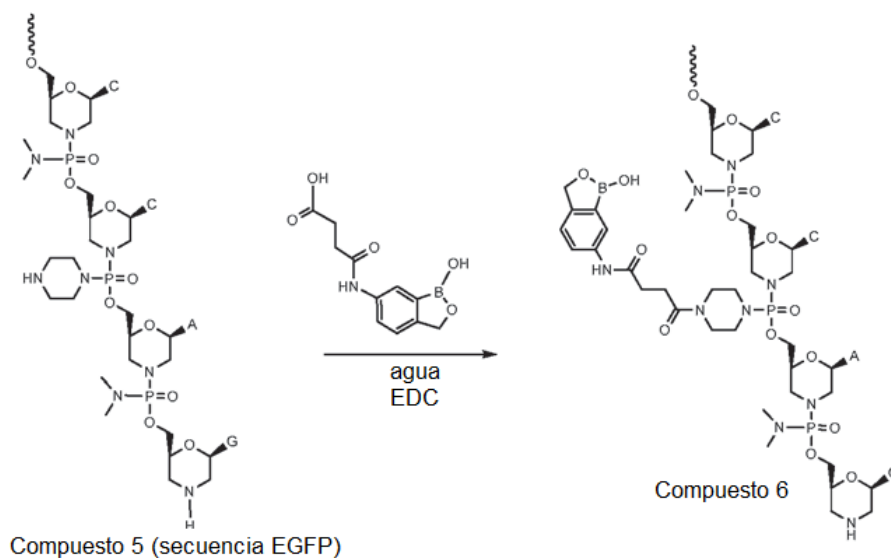
5 El compuesto 3 (base libre en 3', 30 mg, 4.8 mmol) se prepara como se describe en la publicación de los Estados Unidos número 2012/0065169 y se disuelve en agua (500 ml) a temperatura ambiente. A esto se agrega EDC (4 mg, 24 mmol) y N-succinil-5-aminoboronofalida (6 mg, 24 mmol), preparado por el método de: WJ Lennarz y HR Snyder, Journal of the American Chemical Society (1960), 82, 2172. La mezcla de reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. El progreso de la reacción es monitoreado por LC-MS (ESI).

10 Una vez completado, se agrega agua (1.5 ml) a la mezcla de reacción, y esta solución se carga en una columna SPE (2 cm). La columna se enjuagó con agua (3 x 2 ml). El producto, el Compuesto 4, se eluye con acetonitrilo al 45% en agua (6 ml). Las fracciones que contienen el compuesto PMO-BA se identifican por medición de densidad óptica UV. El producto se aísla por liofilización. La pureza y la identidad se determinan mediante MALDI-MS, LC-MS (ESI) y HPLC (C-18 y/o SAX).

15 El 3'-morfolino puede protegerse (por ejemplo, tritilo) para evitar cualquier acoplamiento no deseado de la fracción de ácido borónico al extremo 3'.

20 Ejemplo 3

Preparación de PMO que contiene enlace intersubunitario de ácido borónico



Secuencia EGFP: 5'-EG3: GCT ATT ACC TTA ACC CAG  
(SEQ ID NO: 40)

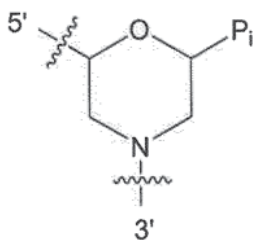
- 5 El Compuesto 5 (base libre en 3', 30 mg, 4.8 mmol) se prepara como se describe en la Patente de EE.UU. No. 7,943,762 y se disolvió en agua (500 ml) a temperatura ambiente. A esto se agrega EDC (4 mg, 24 mmol) y N-succinil-5-aminoboronofluorenyl (6 mg, 24 mmol), preparado por el método de: WJ Lennarz and HR Snyder, Journal of the American Chemical Society (1960), 82, 2172. La mezcla de reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. El progreso de la reacción es monitoreado por LC-MS (ESI).
- 10 Una vez completado, se agrega agua (1.5 ml) a la mezcla de reacción, y esta solución se carga en una columna SPE (2 cm). La columna se enjuagó con agua (3 x 2 ml). El producto, el Compuesto 6, se eluye con acetonitrilo al 45% en agua (6 ml). Las fracciones que contienen el compuesto PMO-BA se identifican por medición de densidad óptica UV. El producto se aísla por liofilización. La pureza y la identidad se determinan mediante MALDI-MS, LC-MS (ESI) y HPLC (C-18 y/o SAX).
- 15 El 3'-morfolino puede protegerse (por ejemplo, tritilo) para evitar cualquier acoplamiento no deseado de la fracción de ácido borónico al extremo 3'.



REIVINDICACIONES

1. Un análogo de oligonucleótidos que comprende una estructura principal, un terminal 3' y un terminal 5', la estructura principal comprende una secuencia de estructuras anulares morfolino unidas por enlaces intersubunitarios, los enlaces intersubunitarios unen un extremo 3' de una estructura de anillo morfolino a un extremo 5' de una estructura de anillo morfolino adyacente, en el que cada estructura de anillo morfolino está unida a una fracción de emparejamiento de bases, de modo que el análogo de oligonucleótidos puede unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico objetivo, en el que al menos uno de los enlaces intersubunitarios, el 3' terminal o el 5' terminal comprende una fracción de éster borónico o un ácido borónico unida covalentemente a los mismos, en el que:

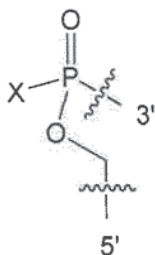
por lo menos una de las estructuras de anillo morfolino tiene la siguiente estructura (i):



(i)

en el que  $P_i$  es, en cada aparición, independientemente una fracción de emparejamiento de bases;

los enlaces intersubunitarios tienen la siguiente estructura (III):



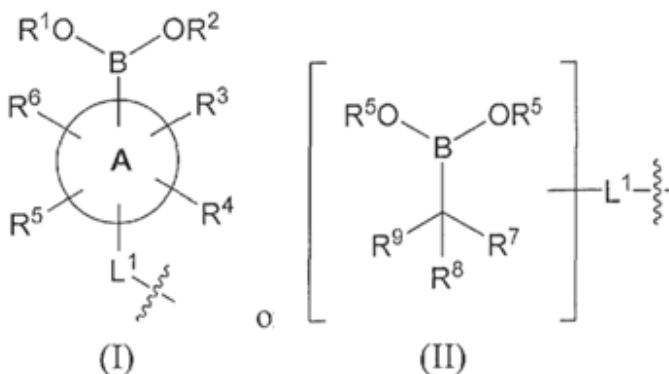
(III)

en el que:

X es, en cada aparición, independientemente de la estructura (I), estructura (II) o  $-NR^{10}R^{11}$ ;

$R^{10}$  y  $R^{11}$  son, en cada aparición, independientemente hidrógeno o alquilo  $C_1-C_6$ ;

el ácido borónico o la fracción de éster borónico tiene, en cada aparición, independientemente una de las siguientes estructuras (I) o (II):



(I)

(II)

o una de sus sales, estereoisómeros o tautómeros farmacéuticamente aceptables, en la que:

R<sup>1</sup> es, en cada aparición, independientemente H o alquilo;

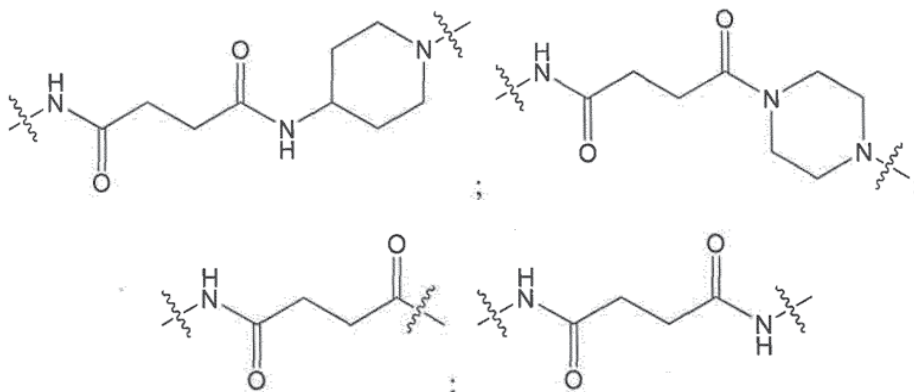
R<sup>2</sup> es H o alquilo, en el que R<sup>2</sup> puede unirse con uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> para formar un anillo;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> están, en cada aparición, independientemente ausentes, H, alquilo, arilo, hidroxilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxi, alcoxialquilo, ariloxi, halo, nitro, ciano, amidilo, amino, alquilamino, aminoalquilo, arilamino, aralquilo, aralquilamino, aralquilocarbonilaminilo, alquilocarbonilaminilo, ariloxycarbonilaminilo, -CO<sub>2</sub>H, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquilocarbonilo, ariloxycarbonilo, alquiloxiimino o heteroarilo, en el que uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> puede unirse a otro de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico y en el que uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> puede unirse a R<sup>2</sup> para formar un anillo heterocíclico;

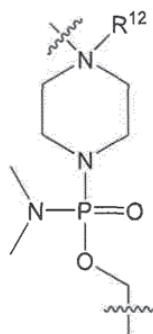
R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son, en cada aparición, independientemente alquilo o alquilamino;

A representa, en cada aparición, independientemente un anillo arilo o heteroarilo de 6 miembros; y

L<sup>1</sup> es, en cada aparición, una de las siguientes estructuras:



o



en el que R<sub>12</sub> está ausente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

2. El análogo de oligonucleótidos de la reivindicación 1, en el que:

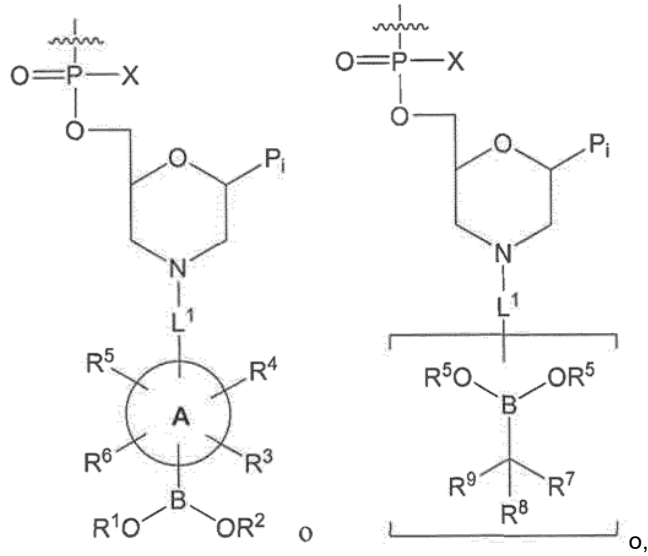
A) al menos un X es la estructura (I) o (II);

B) al menos un X es -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; o

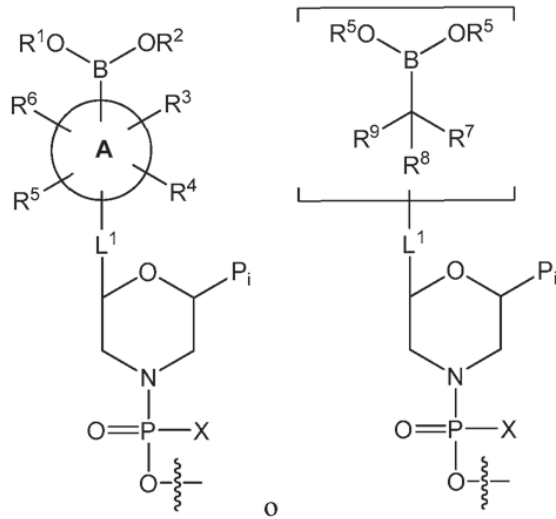
C) cada X que no es la estructura (I) o (II) es -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

3. El análogo de oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

A) El 3' terminal está covalentemente unido a la estructura (I) o estructura (II) y el 3' terminal tiene una de las siguientes estructuras (IV) o (V):



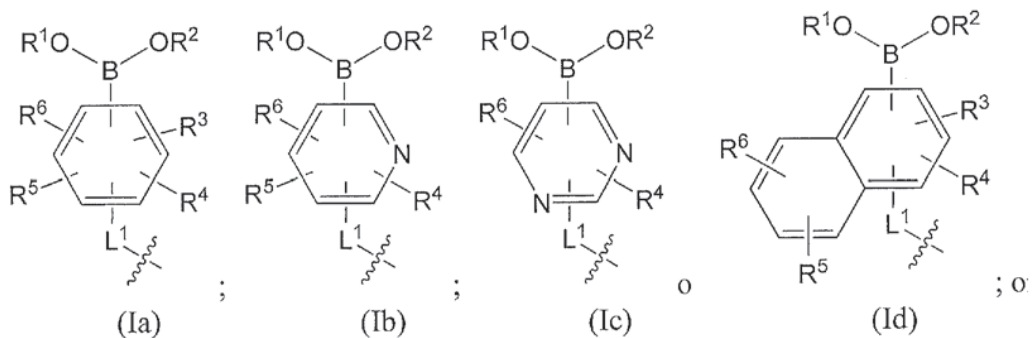
5 B) el 5' terminal se enlaza covalentemente a la estructura (I) o (II) y el 5' terminal tiene una de las siguientes estructuras (VI) o (VII):



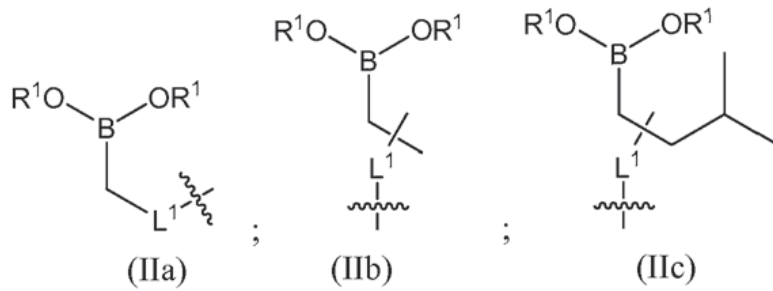
10 en el que P<sub>i</sub>, es una fracción de emparejamiento de bases.

4. El análogo de oligonucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que:

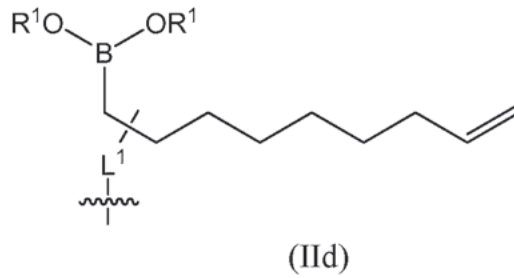
15 A) la estructura (I) tiene una de las siguientes estructuras (Ia), (Ib), (Ic) o (Id):



B) la estructura (II) tiene una de las siguientes estructuras (IIa), (IIb), (IIc) o (IId):



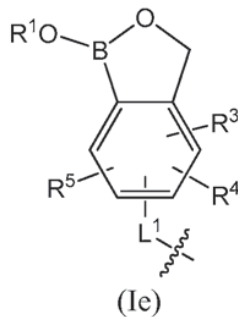
5



10

5. El análogo de oligonucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R<sup>2</sup> se une con uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> o R<sup>6</sup> para formar un anillo heterocíclico.

6. El análogo de oligonucleótidos de la reivindicación 5, en el que la estructura (i) tiene la siguiente estructura (Ic):



15

7. El análogo de oligonucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que:

A) al menos un R<sup>1</sup> es H o R<sup>2</sup> es H; o

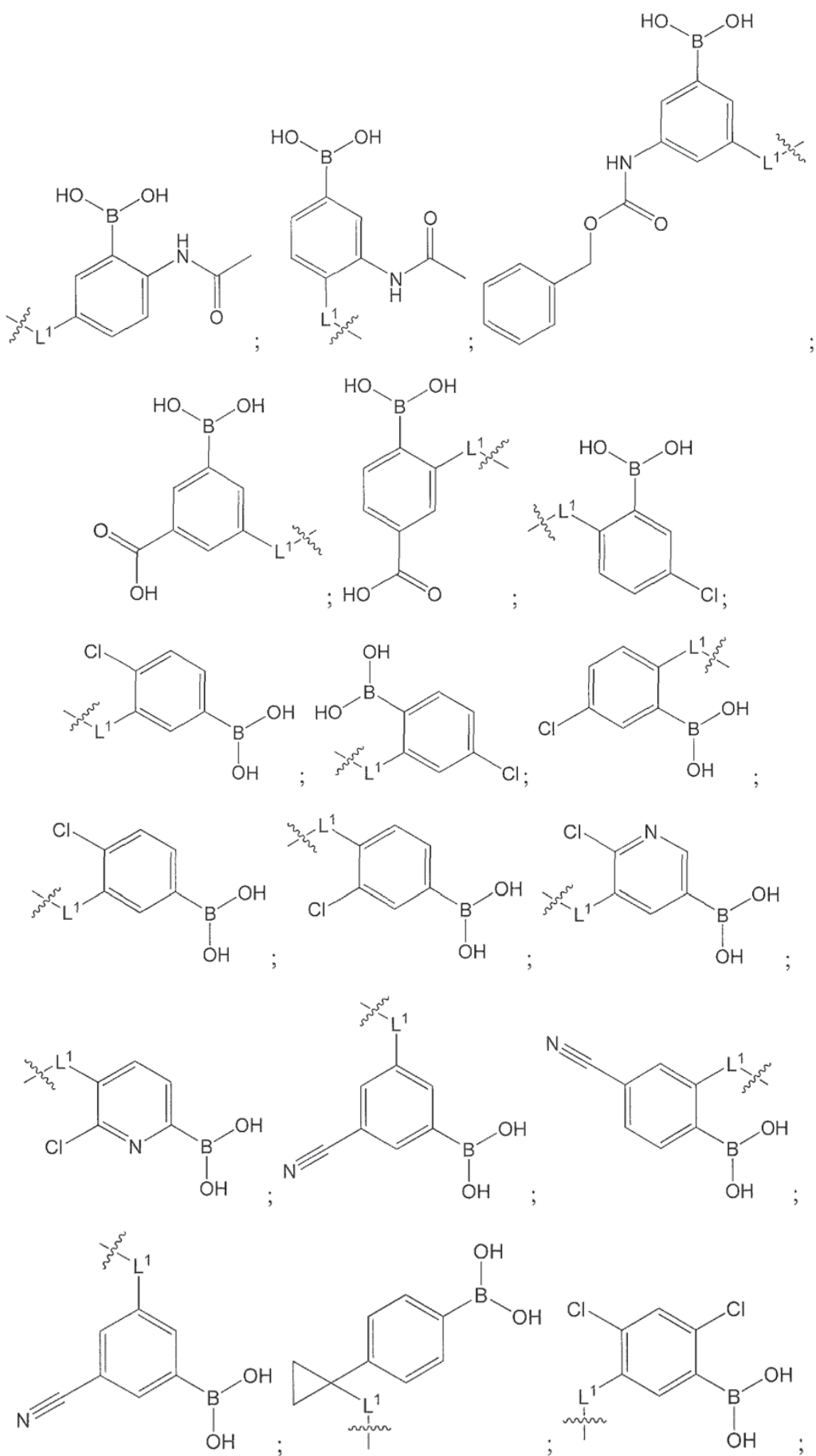
20

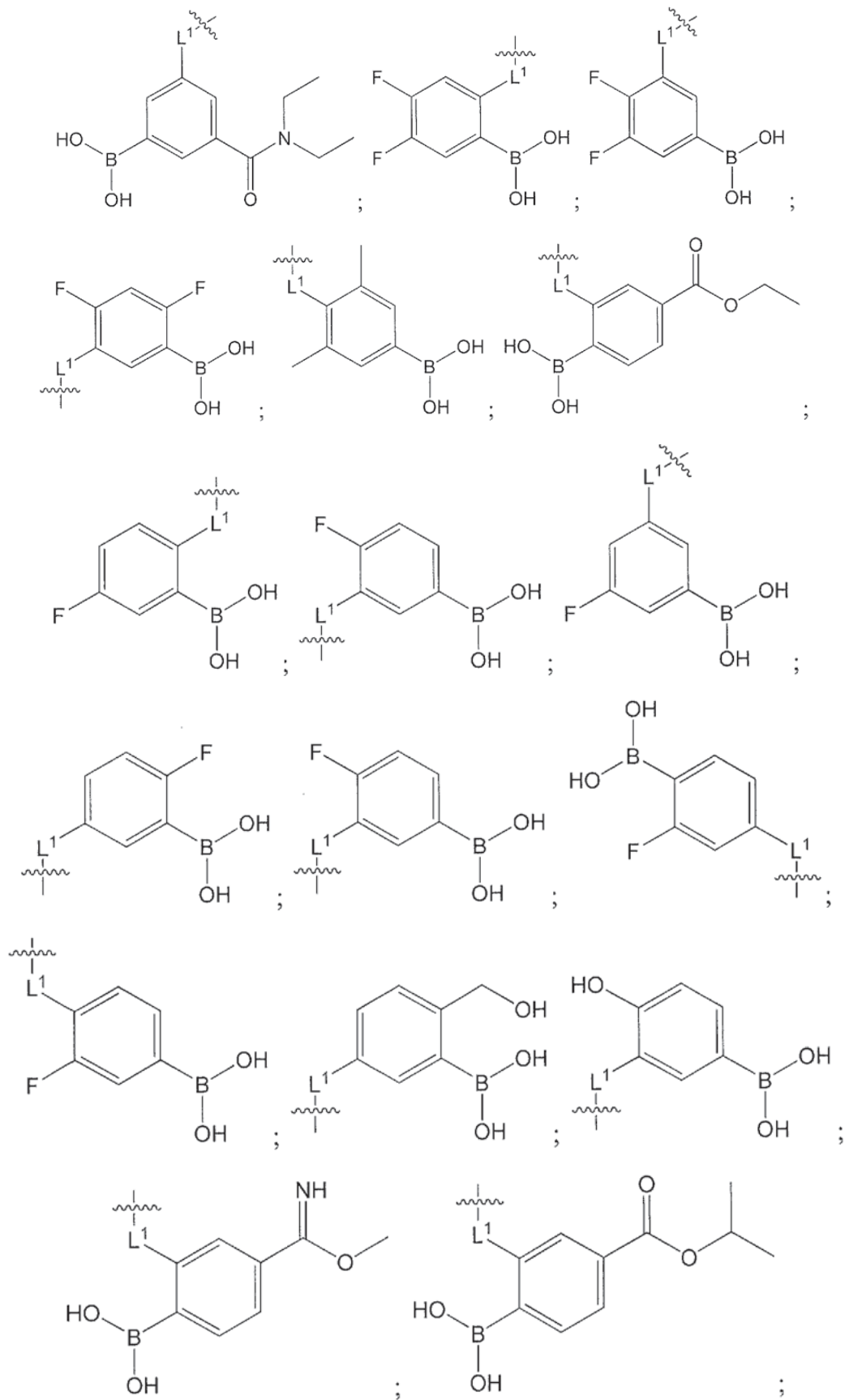
B) cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es H.

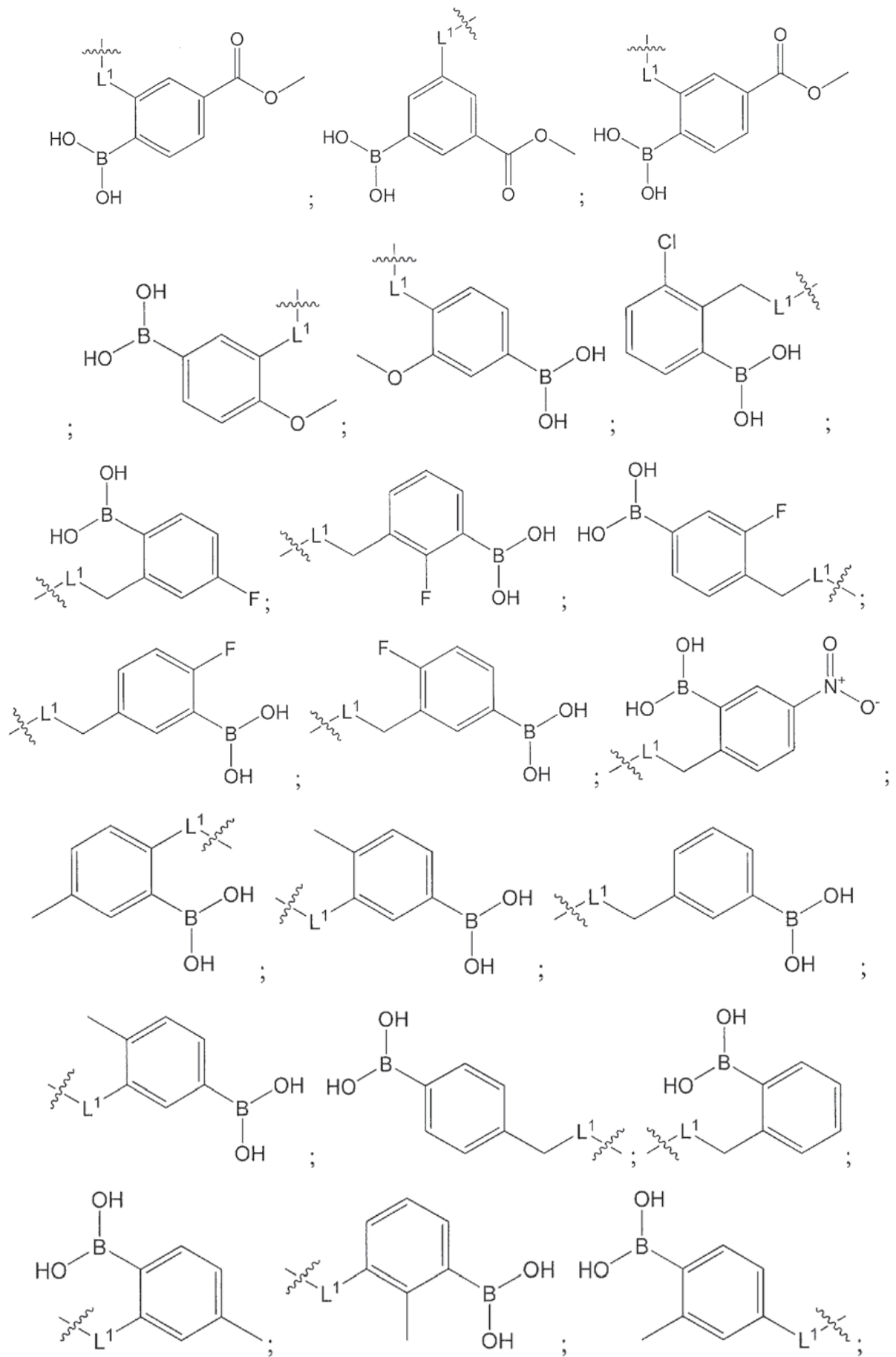
8. El análogo de oligonucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> están cada uno independientemente ausentes, H, hidroxilo, alquilo, hidroxialquilo, aminoalquilo, alcoxi, ariloxi, halo, nitro, ciano amidilo, amino, alquilamino, ariloxycarbonilaminilo, -CO<sub>2</sub>H, alquiloxycarbonilo, alquiloxiimino o heteroarilo.

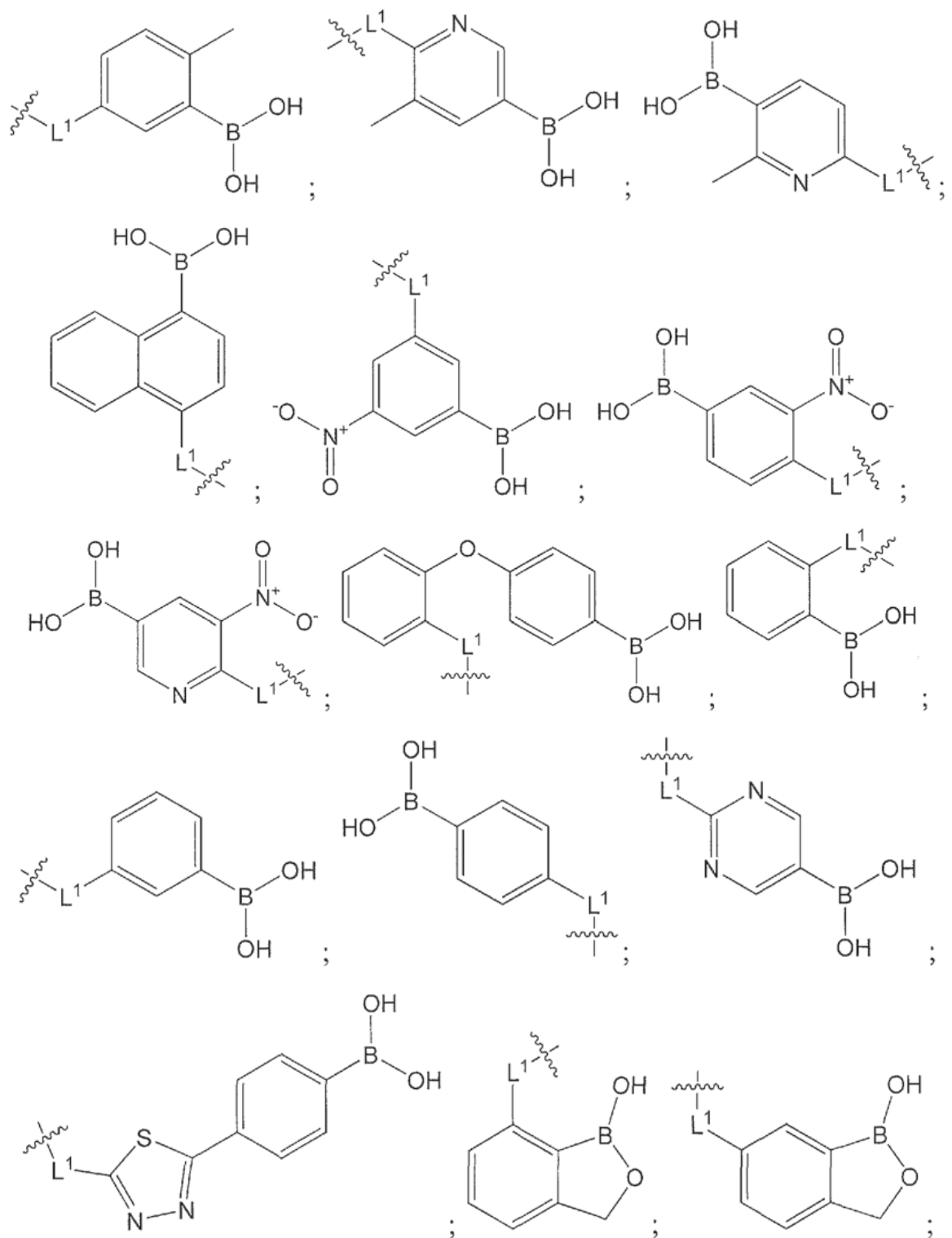
25

9. El análogo de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la estructura (I) tiene una de las siguientes estructuras:

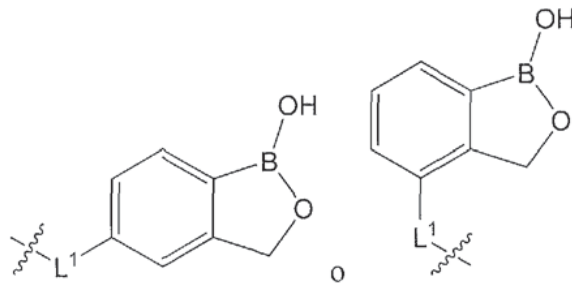












10. Una composición que comprende el análogo de oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 11. El análogo de oligonucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición de la reivindicación 10 para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto, el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del análogo de oligonucleótido o la composición a un sujeto en necesidad del mismo,

10 en el que preferiblemente la enfermedad es una enfermedad neuromuscular,

en el que más preferiblemente la enfermedad neuromuscular es distrofia muscular de Duchenne.

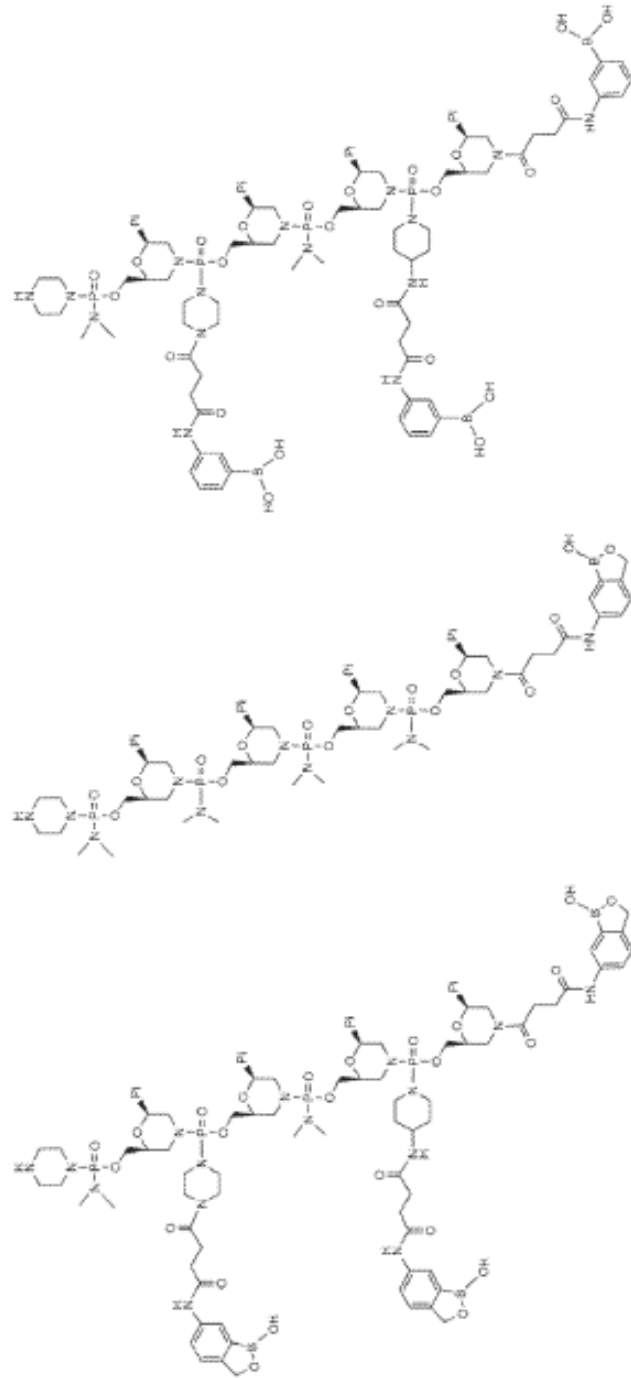


FIG. 1

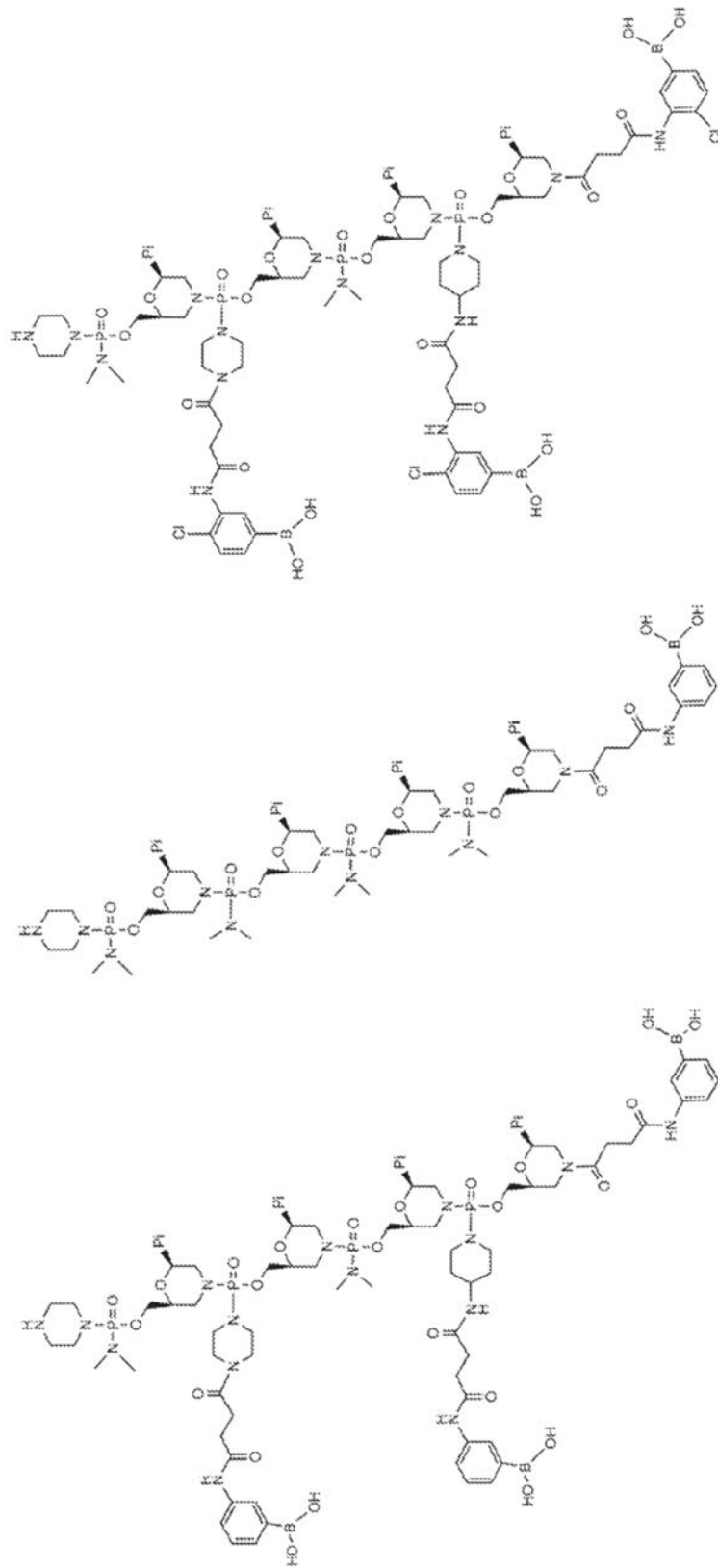


FIG. 2