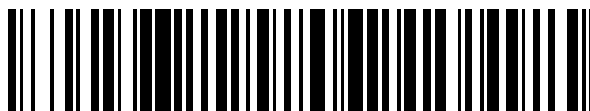


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 853**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2013 PCT/EP2013/073858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2013 E 13791808 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2920304**

54 Título: **Conjugados de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

15.11.2012 EP 12192773

30.01.2013 EP 13153296

28.02.2013 EP 13157237

27.06.2013 EP 13174092

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

16.09.2019

73 Titular/es:

ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN

A/S (100.0%)

Fremtidsvej 3

2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

ALBÆK, NANNA;

HANSEN, HENRIK FRYDENLUND;

KAMMLER, SUSANNE;

RAVN, JACOB y

ØRUM, HENRIK

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 724 853 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 oligonucleótidos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de los tratamientos con oligonucleótidos, y en particular al uso de un conjugado, un grupo de direccionamiento o un grupo de bloqueo para potenciar las propiedades de los oligonucleótidos, por ejemplo, para mejorar el índice terapéutico.

10

Casos relacionados

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a los documentos EP12192773.5, EP13153296.2, EP13157237.2 y EP13174092.0.

15

Antecedentes

Los conjugados de oligonucleótidos se han evaluado ampliamente para su uso en ARNip, donde se consideran esenciales para obtener una potencia *in vivo* suficiente. Por ejemplo, véase el documento WO2004/044141, que se refiere a compuestos oligoméricos modificados que modulan la expresión génica por medio de una vía de interferencia de ARN. Los compuestos oligoméricos incluyen uno o más restos de conjugados que pueden modificar o potenciar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del compuesto oligomérico unido.

20

Por el contrario, los oligonucleótidos de antisentido monocatenarios típicamente se administran terapéuticamente sin conjugación o formulación. Los principales tejidos diana para los oligonucleótidos de antisentido son el hígado y el riñón, aunque también son accesibles una amplia variedad de otros tejidos mediante la modalidad de antisentido, incluyendo los ganglios linfáticos, el bazo y la médula ósea.

25

El documento WO2008/113832 divulga oligonucleótidos gámpmeros de fosforotioato de LNA en los que las regiones flanqueantes comprenden al menos un fosfodiéster entre o adyacente a un nucleósido de LNA. Los oligómeros estaban dirigidos preferentemente al riñón.

30

El documento WO2004/087931 se refiere a oligonucleótidos que comprenden un conjugado de polímero hidrófilo escindible con ácido (PEG).

35

El documento WO 2005/086775 se refiere a la administración dirigida de agentes terapéuticos a órganos específicos usando un resto químico terapéutico, un conector escindible y un dominio de marcado. El conector escindible puede ser, por ejemplo, un grupo disulfuro, un péptido o un dominio de oligonucleótido escindible por una enzima de restricción.

40

El documento WO 2009/126933 se refiere a la administración específica de ácidos nucleicos de ARNip mediante la combinación de ligandos dirigidos con componentes endosomolíticos.

45

El documento WO 2011/126937 se refiere a la administración intracelular dirigida de oligonucleótidos por medio de la conjugación con ligandos de molécula pequeña.

El documento WO2009/025669 se refiere a conectores poliméricos (polietilenglicol) que contienen restos de disulfuro de piridilo. Véase también Zhao *et al.*, Bioconjugate Chem. 2005 16 758-766.

Chaltin *et al.*, Bioconjugate Chem. 2005 16 827-836 informa de oligonucleótidos monoméricos, diméricos y tetraméricos modificados con colesterol usados para incorporar oligonucleótidos de antisentido en liposomas catiónicos, para producir un sistema de administración dendimérico. El colesterol se conjuga con los oligonucleótidos por medio de un conector de lisina.

50

Se han usado otros conjugados de colesterol no escindibles para dirigir los ARNip y los antagomir al hígado; véase, por ejemplo, Soutscheck *et al.*, Nature 2004 vol. 432 173-178 y Krützfeldt *et al.*, Nature 2005 vol 438, 685-689. Para los antagomir y los ARNip parcialmente fosforotiolados, se descubrió que el uso del colesterol como una entidad dirigida al hígado es esencial para la actividad *in vivo*.

55

El documento WO 00/76554 describe oligómeros conjugados con ligandos donde el ligando se puede unir por medio de un grupo conector opcional.

60

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la administración dirigida de oligonucleótidos altamente eficaz se logra mediante el uso de un dispositivo localizador unida al oligonucleótido por medio de una región corta de nucleósidos lábiles a nucleasas, tales como nucleósidos de ADN o ARN enlazados por fosfodiéster.

65

Sumario de la invención

La invención proporciona un compuesto oligomérico de 8-35 nucleótidos de longitud que comprende tres regiones:

- 5 i) una primera región (región A), que comprende 7-26 nucleótidos contiguos complementarios de una diana de ácido nucleico, que puede modular, en el que la primera región comprende al menos cuatro análogos nucleosídicos seleccionados de análogos nucleosídicos bicíclicos (por ejemplo, LNA) y/o análogos nucleosídicos sustituidos en 2' y en el que los enlaces internucleosídicos de la primera región son en un 100 % distintos de fosfodiéster;
- 10 ii) una segunda región (región B) unida covalentemente al nucleótido 5' o 3' de la primera región por medio de un enlace fosfodiéster, en el que la región B consiste en al menos dos, tales como al menos tres unidades consecutivas de ADN y/o ARN que están unidas por enlaces fosfodiéster;
- 15 iii) una tercera región (C) que comprende un resto de conjugado o un resto de direccionamiento, en el que la tercera región está unida covalentemente a la segunda región.

En algunos modos de realización, la región A y la región B forman una única secuencia de nucleótidos contiguos de 8-35 nucleótidos de longitud.

- 20 En algunos aspectos, el enlace internucleosídico entre la primera y segunda región se puede considerar parte de la segunda región.

En algunos modos de realización, hay un grupo de enlace que contiene fósforo entre la segunda y la tercera región. El grupo de enlace de fósforo, puede ser, por ejemplo, un fosfato (fosfodiéster), un fosforotioato, un fosforoditioato o un grupo boranofosfato.

25

En algunos modos de realización, este grupo de enlace que contiene fósforo se sitúa entre la segunda región y una región de conector que se une a la tercera región. En algunos modos de realización, el grupo fosfato es un fosfodiéster.

- 30 En algunos modos de realización, los enlaces internucleosídicos distintos del fosfodiéster se seleccionan (opcionalmente independientemente) del grupo que consiste en fosforotioato, fosforoditioato y boranofosfato, y metilfosfonato, tal como fosforotioato. En algunos modos de realización, la región A comprende al menos un enlace de fosforotioato. En algunos modos de realización, al menos un 50 %, tal como al menos un 75 %, tal como al menos un 90 % de los enlaces internucleosídicos, tales como todos los enlaces internucleosídicos dentro de la región A son enlaces de fosforotioato.
- 35

En algunos modos de realización, la región B puede formar parte de una secuencia de nucleobases contiguas que es complementaria de la diana (ácido nucleico). En otros modos de realización, la región B puede carecer de complementariedad con la diana.

- 40 Dicho de forma alternativa, en algunos modos de realización, la invención proporciona un oligonucleótido no unido a fosfodiéster, tal como unido a fosforotioato (por ejemplo, un oligonucleótido de antisentido), que tiene al menos dos nucleósidos de ADN o ARN terminales (5' y/o 3') unidos al nucleósido adyacente del oligonucleótido por medio de un enlace de fosfodiéster, en el que el nucleósido de ADN o ARN terminal está unido además de manera covalente a un resto de conjugado, un resto de direccionamiento o un resto de bloqueo, opcionalmente por medio de un resto de conector.
- 45

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto oligomérico de la invención y un diluyente, vehículo, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

- 50 La invención proporciona el compuesto oligomérico de acuerdo con la invención para su uso en la inhibición de una diana de ácido nucleico en una célula. En algunos modos de realización, el uso es *in vitro*. En algunos modos de realización, el uso es *in vivo*.

- 55 La invención proporciona el compuesto oligomérico de la invención para su uso en medicina, tal como para su uso como medicamento.

La invención proporciona el compuesto oligomérico de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico.

- 60 La invención proporciona el uso del compuesto oligomérico de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad o trastorno metabólico.

- 65 La solicitud describe un procedimiento de síntesis (o fabricación) de un compuesto oligomérico, tal como el compuesto oligomérico de la invención, comprendiendo dicho procedimiento:

a) una etapa de proporcionar un soporte de síntesis de oligonucleótidos [fase sólida] al que se une uno de los siguientes [tercera región]:

5 i) opcionalmente un grupo conector (-Y-)

ii) un grupo X que comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo, un grupo reactivo [por ejemplo, una amina o un alcohol] o un grupo de activación (X-), o un grupo -Y -X

10 y

b) una etapa de síntesis de oligonucleótidos [secuencial] de la región B seguida de la región A, y/o:

15 c) una etapa de síntesis de oligonucleótidos [secuencial] de una primera región (A) y una segunda región (B), en la que la etapa de síntesis está seguida de

d) una etapa de añadir una tercera región [que comprende fosforamidita]

20 i) opcionalmente un grupo conector (-Y-)

ii) un grupo X que comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo, un grupo reactivo [por ejemplo, una amina o un alcohol] o un grupo de activación (X-), u opcionalmente un grupo -Y -X

25 seguido de

e) la escisión del compuesto oligomérico del soporte [fase sólida]

30 en el que, opcionalmente, dicho procedimiento comprende además otra etapa seleccionada de:

f) en el que el tercer grupo es un grupo de activación, la etapa de activar el grupo de activación para producir un grupo reactivo, seguida de la adición de un conjugado, un grupo de bloqueo o un grupo de direccionamiento al grupo reactivo, opcionalmente por medio de un grupo conector (Y);

35 g) en el que la tercera región es un grupo reactivo, la etapa de añadir un conjugado, un grupo de bloqueo o un grupo de direccionamiento al grupo reactivo, opcionalmente por medio de un grupo conector (Y).

40 h) en el que la tercera región es un grupo conector (Y), la etapa de añadir un conjugado, un grupo de bloqueo o un grupo de direccionamiento al grupo conector (Y)

45 en el que las etapas f), g) o h) se realizan antes o después de la escisión del compuesto oligomérico del soporte de síntesis de oligonucleótidos. En algunos modos de realización, el procedimiento se puede realizar usando la química estándar de fosforamidita, y como tal, la región X y/o la región X o la región X e Y se pueden proporcionar, antes de la incorporación en el oligómero, como una fosforamidita. Véanse las figuras 5-10 que ilustran aspectos no limitantes del procedimiento de la invención.

50 La solicitud describe un procedimiento para sintetizar (o fabricar) un compuesto oligomérico, tal como el compuesto oligomérico de la invención, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de síntesis de oligonucleótidos [secuencial] de una primera región (A) y opcionalmente una segunda región (B), en el que la etapa de síntesis está seguida de una etapa de añadir una tercera región, una región X [que comprende fosforamidita] (también denominada región C), o Y, tal como una región que comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo, un grupo funcional, un grupo reactivo [por ejemplo, una amina o un alcohol] o un grupo de activación (X), o un grupo -Y -X seguido de la escisión del compuesto oligomérico del soporte [fase sólida].

55 Sin embargo, se reconoce que la región X o X-Y se puede añadir después de la escisión del soporte sólido. De forma alternativa, el procedimiento de síntesis puede comprender las etapas de sintetizar una primera (A), y opcionalmente una segunda región (B), seguido de la escisión del oligómero del soporte, con una etapa posterior de añadir una tercera región, tal como un grupo X o X-Y al oligómero. La adición de la tercera región se puede lograr, por ejemplo, añadiendo una unidad de aminofosforamidita en la etapa final de la síntesis de oligómeros (en el soporte) que, después de la escisión del soporte, se puede usar para unirla al grupo X o X-Y, opcionalmente por medio de un grupo de activación en el grupo X o Y (cuando esté presente). En los modos de realización donde el conector escindible no es una región nucleotídica, la región B puede ser un conector escindible no nucleotídico, por ejemplo, un conector peptídico, que puede formar parte de la región X (también denominada región C) o ser la región Y (o parte de la misma).

60

65

En algunos modos de realización del procedimiento, la región X (tal como C) o (X-Y), tal como el conjugado (por ejemplo, un conjugado con GalNAc), comprende un grupo de activación (un grupo funcional activado) y, en el procedimiento de síntesis del conjugado activado (o la región x, o X-Y) se añade a la primera y segunda regiones, tal como un oligómero con enlace amino. El grupo amino se puede añadir al oligómero mediante la química estándar de fosforamidita, por ejemplo, como la etapa final de la síntesis del oligómero (lo que típicamente dará como resultado un grupo amino en el extremo 5' del oligómero). Por ejemplo, durante la última etapa de la síntesis de oligonucleótidos, se usa una aminoalquil fosforamidita protegida, por ejemplo, una TFA-aminoC6 fosforamidita (6-(trifluoroacetilamino)-hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita). La región X (o región C como se denomina en el presente documento), tal como el conjugado (por ejemplo, un conjugado con GalNAc) se puede activar mediante el procedimiento del éster NHS y, a continuación, se añade el oligómero con enlace amino. Por ejemplo, se puede usar una N-hidroxisuccinimida (NHS) como grupo de activación para la región X (o región C, tal como un conjugado, tal como un resto de conjugado con GalNAc). La invención proporciona un oligómero preparado por el procedimiento de la invención.

En algunos modos de realización, la región X y/o la región X o la región X e Y se pueden unir covalentemente (enlazar) a la región B por medio de un enlace nucleosídico de fosfato, tales como los descritos en el presente documento, incluyendo fosfodiéster o fosforotioato, o por medio de un grupo alternativo, tal como un grupo triazol.

La invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto que necesita tratamiento, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de administrar una composición farmacéutica que comprende el compuesto oligomérico de la invención a dicho sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La invención proporciona un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar el compuesto oligomérico de acuerdo con la invención a una célula que está expresando dicho gen diana, adecuadamente en una cantidad eficaz para reducir la expresión del gen diana en dicha célula. En algunos modos de realización, el procedimiento es *in vitro* (es decir, no en un organismo, pero puede estar en una célula o tejido (por ejemplo, *ex vivo*)). En algunos modos de realización, el procedimiento es *in vivo*.

La invención también proporciona un oligómero de LNA, que comprende una región contigua de 8-24 nucleósidos unidos a fosforotioato, y que comprende además entre 2 y 6 nucleósidos de ADN que son contiguos con el oligómero de LNA, en el que los enlaces internucleosídicos entre el ADN, y/o adyacentes al (a los) nucleósido(s) de ADN, son fisiológicamente lábiles, tales como son los enlaces fosfodiéster. Dicho oligómero de LNA puede estar en forma de un conjugado, como se describe en el presente documento, o puede ser, por ejemplo, un intermedio que se va a usar en una etapa de conjugación posterior. Cuando está conjugado, el conjugado puede, por ejemplo, ser o comprender un esteroide, tal como colesterol o tocoferol, o puede ser o comprender un hidrato de carbono (no nucleotídico), tal como un conjugado con GalNAc, tal como un complejo con GalNAc, por ejemplo, triGalNAc, u otro conjugado como se describe en el presente documento.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto oligomérico de LNA de la invención y un diluyente, vehículo, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona el compuesto oligomérico de acuerdo con la invención para su uso en la inhibición de una diana de ácido nucleico en una célula. En algunos modos de realización, el uso es *in vitro*. En algunos modos de realización, el uso es *in vivo*.

La invención proporciona el compuesto oligomérico de la invención para su uso en medicina, tal como para su uso como medicamento.

La invención proporciona el compuesto oligomérico de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico.

La invención proporciona el uso del compuesto oligomérico de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad o trastorno metabólico.

55 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ilustración no limitante de oligómeros de la invención unidos a un grupo de activación (es decir, un grupo reactivo protegido, como la tercera región). El enlace internucleosídico L puede ser, por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, tal como fosfodiéster. PO es un enlace fosfodiéster. El compuesto a) tiene una región B con un solo ADN o ARN, el enlace entre la segunda y la primera región es PO. El compuesto b) tiene dos nucleósidos de ADN/ARN (tal como ADN) unidos por un enlace fosfodiéster. El compuesto c) tiene tres nucleósidos de ADN/ARN (tal como ADN) unidos por enlaces fosfodiéster. En algunos modos de realización, la región B se puede extender además mediante ADN/ARN con fosfodiéster adicional (tal como nucleósidos de ADN). El grupo de activación se ilustra en el lado izquierdo de cada compuesto, y, opcionalmente, se puede unir al nucleósido terminal de la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o en algunos modos de realización un enlace triazol. Los compuestos

d), e) y f) comprenden además un conector (Y) entre la región B y el grupo de activación, y la región Y se puede unir a la región B por medio de, por ejemplo, un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o en algunos modos de realización un enlace triazol.

5 **Figura 2:** Compuestos equivalentes como se muestra en la figura 1; sin embargo, se usa un grupo reactivo en lugar del grupo de activación. El grupo reactivo, en algunos modos de realización, puede ser el resultado de la activación del grupo de activación (por ejemplo, la desprotección). El grupo reactivo, en ejemplos no limitantes, puede ser una amina o un alcohol.

10 **Figura 3:** Ilustración no limitante de compuestos de la invención. La misma nomenclatura que en la figura 1. X en algunos modos de realización puede ser un conjugado, tal como un conjugado lipófilo tal como colesterol, u otro conjugado tal como los descritos en el presente documento. Además, o de forma alternativa, X puede ser un grupo de direccionamiento o un grupo de bloqueo. En algunos aspectos, X puede ser un grupo de activación (véase la figura 1) o un grupo reactivo (véase la figura 2). X se puede unir covalentemente a la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o se puede unir por medio de un enlace alternativo, por ejemplo, un enlace triazol (véase L en los compuestos d), e) y f)).

20 **Figura 4.** Ilustración no limitante de compuestos de la invención, donde los compuestos comprenden el conector opcional entre la tercera región (X) y la segunda región (región B). La misma nomenclatura que en la figura 1. En el presente documento se divulgan conectores adecuados e incluyen, por ejemplo, conectores de alquilo, por ejemplo, conectores de C6. En los compuestos A, B y C, el conector entre X y la región B se une a la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o se puede unir por medio de un enlace alternativo, por ejemplo, un enlace triazol (Li). En estos compuestos, Lii representa el enlace internucleosídico entre las regiones primera (A) y segunda (B).

25 **Figura 5a y b.** 5b muestra un ejemplo no limitante de un procedimiento de síntesis de compuestos de la invención. US representa un soporte de síntesis de oligonucleótidos, que puede ser un soporte sólido. X es la tercera región, tal como un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo, etc. En una etapa previa opcional, se añade X al soporte de síntesis de oligonucleótidos. De otro modo se podrá obtener el soporte con X ya unido (i). En una primera etapa, se sintetiza la región B (ii), seguida de la región A (iii) y, posteriormente, la escisión del compuesto oligomérico de la invención del soporte de síntesis de oligonucleótidos (iv). En un procedimiento alternativo, la etapa previa implica proporcionar un soporte de síntesis de oligonucleótidos con una región X y un grupo conector (Y) unidos (véase la figura 5a). En algunos modos de realización, X o Y (si está presente) se une a la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o un enlace alternativo, tal como un enlace triazol.

30 **Figura 6.** Un ejemplo no limitante de un procedimiento de síntesis de compuestos de la invención que comprende un conector (Y) entre la tercera región (X) y la segunda región (B). US representa un soporte de síntesis de oligonucleótidos, que puede ser un soporte sólido. X es la tercera región, tal como un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo, etc. En una etapa previa opcional, se añade Y al soporte de síntesis de oligonucleótidos. De otro modo se podrá obtener el soporte con Y ya unido (i). En una primera etapa, se sintetiza la región B (ii), seguida de la región A (iii) y, posteriormente, la escisión del compuesto oligomérico de la invención del soporte de síntesis de oligonucleótidos (iv). En algunos modos de realización (como se muestra), la región X se puede añadir al conector (Y) después de la etapa de escisión (v). En algunos modos de realización, Y se une a la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o un enlace alternativo, tal como un enlace triazol.

35 **Figura 7.** Un ejemplo no limitante de un procedimiento de síntesis de compuestos de la invención que utiliza un grupo de activación. En una etapa previa opcional, el grupo de activación se une al soporte de síntesis de oligonucleótidos (i), o el soporte de síntesis de oligonucleótidos con el grupo de activación se obtiene de otro modo. En la etapa ii) se sintetiza la región B, seguida de la región A (iii). El oligómero se escinde a continuación del soporte de síntesis de oligonucleótidos (iv). El oligómero intermedio (que comprende un grupo de activación) se puede activar a continuación (vi) o (viii) y añadir una tercera región (X) (vi), opcionalmente por medio de un conector (Y) (ix). En algunos modos de realización, X (o Y cuando está presente) se une a la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o un enlace alternativo, tal como un enlace triazol.

40 **Figura 8.** Un ejemplo no limitante de un procedimiento de síntesis de compuestos de la invención, en el que se usa un soporte de síntesis de oligonucleótidos bifuncionales (i). En dicho procedimiento, el oligonucleótido se sintetiza en una serie inicial de etapas (ii)-(iii), seguido de la unión de la tercera región (opcionalmente por medio de un grupo conector Y), el compuesto oligomérico de la invención se puede escindir a continuación (v). De forma alternativa, como se muestra en las etapas (vi)-(ix), la tercera región (opcionalmente con un grupo conector (Y) se une al soporte de síntesis de oligonucleótidos (esta puede ser una etapa previa opcional), o un soporte de síntesis de oligonucleótidos con la tercera región (opcionalmente con Y) se proporciona de otro modo; el oligonucleótido se sintetiza a continuación (vii-viii). El compuesto oligomérico de la invención se puede escindir a continuación (ix). En algunos modos de

realización, X (o Y cuando está presente) se une a la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o un enlace alternativo, tal como un enlace triazol. El US, en algún modo de realización, antes del procedimiento (tal como la etapa previa), puede comprender una etapa de añadir un grupo bidireccional (bifuncional) que permita la síntesis independiente del oligonucleótido y la unión covalente del grupo X, Y (o X e Y) al soporte (como se muestra); esto se puede lograr, por ejemplo, usando un triazol o un grupo de nucleósidos. El grupo bidireccional (bifuncional), con el oligómero unido, se puede escindir a continuación del soporte.

Figura 9. Un ejemplo no limitante de un procedimiento de síntesis de compuestos de la invención: En una etapa inicial, se sintetiza (ii) la primera región (A), seguida de la región B. En algunos modos de realización, la tercera región se une a continuación a la región B (iii), opcionalmente por medio de un enlace nucleosídico de fosfato (o, por ejemplo, un enlace triazol). El compuesto oligomérico de la invención se puede escindir a continuación (iv). Cuando se usa un conector (Y), en algunos modos de realización se pueden seguir las etapas (v)-(viii): después de la síntesis de la región B, se añade el grupo conector (Y) y, a continuación, se une a (Y) o, en una etapa posterior, se añade la región X (vi). El compuesto oligomérico de la invención se puede escindir a continuación (vii). En algunos modos de realización, X (o Y cuando está presente) se une a la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o un enlace alternativo, tal como un enlace triazol.

Figura 10. Un ejemplo no limitante de un procedimiento de síntesis de compuestos de la invención: En este procedimiento se usa un grupo de activación: Las etapas (i)-(iii) son como en la figura 9. Sin embargo, después de la síntesis de oligonucleótidos (etapa iii), se añade un grupo de activación (o un grupo reactivo) a la región B, opcionalmente por medio de un enlace nucleosídico de fosfato. El oligonucleótido se escinde a continuación del soporte (v). El grupo de activación se puede activar posteriormente para producir un grupo reactivo, y, a continuación, la tercera región (X), tal como el conjugado, el grupo de bloqueo o el grupo de direccionamiento, se añade al grupo reactivo (que puede ser el grupo de activación activado o el grupo reactivo), para producir el oligómero (vi). Como se muestra en (vii)-(viii), después de la escisión, se añade un grupo conector (Y) (vii), y, a continuación, se une a (Y) o, en una etapa posterior, se añade la región X para producir el oligómero (viii). Se debe reconocer que, en una alternativa, todas las etapas (ii)-(viii) se pueden realizar en el soporte de síntesis de oligonucleótidos y, en dichos casos, se puede realizar una etapa final de escisión del oligómero del soporte. En algunos modos de realización, el grupo reactivo o grupo de activación se une a la región B por medio de un grupo de enlace nucleosídico de fósforo, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o un enlace alternativo, tal como un enlace triazol.

Figura 11. Silenciamiento del ARNm de ApoB con conjugados con colesterol *in vivo*. Se inyectó a ratones una dosis única de 1 mg/kg de oligonucleótido de antisentido de LNA no conjugado (n.º 3833) o cantidades equimolares de oligonucleótidos de antisentido de LNA conjugados con colesterol con diferentes conectores (Tab. 3) y se sacrificaron en los días 1, 3, 7 y 10 después de la administración. Se aisló ARN del hígado y el riñón y se sometió a RT-qPCR A específica para ApoB. La cuantificación del ARNm de ApoB de las muestras de hígado se normalizó para GAPDH y se mostró como un porcentaje del promedio de los controles salinos equivalentes B. La cuantificación del ARNm de ApoB de las muestras de riñón se normalizó para GAPDH y se mostró como porcentaje del promedio de controles salinos equivalentes.

Figura 12. Muestra el conjugado con colesterol C6 que se puede usar como X-Y- en compuestos de la invención, así como compuestos específicos usados en los ejemplos, incluyen compuestos específicos de la invención.

Figura 13. Ejemplos de conjugados con colesterol, GalNac trivalente, FAM, ácido fólico, GalNac monovalente y tocoferol usados en los experimentos (por ejemplo, compuestos de la figura 12).

Figura 14. Silenciamiento del ARNm de ApoB con conjugados con colesterol *in vivo*. Se inyectó a ratones una dosis única de 1 mg/kg de oligonucleótido de antisentido de LNA no conjugado (n.º 3833) o cantidades equimolares de oligonucleótidos de antisentido de LNA conjugados con colesterol con diferentes conectores (Tab. 3) y se sacrificaron en los días 1, 3, 7, 10, 13 y 16 después de la administración. Se aisló ARN del hígado y el riñón y se sometió a RT-qPCR A específica para ApoB. La cuantificación del ARNm de ApoB de las muestras de hígado se normalizó para GAPDH y se mostró como un porcentaje del promedio de los controles salinos equivalentes B. La cuantificación del ARNm de ApoB de las muestras de riñón se normalizó para GAPDH y se mostró como porcentaje del promedio de controles salinos equivalentes.

Figura 15. Contenido del oligonucleótido de LNA específico en hígado y riñón *in vivo*. Se inyectó a ratones una dosis única de 1 mg/kg de oligonucleótido de antisentido de LNA no conjugado (n.º 1) o cantidades equimolares de oligonucleótidos de antisentido de LNA conjugados con colesterol con diferentes conectores (Tab. 4) y se sacrificaron en los días 1, 3, 7, 10, 13 y 16 después de la administración. El contenido de oligonucleótidos de LNA se midió usando el procedimiento ELISA de tipo sándwich basado en LNA.

Figura 16. Silenciamiento del ARNm de PCSK9 con conjugados con colesterol *in vivo*. Se inyectó a ratones una dosis única de 10 mg/kg de oligonucleótido de antisentido de LNA no conjugado (n.º 7) o cantidades equimolares de

oligonucleótidos de antisentido de LNA conjugados con colesterol con diferentes conectores (Tab. 5) y se sacrificaron en los días 1, 3, 7 y 10 después de la administración. Se aisló ARN del hígado y el riñón y se sometió a RT-qPCR A específica para PCSK9. La cuantificación del ARNm de PCSK9 de las muestras de hígado se normalizó para BACT y se mostró como un porcentaje del promedio de los controles salinos equivalentes B. La cuantificación del ARNm de PCSK9 de las muestras de riñón se normalizó para BACT y se mostró como porcentaje del promedio de controles salinos equivalentes.

Figura 17. Ejemplos de conjugados con tri-GalNac que se pueden usar. Los conjugados 1-4 ilustran 4 restos de conjugado con GalNac adecuados, y los conjugados 1a-4a se refieren a los mismos conjugados con un resto de conector adicional (Y) que se usa para unir el conjugado con el oligómero (región A o un conector bioescindible, tal como la región B). La línea ondulada representa la unión covalente al oligómero. También se muestran ejemplos de restos de conjugados con colesterol y tocoferol (5a y 6a). La línea ondulada representa la unión covalente al oligómero.

Figura 18: Ejemplo 7a: Niveles de proteína sérica FVII

Figura 19: Ejemplo 7a: Niveles de ARNm de FVII en el hígado el día 4

Figura 20: Ejemplo 7a: Contenido de oligonucleótidos en el hígado y el riñón el día 4

Figura 21: Ejemplo 7b - niveles de proteína sérica FVII

Figura 22: Niveles de ARNm de FVII en el hígado el día 24

Figura 23: Contenido de oligonucleótidos en el hígado y el riñón el día 4.

Figura 24. Silenciamiento *in vivo* de ARNm de ApoB con diferentes conjugados y conector de PO.

Se trataron ratones con 1 mg/kg de ASO con diferentes conjugados, bien sin conector bioescindible, con conector de diitio (SS) o con conector de ADN/PO (PO). Se aisló ARN de muestras de hígado (A) y riñón (B) y se analizó para la atenuación del ARNm de ApoB. Los datos se muestran en comparación con solución salina (= 1).

Figura 25. Silenciamiento *in vitro* del ARNm de la diana X con ASO de LNA en bucle con un conector de PO.

Se trataron células Neuro 2a con ASO de LNA en bucle con o sin conector de PO, respectivamente. Después de 6 días, se extrajo ARNm mediante gimnosis y se analizó para determinar la atenuación del ARNm de la diana X. La expresión de ARNm se muestra como porcentaje de muestras tratadas de forma simulada.

Descripción de la invención

La invención se refiere a compuestos oligoméricos, tales como oligonucleótidos de antisentido, que se unen covalentemente a un grupo de conjugado o un grupo de direccionamiento por medio de una región corta que comprende al menos 2 nucleósidos de ADN o ARN unidos a fosfodiéster.

El oligómero

La presente invención emplea compuestos oligoméricos (también denominados en el presente documento oligómeros) para su uso en la modulación, tal como la inhibición de un ácido nucleico diana en una célula. Los oligómeros pueden tener una longitud de 8-35 nucleótidos contiguos y comprender una primera región de 7-25 nucleótidos contiguos, y una segunda región de al menos dos nucleótidos de ADN o ARN unidos a fosfodiéster contiguos, en los que el enlace internucleosídico entre la primera y la segunda región es un fosfodiéster unido al primer nucleósido de ADN o ARN de la segunda región.

La segunda región, en algunos modos de realización, puede comprender además nucleósidos de ADN o ARN que se pueden unir por fosfodiéster. La segunda región se une además covalentemente a una tercera región que puede ser, por ejemplo, un conjugado y/o un grupo de direccionamiento.

En algunos aspectos, la presente invención se basa en proporcionar una región lábil, la segunda región, que une la primera región, por ejemplo, un oligonucleótido de antisentido, y un conjugado o un grupo funcional, por ejemplo, un grupo de direccionamiento o de bloqueo. La región lábil comprende al menos dos nucleósidos unidos a fosfodiéster, tales como un nucleósido de ADN o ARN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleósidos unidos a fosfodiéster, tales como ADN o ARN. En algunos modos de realización, el compuesto oligomérico comprende un conector escindible (lábil). A este respecto, el conector escindible está presente preferentemente en la región B (o en algunos modos de realización, entre la región A y B).

El término "oligómero" en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula formada por un enlace covalente de dos o más nucleótidos (es decir, un oligonucleótido). En el presente documento, un solo nucleótido

(unidad) también se puede denominar monómero o unidad. En algunos modos de realización, los términos "nucleósido", "nucleótido", "unidad" y "monómero" se usan de manera intercambiable. Se reconocerá que, cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos o monómeros, se hace referencia a la secuencia de bases, tales como A, T, G, C o U.

5 El oligómero consiste en o comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de 8-25, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 nucleótidos de longitud, como 10-20 nucleótidos de longitud.

10 En diversos modos de realización, el compuesto de la invención no comprende ARN (unidades). En algunos modos de realización, el compuesto de acuerdo con la invención, la primera región, o la primera y segunda regiones juntas (por ejemplo, como una única secuencia contigua), es una molécula lineal o se sintetiza como una molécula lineal. El oligómero puede ser, por lo tanto, una molécula monocatenaria. En algunos modos de realización, el oligómero no comprende regiones cortas de, por ejemplo, al menos 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos, que son complementarios de regiones equivalentes dentro del mismo oligómero (es decir, doble hebra). El oligómero, en algunos modos de realización, puede no ser (esencialmente) bicatenario. En algunos modos de realización, el oligómero es esencialmente no bicatenario, tal como no es un ARNip.

15 En algunos modos de realización, el oligómero puede comprender una primera región que no comprende regiones cortas de, por ejemplo, al menos 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos, que son complementarios de regiones dentro de la misma primera región (es decir, doble hebra dentro de la región). A este respecto, el primer oligómero, en algunos modos de realización, puede no formar una hibridación con una hebra complementaria no unida covalentemente, por ejemplo, no forma parte de un ARNip.

20 Por ejemplo, en algunos modos de realización, el compuesto oligomérico sí comprende una región de complementariedad, por ejemplo, cuando la primera región forma parte de un ARNip o, por ejemplo, cuando la tercera región comprende un aptámero o un oligonucleótido de bloqueo, el compuesto oligomérico de la invención, en algunos modos de realización, puede comprender regiones de ácido nucleico bicatenario. En dichos modos de realización, las regiones de ácido nucleico bicatenario, por ejemplo que forman una doble hebra de al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6 nucleótidos de longitud, pueden estar dentro de la tercera región, o entre la tercera región y, por ejemplo, la primera región, o en algunos modos de realización, la segunda región, o una región a través de la primera y segunda región (por ejemplo, cuando la tercera región comprende una región de bloqueo de oligonucleótidos).

25 En algunos modos de realización, el compuesto oligomérico no está en forma de una doble hebra con un oligonucleótido (sustancialmente) complementario, por ejemplo, no es un ARNip.

30 En algunos modos de realización, el compuesto oligomérico es un oligómero de LNA, por ejemplo, un oligómero de antisentido de LNA, (que se puede denominar región A en el presente documento) que comprende un oligómero de antisentido, la región B como se define en el presente documento, y un conjugado con un hidrato de carbono (que se puede denominar región C). El oligómero de antisentido de LNA puede tener una longitud de 7-30, tal como de 8-26 nucleósidos de longitud y comprende al menos una unidad de LNA (nucleósido). En algunos modos de realización, el resto glucídico no es un polímero glucídico lineal.

35 En algunos modos de realización, el compuesto oligomérico es un oligómero de LNA, por ejemplo, un oligómero de antisentido de LNA, (que se puede denominar región A en el presente documento) que comprende un oligómero de antisentido, la región B como se define en el presente documento, y un resto de conjugado de un resto de direccionamiento al receptor de asialoglucoproteína tal como un resto de GalNAc (que se puede denominar región C). El resto glucídico puede ser multivalente, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4 o 4 restos glucídicos idénticos o no idénticos se pueden unir covalentemente al oligómero, opcionalmente por medio de un conector o conectores (tal como la región Y).

La primera región

40 En algunos modos de realización, la primera región puede comprender un oligómero basado en ácido nucleico, tal como un oligonucleótido de antisentido. En algunos modos de realización, la primera región comprende o consiste en un oligonucleótido unido a fosforotioato, tal como un oligonucleótido de antisentido, de 7-25 nucleótidos de longitud. La primera región puede comprender al menos un nucleósido modificado (un análogo nucleosídico), tal como al menos un nucleósido bicíclico (por ejemplo, LNA) o un nucleósido sustituido en 2'. En algunos modos de realización, algunos o todos los nucleósidos de la primera región pueden ser nucleósidos modificados, también denominados análogos nucleosídicos en el presente documento. En algunos modos de realización, los nucleósidos modificados están modificados con glúcidos (por ejemplo, comprenden un resto glucídico o sustituto de un glúcido distinto de ribosa o desoxirribosa).

45 En algunos modos de realización, la primera región es un oligómero de antisentido (oligonucleótido de antisentido), tal como un oligómero monocatenario que comprende una secuencia que es complementaria de una diana de ácido nucleico.

En algunos modos de realización, la primera región comprende o es un gápmero. En algunos modos de realización, la primera región comprende o es un míxmero. En algunos modos de realización, la primera región comprende o es un totálmero.

5 En algunos modos de realización, la primera región comprende al menos uno, tal como al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o 25 análogos nucleosídicos. En algunos modos de realización, los
10 análogos nucleosídicos son (opcionalmente seleccionados independientemente del grupo que consiste en análogos nucleosídicos bicíclicos (tales como LNA), y/o análogo nucleosídico sustituidos en 2', tales como (opcionalmente independientemente) seleccionados del grupo que consiste en unidades de 2'-O-alkuil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, 2'-AP, 2'-FANA, 2'-(3-hidroxi)propilo, y unidades de 2'-fluoro-ADN, y/u otros
15 (opcionalmente) análogos nucleosídicos modificados con glúcidos tales como morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA), CeNA, ácido nucleico no unido (UNA), ácido hexitol nucleico (HNA), biciclo-HNA (véase, por ejemplo, el documento WO2009/100320). En algunos modos de realización, los análogos nucleosídicos aumentan la afinidad de la primera región por su ácido nucleico diana (o una secuencia de ADN o ARN complementaria). Diversos análogos nucleosídicos se divulgan en Freier y Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213e.

20 En algunos modos de realización, el oligómero, tal como la primera región del mismo, tal como el gápmero, míxmero o totálmero, comprende al menos un análogo nucleotídico bicíclico, tal como LNA. En algunos modos de realización, la primera región comprende al menos un análogo nucleosídico bicíclico (por ejemplo, LNA) y/o análogos nucleosídicos sustituidos en 2'. En algunos modos de realización, los análogos nucleosídicos presentes en la primera
25 región comprenden, todos, la misma modificación glucídica. En algunos modos de realización, al menos un análogo nucleosídico presente en la primera región es un análogo nucleosídico bicíclico, tal como al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, por ejemplo, todos los análogos nucleosídicos (o, en un totálmero, todos los nucleósidos) análogos nucleosídicos bicíclicos, tales como LNA, por ejemplo, beta-DX-LNA o alfa-LX-LNA
30 (en el que X es oxi, amino o tio), u otros LNA divulgados en el presente documento, incluyendo, pero no limitado a, (R/S) cET, cMOE o 5'-Me-LNA. En algunos modos de realización, el oligómero, o la primera región del mismo, comprende análogos nucleosídicos modificados con glúcidos y de ADN, tales como análogos nucleosídicos bicíclicos y/o análogos nucleosídicos sustituidos en 2'. En algunos modos de realización, el oligómero, o la primera región del mismo, comprende análogos nucleosídicos de ADN y LNA.

35 El documento WO05013901, el documento WO07/027775, el documento WO07027894 se refieren a oligómeros sustituidos completamente en 2', tales como 2'-O-MOE completamente. En algunos modos de realización, la primera región del oligómero puede estar compuesta por nucleósidos sustituidos en 2'. El documento WO07/027775 también se refiere a míxmicos de MOE, LNA, ADN para uso en microARN de direccionamiento.

40 En algunos modos de realización, la primera región, o la primera y segunda región se combinan para no comprender una región de más de 4 o 5 unidades de ADN consecutivas. Dichas primeras regiones pueden ser (esencialmente) incapaces de reclutar RNasa H.

45 La primera región se une covalentemente a la segunda región, tal como por medio de un enlace internucleosídico 5' terminal o 3' terminal, tal como un enlace fosfodiéster. Por lo tanto, el enlace fosfodiéster se puede situar entre el nucleósido más en 5' de la región A y el nucleósido más en 3' de la región B, y/o entre el nucleósido más en 3' de la región A y el nucleósido más en 5' de la región B. A este respecto, en algunos modos de realización, puede haber dos regiones B unidas covalentemente a la región A, una en el extremo 5' de la región A y otra en el extremo 3' de la
50 región A. Las dos regiones B pueden ser iguales o diferentes, y se pueden unir covalentemente a la misma o a una tercera región diferente, opcional e independientemente por medio de un conector (Y).

55 En algunos modos de realización, algunos o la totalidad de los nucleósidos de la primera región pueden ser nucleósidos modificados, también denominados análogos nucleosídicos en el presente documento, tales como análogos nucleosídicos modificados con glúcidos, por ejemplo, análogos nucleosídicos bicíclicos (por ejemplo, LNA) y/o análogos nucleosídicos sustituidos en 2'. En algunos modos de realización, los análogos nucleosídicos presentes en la primera región comprenden todos la misma modificación glucídica, por ejemplo, son todos análogos nucleosídicos bicíclicos, tales como LNA, por ejemplo, beta-DX-LNA o alfa-LX-LNA (en el que X es oxi, amino o tio), u otros LNA divulgados en el presente documento, incluyendo, pero no limitados a, (R/S) cET, cMOE o 5'-Me-LNA.

60 En algunos modos de realización, los enlaces internucleosídicos de la primera región comprenden al menos un enlace internucleosídico distinto de fosfodiéster, tal como al menos uno, tal como al menos un 50 %, tal como al menos un 75 %, tal como al menos un 90 %, tal como un 100 % de los enlaces internucleosídicos en la región A son distintos de fosfodiéster. En algunos modos de realización, los enlaces internucleosídicos distintos de fosfodiéster son enlaces internucleosídicos que contienen azufre, tales como fosforotioato, fosforoditioato y boranofosfato, tal como fosforotioato.

65

La segunda región (región B)

5 La segunda región puede comprender o consiste en al menos dos nucleósidos de ADN o ARN unidos a la primera región por medio de un enlace fosfodiéster. En algunos aspectos, el enlace internucleosídico entre la primera y la segunda región se considera parte de la región B.

10 En algunos modos de realización, la segunda región comprende o consiste en al menos entre 2 y 10 nucleósidos unidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de ADN o ARN unidos. Aunque una región de fosfodiéster de ADN/ARN se considera importante para proporcionar un conector escindible, es posible que la región B también comprenda análogos nucleosídicos modificados con glúcidos, como los mencionados en la primera región anterior. Sin embargo, en algunos modos de realización, los nucleósidos de la región B se seleccionan (opcionalmente independientemente) del grupo que consiste en ADN y ARN. Se reconocerá que los nucleósidos de la región B pueden comprender nucleobases naturales o no naturales. La región B comprende al menos un nucleósido de ADN o ARN unido a fosfodiéster (que, en algunos modos de realización, puede ser el primer nucleósido adyacente a la región A). Si la región B comprende otros nucleósidos, la región B también puede comprender otros enlaces nucleosídicos distintos de fosfodiéster, tales como (opcionalmente independientemente) fosforotioato, fosfoditioato, boranofosfato o metilfosfonato. Sin embargo, en otros modos de realización, todos los enlaces internucleosídicos en la región B son fosforotioato. En algunos modos de realización, todos los nucleósidos de la región B comprenden (opcionalmente independientemente) un glúcido 2'-OH ribosa (ARN) o un glúcido 2'-H, es decir, ARN o ADN.

25 En algunos modos de realización, la segunda región comprende o consiste en al menos entre 2 y 10 nucleósidos de ADN o de ARN unidos (por ejemplo, por fosfodiéster), tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de ADN o ARN unidos (por ejemplo, por fosfodiéster).

30 En algunos modos de realización, la región B comprende no más de 3 o no más de 4 nucleósidos de ADN o ARN consecutivos (tales como nucleósidos de ADN). Como tal, la región B puede ser tan corta que no recluta RNasaH, un aspecto que puede ser importante cuando la región B no forma parte de una única secuencia de nucleobases contiguas que es complementaria de la diana. Regiones B más cortas, por ejemplo, de 2-4 nt de longitud también pueden ser preferentes en algunos modos de realización, ya que es poco probable que sean la diana de las enzimas de restricción específicas de secuencia. Como tal, es posible variar la susceptibilidad de la región B a la escisión por endonucleasas y, de este modo ajustar la tasa de activación del oligómero activo *in vivo*, o incluso intracelular. Adecuadamente, si se requiere una activación muy rápida, se pueden emplear regiones B más largas y/o regiones B que comprenden los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (por ejemplo, células o tejidos específicos o expresados diferencialmente).

40 Como se ilustra en los ejemplos, la región B se puede conjugar con el conjugado o el grupo reactivo de direccionamiento, por medio de un grupo conector que puede, por ejemplo, comprender un enlace fosfodiéster, y/u opcionalmente un grupo conector adecuado, tales como los proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, un enlace nucleosídico de fosfato (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosfoditioato, boranofosfato o metilfosfonato) o un grupo triazol. En algunos aspectos, el grupo de enlace es el mismo que el grupo de enlace entre las regiones A y B, y como tal puede ser un enlace fosfodiéster. En algunos aspectos, el grupo de enlace es un enlace fosforotioato.

45 En algunos modos de realización, los nucleótidos de ADN o ARN de la segunda región se seleccionan independientemente de nucleótidos de ADN y ARN. En algunos modos de realización, los nucleótidos de ADN o ARN de la segunda región son nucleótidos de ADN. En algunos modos de realización, los nucleótidos de ADN o ARN de la segunda región son nucleótidos de ARN.

50 En el contexto de la segunda región, el término nucleósido de ADN y ARN puede comprender una base natural o no natural (también denominada análogo de base o base modificada).

55 Se reconocerá que, en algunos modos de realización, la segunda región puede comprender además otros nucleótidos o análogos nucleotídicos. En algunos modos de realización, la segunda región comprende solamente nucleósidos de ADN o ARN. En algunos modos de realización, cuando la segunda región comprende más de un nucleósido, los enlaces internucleosídicos en la segunda región comprenden enlaces fosfodiéster. En algunos modos de realización, cuando la segunda región comprende más de un nucleósido, todos los enlaces internucleosídicos en la segunda región comprenden enlaces fosfodiéster.

60 En algunos modos de realización, al menos dos nucleósidos consecutivos de la segunda región son nucleósidos de ADN (tal como al menos 3 o 4 o 5 nucleótidos de ADN consecutivos). En algunos modos de realización, los al menos dos nucleósidos consecutivos de la segunda región son nucleósidos de ARN (tal como al menos 3 o 4 o 5 nucleótidos de ARN consecutivos). En algunos modos de realización, los al menos dos nucleósidos consecutivos de la segunda región son al menos un ADN y al menos un nucleósido de ARN. El enlace internucleosídico entre la región A y la región B es un enlace fosfodiéster. En algunos modos de realización, cuando la región B comprende más de un

65

nucleósido, al menos un enlace internucleosídico adicional es fosfodiéster, tal como el grupo o los grupos de enlace entre los 2 (o 3 o 4 o 5) nucleósidos adyacentes a la región A.

5 La segunda región está flanqueada en un lado (ya sea 5' o 3') por la primera región, por ejemplo, un oligonucleótido de antisentido, y en el otro lado (ya sea 3' o 5' respectivamente, por medio de un resto de conjugado o grupo similar (por ejemplo, un resto/grupo de bloqueo, un resto/grupo de direccionamiento o un resto de molécula pequeña terapéutica), opcionalmente por medio de un grupo conector (es decir, entre la segunda región y el conjugado/grupo de bloqueo, etc.).

10 En dicho modo de realización, el oligonucleótido de la invención se puede describir de acuerdo con la siguiente fórmula:



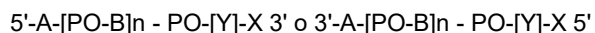
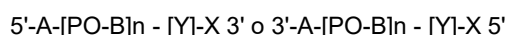
15 en la que A es la región A, PO es un enlace fosfodiéster, B es la región B, Y es un grupo de enlace opcional y X es un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo o un grupo reactivo o de activación.

20 En algunos modos de realización, la región B comprende 3'-5' o 5'-3': i) un enlace fosfodiéster al nucleósido 5' de la región A, ii) un nucleósido de ADN o ARN, tal como un nucleósido de ADN, y iii) otro enlace fosfodiéster



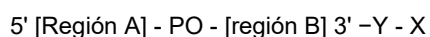
25 El otro enlace fosfodiéster une el nucleósido de la región B con uno o más nucleósidos adicionales, tal como uno o más nucleósidos de ADN o ARN, o se puede unir a X (es un conjugado, un grupo de direccionamiento o bloqueo o un grupo reactivo o de activación) opcionalmente por medio de un grupo de enlace (Y).

30 En algunos modos de realización, la región B comprende 3'-5' o 5'-3': i) un enlace fosfodiéster al nucleósido 5' de la región A, ii) entre 2-10 nucleósidos de ADN o ARN unidos a fosfodiéster, tal como un nucleósido de ADN, y opcionalmente iii) otro enlace fosfodiéster:

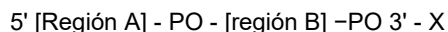


35 en la que A representa la región A, [PO-B]_n representa la región B, en la que n es 1-10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, PO es un grupo de enlace fosfodiéster opcional entre la región B y X (o Y si está presente).

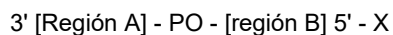
40 En algunos modos de realización, la invención proporciona compuestos de acuerdo con (o que comprenden) una de las siguientes fórmulas:



45 5' [Región A] - PO - [región B] 3' - X



50 3' [Región A] - PO - [región B] 5' -Y - X



55 3' [Región A] - PO - [región B] -PO 5' - X

La región B, por ejemplo, puede comprender o consistir en:



60 3' ADN 5'



65 3' ADN-PO-ADN-5'

5' ADN-PO-ADN-PO-ADN 3'

3' ADN-PO-ADN-PO-ADN 5'

5 5' ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN 3'

3' ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN 5'

10 5' ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN 3'

3' ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN 5'

Selección de la secuencia en la segunda región:

15 En algunos modos de realización, la región B no forma una secuencia complementaria cuando las regiones A y B de oligonucleótido están alineadas con la secuencia diana complementaria.

20 En algunos modos de realización, la región B sí forma una secuencia complementaria cuando las regiones A y B de oligonucleótido están alineadas con la secuencia diana complementaria. A este respecto, las regiones A y B juntas pueden formar una única secuencia contigua que es complementaria de la secuencia diana.

25 En algunos modos de realización, la secuencia de bases en la región B se selecciona para proporcionar un sitio de escisión por endonucleasas óptimo, en base a las enzimas de escisión endonucleasas predominantes presentes en el tejido o célula diana o en el compartimento subcelular. A este respecto, al aislar extractos celulares de tejidos diana y tejidos no diana, las secuencias de escisión por endonucleasas para su uso en la región B se pueden seleccionar en base a una actividad de escisión preferencial en la célula diana deseada (por ejemplo, hígado/hepatocitos) en comparación con una célula no diana (por ejemplo, riñón). A este respecto, la potencia del compuesto para la regulación por disminución de la diana se puede optimizar para el tejido/célula deseado.

30 En algunos modos de realización, la región B comprende un dinucleótido de secuencia AA, AT, AC, AG, TA, TT, TC, TG, CA, CT, CC, CG, GA, GT, GC o GG en la que C puede ser 5-metilcitosina y/o T se puede reemplazar con U. En algunos modos de realización, la región B comprende un trinucleótido de secuencia AAA, AAT, AAC, AAG, ATA, ATT, ATC, ATG, ACA, ACT, ACC, ACG, AGA, AGT, AGC, AGG, TAA, TAT, TAC, TAG, TTA, TTT, TTC, TAG, TCA, TCT, TCC, TCG, TGA, TGT, TGC, TGG, CAA, CAT, CAC, CAG, CTA, CTG, CTC, CTT, CCA, CCT, CCC, CCG, CGA, CGT, 35 CGC, CGG, GAA, GAT, GAC, CAG, GTA, GTT, GTC, GTG, GCA, GCT, GCC, GCG, GGA, GGT, GGC y GGG en la que C puede ser 5-metilcitosina y/o T se puede reemplazar con U. En algunos modos de realización, la región B comprende un trinucleótido de secuencia AAAX, AATX, AACX, AAGX, ATAX, ATTX, ATCX, ATGX, ACAX, ACTX, ACCX, ACGX, AGAX, AGTX, AGCX, AGGX, TAAX, TATX, TACX, TAGX, TTAX, TTTX, TTCX, TAGX, TCAX, TCTX, TCCX, TCGX, TGAX, TGTX, TGCX, TGGX, CAAX, CATX, CACX, CAGX, CTAX, CTGX, CTCX, CTTX, CCAX, CCTX, 40 CCCX, CCGX, CGAX, CGTX, CGCX, CGGX, GAAX, GATX, GACX, CAGX, GTAX, GTTX, GTTX, GTCX, GTGX, GCAX, GCTX, GCCX, GCGX, GGAX, GGTX, GGCX y GGGX en la que X se puede seleccionar del grupo que consiste en A, T, U, G, C y análogos del mismo, en la que C puede ser 5-metilcitosina y/o T se puede reemplazar con U. Se reconocerá que, cuando se hace referencia a nucleobases (naturales) A, T, U, G, C, estos se pueden sustituir con análogos de nucleobases que funcionan como la nucleobase natural equivalente (por ejemplo, un par de bases con el nucleósido complementario).

45 En algunos modos de realización, el compuesto de la invención puede comprender más de un grupo de conjugado (o más de un grupo funcional X, tal como un conjugado, un grupo de direccionamiento, de bloqueo o activado o un grupo reactivo o de activación), tal como 2 o 3 de dichos grupos. En algunos modos de realización, la región B se une covalentemente, opcionalmente por medio de un grupo conector [por ejemplo, no nucleótido], a al menos un grupo funcional, tal como dos o tres grupos funcionales. En algunos modos de realización, la primera región se puede unir covalentemente (por ejemplo, por medio de enlaces internucleosídicos, tales como enlaces fosfodiéster), a dos regiones B, por ejemplo, un 5' y un 3' a la primera región, en la que cada región B se puede seleccionar (opcionalmente independientemente) de la región B descrita en el presente documento. A este respecto, una región B puede tener uno o más grupos funcionales, y la segunda región B puede tener uno o más grupos funcionales, en la que los grupos funcionales de cada región B se pueden seleccionar independientemente de un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo o un grupo reactivo/de activación.

Compuestos polioliigoméricos

60 La invención proporciona un compuesto polioliigomérico que puede comprender la primera región (región A), la segunda región (región B) y la tercera región (región C), en el que la primera región se une covalentemente a al menos un compuesto oligomérico adicional (región A'), en el que la primera región (región A) y la región A' se unen covalentemente por medio de un conector bioescindible (región B'), que puede ser, a modo de ejemplo, como de acuerdo con la segunda región como se divulga en el presente documento, por ejemplo, una región de al menos un nucleósido de ADN o ARN unido a fosfodiéster (tal como ADN), tal como dos, tres, cuatro o cinco nucleósidos de ADN

o ARN unidos a fosfodiéster (tales como nucleósidos de ADN). Las regiones B y B', en algunos modos de realización, pueden tener la misma estructura, por ejemplo, el mismo número de nucleósidos de ADN/ARN y enlaces fosfodiéster y/o la misma secuencia de nucleobases. En otros modos de realización, las regiones B y B' pueden ser diferentes. A modo de ejemplo, dichos compuestos polioligoméricos pueden tener una estructura tal como: (5'-3' o 3'-5') Conjugado-PO-ON-PO'-ON', en la que el conjugado es la región C, PO es la región B, PO' es la región B' y ON 1 es la región A, y ON' es la región A'.

Debe entenderse que la región A', en algunos modos de realización, puede comprender otros múltiples compuestos oligoméricos (tales como otros 2 o 3 compuestos oligoméricos) unidos en serie (o en paralelo) por medio de conectores bioescindibles, por ejemplo: Conjugado-PO-ON-PO-ON'-PO"-ON", o Conjugado-PO-ON-[PO-ON']_n, en el que n puede ser, por ejemplo, 1, 2 o 3, y cada ON' puede ser igual o diferente y si, son diferente, pueden tener dianas iguales o diferentes.

Compuestos oligoméricos multiconjugados.

En algunos modos de realización, el compuesto oligomérico se puede conjugar con más de una región de conjugado (región C), que puede ser igual o diferente. Por ejemplo, el compuesto oligomérico de la invención puede tener una estructura como sigue: (5'-3' o 3'-5') ON-PO'-Conj1-PO"-Conj2, en la que Conj1 y Conj2 son los dos grupos de conjugados, al menos uno o ambos de PO o PO" son como de acuerdo con la región B en el presente documento, y ON es la región A. Conj1 y Conj2 pueden ser iguales o pueden ser diferentes. Por ejemplo, en algunos modos de realización, uno de Conj1 y Conj2 son un conjugado con un hidrato de carbono o esteroil y el otro es un conjugado lipófilo, por ejemplo, 5'-3' o 3'-5':ON-PO'-palmitoil-PO"-Chol u ON-PO'-palmitoil-PO"-GalNac.

El resto de conjugado con hidrato de carbono (representado por GalNac en las fórmulas anteriores (por ejemplo, cuando se usa como conj1 o conj2) se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en galactosa, galactosamina, N-formil-galactosamina, N-acetilgalactosamina, N-propionil-galactosamina, N-n-butanoil-galactosamina y N-isobutanoilgalactosa-amina. El conjugado lipófilo (por ejemplo, cuando se usa como conj1 o conj2, y se representa como palmotoilo en las fórmulas anteriores) puede ser un grupo hidrófobo, tal como un grupo hidrófobo C16-20, un esteroil, colesterol. Otros grupos glucídicos y lipófilos que se pueden usar se divulgan, por ejemplo, en el presente documento.

La diana

En algún modo de realización, para un ejemplo no limitante, el oligómero de la invención es para su uso en la modulación de un ácido nucleico (es decir, dianas) seleccionado del grupo que consiste en un ARNm, un microARN, un ARNinc (ARN largo no codificante), un ARNnp, un ARNnop y un ARN vírico.

Las dianas de ARNm y microARN ejemplares, pero no limitantes, incluyen, por ejemplo:

Los genes indicados en el cáncer, tales como Hif1-alfa, survivina, Bcl2, Mcl1, Her2, receptor de andrógenos, beta-catenina, factor de crecimiento transformante humano TGF-beta2, ras, TNF-alpha, c-RAF, HSP, por ejemplo, Hsp27, eIF-4E (por ejemplo, ISIS-EIF4ER_x) STAT3 (por ejemplo, ISIS-STAT3Rx), clusterina (por ejemplo, OGX-011), AurkB, AurkA, PBK, miR-155, miR-21, miR-10b, mir-34 (véase el documento WO2011088309), miR-199a, miR-182,

Los ARNm de los genes implicados en la inflamación, por ejemplo, ICAM-1 (por ejemplo, alicaforsén), CD49d, osteopontina VLA-4, miR-21 (psoriasis),

Otras dianas de ARNm médicamente relevantes incluyen CTGF (fibrosis local) y c-Raf-cinasa (enfermedad ocular). miR-29 (fibrosis cardíaca), factor XI (coagulación), factor VII (coagulación), miR15 (modelado post-IM), miR-159 (modelado post-IM), miR-138 (disminución de la masa ósea), mir-21 (véase el documento WO12148952) y mir214 (fibrosis), véase el documento WO2012012716.

Dianas de enfermedades o trastornos metabólicos, tales como Apo-B (colesterol LDL alto, SCA), ApoCIII (TG séricos altos, diabetes), Apo (a) (cardiovasculopatía), FGFR4 (obesidad), GCCR (diabetes T2), GCGR (diabetes T2), PTP1B (diabetes T2), DGAT2 (ENA), PCSK9 (hiperlipidemia y trastornos relacionados), MtGPAT (obesidad y EHGNA), miR-122 (colesterol alto), miR-33 (síndrome metabólico, aterosclerosis), miR-208 (insuficiencia cardíaca crónica), miR-499 (insuficiencia cardíaca crónica), miR-378 (enfermedad cardiometabólica), mir-143 (enfermedad vascular), miR-145 (enfermedad vascular), miR-92 (arteriopatía periférica), miR-375 (diabetes), miR-27b (diabetes), miR-34a (diabetes), miR-199a, miR-27a (cardiopatía, isquemia), miR-338 (diabetes).

Las enfermedades metabólicas incluyen, por ejemplo, síndrome metabólico, obesidad, hiperlipidemia, desequilibrio del colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar combinada (HFC), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, arteriopatía coronaria (AC) y cardiopatía coronaria (CC), aterosclerosis, cardiopatía, diabetes (I y/o II), ENA, síndrome coronario agudo (SCA),

Enfermedades víricas: miR-451 (policitemia), miR-122 (VHC), VHB, VHB, VBK, etc. Las enfermedades graves e infrecuentes incluyen SMN2 (atrofia muscular espinal), TTR (amiloidosis por TTR), GHr (acromegalia), AAT (hepatopatía asociada a DAAT), distofina (distrofia muscular de Duchennes).

5 En algunos modos de realización, el oligómero de la invención se dirige a un ácido nucleico expresado en el hígado, tal como un ARNm expresado en el hígado, tal como PCSK9, ApoB o MtGPAT. En algunos modos de realización, el oligómero de la invención se dirige al ARNm de PCSK9. En algunos modos de realización, el oligómero de la invención se dirige al ARNm de ApoB. En algunos modos de realización, el oligómero de la invención se dirige a un microARN expresado en el hígado, tal como miR-122.

10 En algunos modos de realización, el oligómero de la invención puede regular por disminución (por ejemplo, reducir o eliminar) la expresión de la diana (por ejemplo, un ácido nucleico diana). En este sentido, el oligómero de la invención puede afectar a la inhibición de la diana. En algunos modos de realización, los oligómeros de la invención se unen al ácido nucleico diana y afectan a la inhibición de la expresión de al menos un 10 % o un 20 % en comparación con el nivel de expresión normal, más preferentemente al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, 15 un 90 % o un 95 % de inhibición en comparación con el nivel de expresión normal (tal como el nivel de expresión en ausencia del oligómero u oligómeros o del conjugado o conjugados). En algunos modos de realización, dicha modulación se observa cuando se usa una concentración del compuesto de la invención de 0,04 y 25 nM, tal como de 0,8 y 20 nM. En el mismo modo de realización o en uno diferente, la inhibición de la expresión es de menos de un 20 100 %, tal como menos de un 98 % de inhibición, menos de un 95 % de inhibición, menos de un 90 % de inhibición, menos de un 80 % de inhibición, tal como menos de un 70 % de inhibición. La modulación del nivel de expresión se puede determinar midiendo los niveles de proteína, por ejemplo, mediante procedimientos tales como SDS-PAGE seguido de inmuno-electrotransferencia usando anticuerpos adecuados generados contra la proteína diana. De forma 25 alternativa, la modulación de los niveles de expresión se puede determinar midiendo los niveles de ARNm, por ejemplo, mediante transferencia de tipo Northern o RT-PCR cuantitativa. Cuando se mide por medio de los niveles de ARNm, el nivel de regulación por disminución cuando se usa una dosificación apropiada, tal como de 0,04 y 25 nM, tal como de 0,8 y 20 nM, está, en algunos modos de realización, típicamente a un nivel de un 10-20 % de los niveles normales en ausencia del compuesto, conjugado o composición de la invención.

30 Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para regular por disminución o inhibir la expresión de la diana en una célula que expresa la diana, comprendiendo dicho procedimiento administrar el oligómero o conjugado de acuerdo con la invención a dicha célula para regular por disminución o inhibir la expresión de la diana en dicha célula. Adecuadamente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula humana. La administración se puede producir, en algunos modos de realización, *in vitro*. La administración se puede producir, en algunos modos de 35 realización, *in vivo*. Los compuestos de la invención, tales como los oligómeros y conjugados de los mismos, se pueden dirigir a diferentes dianas, tales como ARNm o microARN u otras dianas de ácido nucleico que se expresan en el hígado (las referencias a NCBI Genbank/ID de genes se dan como ejemplos de secuencias que pueden ser dianas de los compuestos de la invención - las secuencias de Genbank/NCBI).

40 **ApoB**

En algunos modos de realización, la primera región (o la primera y la segunda región) forma una única secuencia de nucleobases contiguas que es complementaria de una región correspondiente de una diana de ARNm de ApoB (es decir, dianas) ApoB-100 (NCBI Genbank ID NM_000384.2 GI:105990531, incorporados al presente documento por 45 referencia).

Los compuestos de la invención que se dirigen a ApoB se pueden usar en el tratamiento del síndrome coronario agudo (véase el documento WO20100076248). Por lo tanto, la invención proporciona el oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a ApoB100 para su uso en el tratamiento del síndrome coronario agudo. La invención 50 proporciona además un procedimiento de tratamiento del síndrome coronario agudo, en el que dicho procedimiento comprende la administración del oligómero de la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Los compuestos de la invención que se dirigen a ApoB se pueden usar en el tratamiento de la aterosclerosis. Por lo tanto, la invención proporciona el oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a ApoB100 para su uso en el 55 tratamiento de la aterosclerosis. La invención proporciona además un procedimiento de tratamiento de la aterosclerosis, en el que dicho procedimiento comprende la administración del oligómero de la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento. Los compuestos de la invención que se dirigen a ApoB se pueden usar en el tratamiento de hipercolesterolemia o hiperlipidemia. Por lo tanto, la invención proporciona el oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a ApoB100 para su uso en el tratamiento de hipercolesterolemia o hiperlipidemia. La 60 invención proporciona además un procedimiento de tratamiento de la hipercolesterolemia o la hiperlipidemia, en el que dicho procedimiento comprende la administración del oligómero de la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

La invención proporciona un procedimiento *in vivo* o *in vitro* para la inhibición de ApoB en una célula que expresa ApoB, comprendiendo dicho procedimiento administrar un oligómero o un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a dicha célula para inhibir ApoB en dicha célula. 65

Los ejemplos de oligómeros de LNA que se pueden usar como primera región en los oligómeros/conjugados de la invención incluyen, por ejemplo, los divulgados en los documentos WO2007/031081, WO2008/113830, WO2007131238 y WO2010142805. Los compuestos específicos preferentes incluyen los siguientes:

5' - G_s^mC_sa_st_sg_sg_st_sa_st_sT_s^mC_sA -3' (SEQ ID NO 1)

5' - G_sT_st_sg_sa_sc_sa_sc_st_sg_sT_s^mC -3' (SEQ ID NO 53)

en los que las letras mayúsculas son unidades de beta-D-oxi LNA (nucleósidos), las letras minúsculas son unidades de ADN, el subíndice s es un enlace fosforotioato y un superíndice m antes de la letra mayúscula C ilustra que todas las citosinas de LNA son 5-metilcitosina. Los compuestos de la invención que se dirigen a ApoB se pueden conjugar con un conjugado que dirige el oligómero al hígado, como se divulga en el presente documento, tal como un conjugado con un hidrato de carbono o lipófilo, tal como un conjugado con GalNac o un conjugado con un esteroide (por ejemplo, colesterol o tocoferol). El conjugado puede estar, por ejemplo, en el extremo 5' o el extremo 3' del compuesto oligomérico (adecuadamente por medio de la región B). Otros oligómeros que se dirigen a ApoB se divulgan en los documentos WO03/011887, WO04/044181, WO2006/020676, WO2007/131238, WO2007/031081 y WO2010142805.

PCSK9

En algunos modos de realización, la primera región (o la primera y segunda región) forma una única secuencia de nucleobases contiguas que es complementaria de una región correspondiente de una diana de ARNm de PCSK9 (es decir, dianas), tal como el ARNm de PCSK9 humano: NCBI Genbank ID NM_174936.3 GI:299523249.

La invención proporciona un oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a PCSK9, para su uso como un medicamento, tal como para el tratamiento de la hipercolesterolemia o un trastorno relacionado, tal como un trastorno seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, por ejemplo mutaciones de ganancia funcional en PCSK9, desequilibrio del colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar (HF), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, arteriopatía coronaria (AC) y cardiopatía coronaria (CC).

La invención proporciona el uso de un oligómero de la invención que se dirige a PCSK9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipercolesterolemia o un trastorno relacionado, tal como un trastorno seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, por ejemplo mutaciones de ganancia funcional en PCSK9, desequilibrio del colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar (HF), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, arteriopatía coronaria (AC) y cardiopatía coronaria (CC).

La invención proporciona un procedimiento para tratar la hipercolesterolemia o un trastorno relacionado, tal como un trastorno seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, por ejemplo, mutaciones de ganancia funcional en PCSK9, desequilibrio del colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar (HF), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, arteriopatía coronaria (AC), cardiopatía coronaria (CC), comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de un oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a PCSK9, a un paciente que padece o que es probable que padezca hipercolesterolemia o un trastorno relacionado.

La invención proporciona un procedimiento *in vivo* o *in vitro* para la inhibición de PCSK9 en una célula que expresa PCSK9, comprendiendo dicho procedimiento administrar un oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a PCSK9 a dicha célula para inhibir PCSK9 en dicha célula.

El siguiente es un oligómero que se dirige al ARNm de PCSK9 humano y se puede usar como región A en los compuestos de la invención.

5' - T_sG_s^mC_st_sa_sc_sa_sa_sa_sa_sC_s^mC_s^mC_sA -3' (SEQ ID NO 37)

en el que las letras mayúsculas son unidades de beta-D-oxi LNA (nucleósidos), las letras minúsculas son unidades de ADN, el subíndice s es un enlace fosforotioato y un superíndice m antes de la letra mayúscula C ilustra que todas las citosinas de LNA son 5-metilcitosina. Los compuestos de la invención que se dirigen a PCSK9 se pueden conjugar con un conjugado que dirige el oligómero al hígado, como se divulga en el presente documento, tal como un conjugado con un hidrato de carbono o lipófilo, tal como un conjugado con GalNac o un conjugado con un esteroide (por ejemplo, colesterol o tocoferol). El conjugado puede estar, por ejemplo, en el extremo 5' o el extremo 3' del compuesto oligomérico (adecuadamente por medio de la región B). Otros oligómeros que se dirigen a PCSK9 se divulgan como la SEQ ID NO 36-52, y otros se divulgan en los documentos WO2008/043753, WO2011/009697, WO08/066776, WO07/090071, WO07/146511, WO07/143315, WO09/148605, WO11/123621 y WO11133871.

miR-122

En algunos modos de realización, la primera región (o la primera y la segunda región) forma una única secuencia de nucleobases contiguas que es complementaria de una región correspondiente de un microARN-122 tal como miR-122a (es decir, dianas), tal como las secuencias has-miR-122 (versión de miRBase 20: MI0000442), tales como:

>hsa-mir-122 MI0000442

CCUUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCUAAACUAUCAACGCCAUUAUCACACUAAAUAGCU
ACUGCUAGGC

>hsa-miR-122-5p MIMAT0000421

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

miR-122 se ha indicado en la infección por el VHC, donde es un factor esencial del huésped requerido para el mantenimiento de la infección. Por lo tanto, se pueden usar inhibidores de miR-122 en el tratamiento de la infección por hepatitis C.

Los compuestos de la invención que se dirigen a miR-122 se pueden usar en el tratamiento de la infección por el VHC. Por lo tanto, la invención proporciona el oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a miR-122 para su uso en el tratamiento de la infección por el VHC. La invención proporciona además un procedimiento de tratamiento de la infección por el VHC, en el que dicho procedimiento comprende la administración del oligómero de la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

La invención proporciona el uso de un oligómero de la invención que se dirige a miR-122, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por el VHC.

La invención proporciona un procedimiento para tratar la infección por el VHC, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de un oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a miR-122, a un paciente que padece una infección por el VHC.

La invención proporciona un procedimiento *in vivo* o *in vitro* para la inhibición de miR-122 en una célula que expresa miR-122, tal como una célula infectada por el VHC o una célula que expresa un replicón del VHC, comprendiendo dicho procedimiento administrar un oligómero o un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a dicha célula para inhibir miR-122 en dicha célula.

miR-122 también se ha indicado en el metabolismo del colesterol y se ha sugerido que la inhibición de miR-122 se puede usar para un tratamiento para reducir los niveles de colesterol en plasma (Esau, Cell Metab. 2006 Feb;3(2):87-98).

Por lo tanto, se pueden usar inhibidores de miR-122 en un tratamiento para reducir los niveles de colesterol en plasma, o en el tratamiento de una enfermedad metabólica asociada con niveles elevados de colesterol (trastornos relacionados), tales como indicaciones seleccionadas del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, dislipidemias, arteriopatía coronaria (AC), cardiopatía coronaria (CC). Se pueden usar compuestos de la invención que se dirigen a miR-122 en el tratamiento de los niveles de colesterol elevados o trastornos relacionados. Por lo tanto, la invención proporciona el oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a miR-122 para su uso en el tratamiento de los niveles de colesterol elevados o trastornos relacionados. La invención proporciona además un procedimiento de tratamiento de los niveles de colesterol elevados o trastornos relacionados, en el que dicho procedimiento comprende la administración del oligómero de la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

La invención proporciona el uso de un oligómero de la invención que se dirige a miR-122, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de los niveles de colesterol elevados o trastornos relacionados.

La invención proporciona un procedimiento para tratar los niveles de colesterol elevados o trastornos relacionados, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de un oligómero de acuerdo con la invención que se dirige a miR-122, a un paciente que padece dicho trastorno.

La invención proporciona un procedimiento *in vivo* o *in vitro* para la inhibición de miR-122 en una célula que expresa miR-122, tal como una célula infectada por el VHC o una célula que expresa un replicón del VHC, comprendiendo dicho procedimiento administrar un oligómero o un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a dicha célula para inhibir miR-122 en dicha célula.

Los oligómeros que se dirigen a miR-122 se divulgan en los documentos WO2007/112754, WO2007/112753, WO2009/043353, y puede ser mixmeros, tales como SPC3649, también denominado miravirsén, véase más adelante,

o un LNA diminuto, tales como los divulgados en el documento WO2009/043353. (por ejemplo, 5'-ACACTCC-3', 5'-CACACTCC-3', 5'-TCACACTCC-3', donde las letras mayúsculas son beta-D_oxi LNA, completamente fosforotioato y LNA C son 5-metilcitosina). En algunos modos de realización, los oligómeros dirigidos a miR-122 tienen una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 (o 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos) de longitud. En algunos modos de realización, los oligómeros que se dirige a miR-122 una secuencia que es completamente complementaria de miR-122 como se mide a lo largo del oligómero, e incluye preferentemente la secuencia 5'-CACACTCC-3'. En algunos modos de realización, el oligómero que se dirige a un microARN tal como miR-122 es complementario de una región correspondiente del microARN a lo largo de la longitud del oligómero y, en algunos modos de realización, el nucleósido 3' del oligómero es complementario de (es decir, se alinea con) el primer, segundo, tercer o cuarto nucleótido 5' del microARN, tal como miR-122, tal como el segundo nucleótido 5' del microARN, tal como miR-122.

El siguiente es un oligómero que se dirige al has-miR-122 (miR-122 humano) y se puede usar como región A en los compuestos de la invención.

Miravirsén: 5'- ^mC₅C₅A₅T₅G₅T₅C₅A₅^mC₅A₅^mC₅T₅^mC₅^mC₅ -3'

Otros compuestos que se dirigen a miR-122 que se pueden usar en el contexto de la presente invención (región A) se divulgan en los documentos WO2007/027894, WO2007/027775.

MtGPAT: (ID génica de NCBI 57678 - Cromosoma:

10;NC_000010.10(113907971..113975153, complemento) La glicerol-3-fosfato aciltransferasa 1 mitocondrial (EC 2.3.1.15, también conocida como GPAT1, mtGPAT1, GPAM, mtGPAM) desempeña un papel importante en la formación de los triglicéridos hepáticos, donde unos niveles altos de actividad de mtGPAT1 da como resultado hígado graso (hepatoesteatosis), mientras que la ausencia de mtGPAT1 da como resultado niveles bajos de triglicéridos hepáticos y la oxidación estimulada de ácidos grasos (véase el documento WO2010/000656, que divulga oligómeros que se dirigen a mtGPAT). Los compuestos de la invención que se dirigen a MtGPAT se pueden usar para tratar afecciones tales como el sobrepeso, la obesidad, el hígado graso, la hepatoesteatosis, la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA), la esteatohepatitis no alcohólica (ENA), la resistencia a la insulina, la diabetes tal como la diabetes *mellitus* no insulino dependiente (DMNID)

Factor VII (ID génica de NCBI 2155, NCBI J02933.1 GI:180333, o EU557239.1 GI:182257998). El oligómero o conjugado de la invención se puede dirigir al factor VII y, de este modo, inhibir la producción del factor VII, un componente clave de la vía de coagulación del factor tisular. Los compuestos de la invención que se dirigen al factor VII se pueden usar para el tratamiento o la prevención de enfermedades tromboticas (típicamente sin causar hemorragia) y como infarto de miocardio, apoplejía y coágulos sanguíneos, o afecciones inflamatorias. Los documentos WO 2013/119979 y WO 2012/174154, incorporados en el presente documento por referencia, divulgan compuestos oligonucleotídicos que se dirigen al FVII que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención.

Factor XI (NCBI Genbank BC122863.1 GI:114108211) - Factor XI, un factor de coagulación que se produce en el hígado. Los niveles altos de Factor XI están vinculados a infarto de miocardio, apoplejía y coágulos de sangre. El documento WO 2013/070771 divulga compuestos oligonucleotídicos que se dirigen al FXI que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención. Los compuestos de la invención que se dirigen al factor XI se pueden usar para el tratamiento o la prevención de enfermedades tromboticas y como infarto de miocardio, apoplejía y coágulos sanguíneos, o afecciones inflamatorias tales como artritis y colitis.

ApoCIII (NCBI Genbank BC027977.1 GI:20379764) una proteína que regula el metabolismo de los triglicéridos en la sangre. Los niveles altos de apoC-III están vinculados a la inflamación, los triglicéridos altos, la aterosclerosis y el síndrome metabólico. Los compuestos de la invención que se dirigen a ApoCIII se pueden usar para reducir los niveles de triglicéridos en suero o en el tratamiento de, por ejemplo, el síndrome de quilomicronemía familiar y los triglicéridos muy altos bien en monoterapia o en combinación con otros agentes hipotrigliceridemiantes. El documento WO11085271 divulga compuestos oligonucleotídicos que se dirigen a ApoCIII que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención.

Apo(a) (NCBI Genbank NM_005577.2 GI:116292749) inhibe la producción de apo(a) en el hígado y está diseñado para ofrecer un enfoque directo para reducir la Lp(a), un factor de riesgo independiente de la cardiopatología. Los niveles altos de Lp (a) se asocian con un aumento del riesgo de aterosclerosis, cardiopatía coronaria, infarto de miocardio y apoplejía. La Lp(a) promueve la acumulación prematura de placa de ateroma, o aterosclerosis, en las arterias. Los compuestos de la invención que se dirigen a Apo(a) se pueden usar en el tratamiento de, por ejemplo, la aterosclerosis y cardiopatía coronaria. Los documentos WO05000201 y WO03014307 divulgan compuestos oligonucleotídicos que se dirigen a la apolipoproteína (a) que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención.

Hepatitis B (VHB) (véase, por ejemplo, NCBI D23684.1 GI:560092; D23683.1 GI: 560087; D23682.1 GI: 560082; D23681.1 GI: 560077; D23680.1 GI: 560072; D23679.1 GI: 560067; D23678.1 GI: 560062; D23677.1 GI: 560057).

Los oligómeros que se dirigen al VHB son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, véanse los documentos WO96/03152, WO97/03211, WO2011/052911, WO2012/145674, WO2012/145697, WO2013/003520 y WO2013/159109.

Los compuestos de la invención que se dirigen al VHB se pueden usar en el tratamiento de la infección por el VHB. Por lo tanto, la invención proporciona el oligómero de acuerdo con la invención que se dirige al VHB para su uso en el tratamiento de la infección por el VHB. La invención proporciona además un procedimiento de tratamiento de la infección por el VHB, en el que dicho procedimiento comprende la administración del oligómero de la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

La invención proporciona el oligómero o conjugado de la invención que se dirige a la hepatitis B (VHB) para su uso como un medicamento, tal como para el tratamiento de la infección por hepatitis B o un trastorno relacionado.

La invención proporciona el uso de un oligómero o un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención que se dirige a la hepatitis B (VHB), para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por hepatitis B o un trastorno relacionado.

La invención proporciona un procedimiento para tratar la infección por hepatitis B o un trastorno relacionado, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de un oligómero o conjugado de la invención que se dirige al VHB, a un paciente infectado por el virus de la hepatitis B. La invención proporciona un procedimiento *in vivo* o *in vitro* para la inhibición de la replicación del VHB en una célula infectada por el VHB, comprendiendo dicho procedimiento administrar un oligómero o conjugado de la invención que se dirige al VHB en dicha célula para inhibir la replicación del VHB. Un ejemplo de un oligómero de LNA cuya diana es el VHB (como se divulga en el documento WO2011/47312) es el que se puede usar como el oligómero (región A) de la invención 5'-G_sA_sG_sG_sC_sA_sA_sA_sA_sG_sC_sA_sG_s^mC_sA_sG_sG - 3'. Otros compuestos se divulgan en la tabla 1 del documento WO2011/47312, y en los documentos WO2011/052911, WO2012/145674, WO2012/145697, WO2013/003520 y WO2013/159109.

RG-101 es un compuesto que se dirige a miR-122 y comprende un conjugado con GalNac, y está siendo desarrollado para el tratamiento de la infección por el VHC por Regulus Therapeutics.

ANGPTL3, (por ejemplo, NCBI BC007059.1 GI: 14712025 o BC058287.1 GI: 34849466) ANGIOPOYETINA TIPO 3 - una proteína que regula el metabolismo de los lípidos, la glucosa y la energía. Las personas con niveles elevados de ANGPTL3 tienen hiperlipidemia asociada con un aumento del riesgo de infartos de miocardio prematuros, mayor grosor de las paredes arteriales, así como múltiples anomalías metabólicas, tales como resistencia a la insulina. Por el contrario, las personas con niveles más bajos de ANGPTL3 tienen niveles más bajos de LDL-C y triglicéridos y un menor riesgo de cardiovascularidad. Los compuestos de la invención que se dirigen a ANGPTL3 se pueden usar en el tratamiento de, por ejemplo, hiperlipidemia y trastornos relacionados, trastorno metabólico, aterosclerosis, cardiopatía coronaria o resistencia a la insulina. El documento WO11085271 divulga compuestos oligonucleotídicos que se dirigen a ANGPTL3 que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención.

Receptor de glucagón, o GCGR (BC112041.1 GI: 85567507; L20316.1 GI: 405189): El glucagón es una hormona que se opone a la acción de la insulina y estimula al hígado a producir glucosa, en particular en la diabetes de tipo 2. En pacientes con diabetes avanzada, la acción no controlada del glucagón da lugar a un aumento significativo de los niveles de glucemia. Por lo tanto, atenuar la acción del glucagón puede tener un efecto hipoglucemiante significativo en pacientes con diabetes grave. Además, la reducción del GCGR produce un péptido semejante al glucagón más activo, o GLP-1, una hormona que conserva la función pancreática y potencia la secreción de insulina. Los compuestos de la invención que se dirigen al GCGR se pueden usar en el tratamiento de, por ejemplo, la resistencia a la insulina, la hiperglucemia, la diabetes, tal como la diabetes de tipo 1 o 2, la conservación de la función pancreática y el control de los niveles de glucemia. El documento WO2007/134014 divulga compuestos oligonucleotídicos que se dirigen al GCGR que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención.

Receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos, o FGFR4. (NCBI gen 2264 - NC_000005.9 (176513906..176525143) El FGFR4 se expresa en el hígado y en los tejidos grasos, y está indicado para disminuir la capacidad del organismo para almacenar grasa al tiempo que aumenta la quema de grasas y el gasto de energía. Muchos fármacos contra la obesidad actúan en el cerebro para inhibir el apetito, lo que habitualmente da como resultado efectos secundarios en el SNC. Los compuestos de la invención que se dirigen al FGFR4 se pueden usar en el tratamiento de, por ejemplo, la resistencia a la insulina, la hiperglucemia, la diabetes, tal como la diabetes de tipo 1 o 2, la protección contra la obesidad (por ejemplo, cuando se usa en combinación con un fármaco anorexígeno), la reducción del peso corporal, y la mejora de la sensibilidad a la insulina, la diabetes, tal como la diabetes de tipo 1 o 2 y para controlar los niveles de glucemia. Los documentos WO09046141 y WO12174476 divulgan compuestos oligonucleotídicos que se dirigen al FGFR4 que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención.

Diacilglicerol aciltransferasa-2, o DGAT-2 (ID génica de NCBI 84649): Un componente clave en la síntesis de los triglicéridos. La inhibición de DGAT puede reducir la grasa hepática en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (ENA) y también se puede usar para tratar la diabetes de tipo 2 y la resistencia a la insulina. Los compuestos de la

invención que se dirigen a DGAT-2 se pueden usar para tratar la ENA, para reducir la grasa hepática, para tratar la diabetes, tal como la diabetes de tipo 2, y para tratar la resistencia a la insulina. Los documentos WO05019418 y WO2007136989 divulgan compuestos oligonucleotídicos que se dirigen al DGAT-2 que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención.

Receptor de glucocorticoides, o GCCR (BC150257.1 GI: 152013043): Las hormonas glucocorticoides afectan a una variedad de procesos en todo el organismo, y los niveles excesivos de hormonas glucocorticoides pueden tener un efecto perjudicial en muchos de los tejidos y órganos del cuerpo. El síndrome de Cushing es una enfermedad huérfana causada por la exposición prolongada a niveles altos de glucocorticoides. Si no se trata, los pacientes con síndrome de Cushing pueden desarrollar hipertensión, diabetes y alteración de las funciones inmunitarias y tener un mayor riesgo de muerte prematura. Aunque existen tratamientos aprobados contra el síndrome de Cushing, los medicamentos actuales se asocian con efectos secundarios significativos, tales como hipertensión y diabetes, y sigue habiendo una gran necesidad médica no cubierta de nuevos tratamientos para estos pacientes. Los compuestos de la invención que se dirigen al GCCR-2 se pueden usar para tratar el síndrome de Cushing y afecciones asociadas (tales como las enumeradas anteriormente). Los documentos WO07035759 y WO2007136988 divulgan compuestos oligonucleotídicos que se dirigen al GCCR que se pueden incorporar a los conjugados de la presente invención.

Componente C5 del complemento (M57729.1 GI: 179982): El sistema del complemento desempeña un papel principal en la inmunidad como mecanismo de protección para la defensa del huésped, pero su regulación incorrecta da como resultado complicaciones graves y potencialmente mortales en una amplia variedad de enfermedades humanas, incluyendo la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), el síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa), la miastenia grave, la neuromielitis óptica, entre otras. Los compuestos de la invención que se dirigen al componente C5 del complemento se pueden usar para tratar uno o más de estos trastornos. El C5 es una diana validada genética y clínicamente; las mutaciones humanas de pérdida funcional se asocian con una defensa inmunitaria atenuada contra determinadas infecciones y el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-C5 administrado por vía intravenosa ha demostrado actividad clínica y tolerabilidad en varias enfermedades mediadas por el complemento. proteasa transmembrana, serina 6 (Tmprss6) para el tratamiento de la betatalasemia y trastornos de sobrecarga de hierro.

Alfa-1-antitripsina (AAT): (M11465.1 GI: 177826) La hepatopatía asociada con - el documento WO13142514 divulga compuestos oligonucleotídicos que se dirigen a la AAT que se pueden incorporar a los oligómeros o conjugados de la presente invención. Los compuestos de la invención que se dirigen a la AAT se pueden usar en procedimientos para disminuir la expresión de ARNm de AIAT y proteínas, y tratar, mejorar, evitar, retardar la progresión o detener la progresión de la fibrosis, tal como hepatopatía asociada a DAIAT y enfermedad pulmonar, tal como enfermedad pulmonar asociada a DAIAT, en un individuo que los necesita.

Transtirretina - TTR (BC005310.1 GI: 13529049): Los oligómeros de la invención que se dirigen a la TTR se pueden usar para tratar la amiloidosis por transtirretina, o amiloidosis por TTR, una enfermedad genética infrecuente y grave en la que el paciente hereda un gen mutante que produce una forma incorrectamente plegada de TTR, que se acumula progresivamente en los tejidos. En los pacientes con amiloidosis por TTR, las formas tanto mutante como normal de TTR se pueden acumular como fibrillas en los tejidos, incluyendo el corazón, los nervios periféricos y el tubo gastrointestinal. La presencia de fibrillas de TTR interfiere en las funciones normales de estos tejidos y, a medida que las fibrillas de la proteína TTR aumentan de tamaño, se produce más daño en los tejidos y la enfermedad empeora. La TTR es una proteína portadora que transporta una hormona tiroidea y retinol en la sangre. En los pacientes con amiloidosis por TTR, las formas tanto mutante como normal de TTR se pueden acumular como fibrillas en los tejidos. Los compuestos de la invención se pueden usar para tratar la amiloidosis por TTR. Véase Benson *et al.*, *Amyloid*. 2010 Jun; 17(2):43-9, y Ackermann *et al.*, *Amyloid*. 2012 Jun; 19 Supl. 1:43-4. Los compuestos de antisentido que se dirigen a la TTR que se pueden usar en los oligómeros o conjugados de la invención se divulgan en los documentos US8101743, WO11139917 y WO10017509.

Aminolevulinato sintasa-1 (ALAS-1) (BC011798.2 GI: 33877783; AK312566.1 GI: 164690365; NM_199166.2 GI: 362999012; NM_000688.5 GI: 362999011). La ALAS1 es una diana validada para el tratamiento de la porfiria, tal como el tratamiento de las porfirias hepáticas, incluyendo la porfiria intermitente aguda (PIA). Los compuestos de la invención que se dirigen a la ALAS-1 se pueden usar en el tratamiento de estos trastornos.

Factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (ID génica 7422, secuencia humana: Cromosoma: 6; NC_000006.11 (43737946..43754224)). El VEGF está indicado en los cánceres. Los compuestos de la invención que se dirigen al VEGF se pueden usar en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos, tales como cáncer, tal como cáncer de hígado.

La tabla 1 proporciona un grupo de dianas hepáticas a las que se pueden dirigir los compuestos de la invención, así como la indicación/trastorno médico para el cual se pueden usar dichos compuestos para tratarlos (tal como una persona que padece el trastorno asociado) (véase Sehgal *et al.*, *Liver as a target for oligonucleotide therapeutics*, *J. of Hepatology* 2013, en prensa).

Tabla 1

El compuesto de la invención se puede dirigir a un ácido nucleico (por ejemplo, que codifica ARNm o miARN) seleccionado del grupo que consiste en	Para el tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como
<i>AAT</i>	Hept.-AAT
<i>ALDH2</i>	Alcoholismo
Vía HAMP	Anemia o inflamación/IRC
<i>miR-33</i>	Ateroesclerosis
<i>Apo(a)</i>	Ateroesclerosis/Lp(a) alta
<i>miR-7</i>	Cáncer de hígado
<i>miR-378</i>	Enfermedades cardiometabólicas
<i>miR-21</i>	Cáncer de hígado
<i>Myc</i>	Cáncer de hígado
<i>miR-122</i>	VHC
5'UTR	VHC
5'UTR y NS5B	VHC
NS3	VHC
<i>TMPRSS6</i>	Hemocromatosis
Antitrombina III	Hemofilia A, B
<i>ApoCIII</i>	Hipertrigliceridemia
<i>ANGPLT3</i>	Hiperlipidemia
<i>MTP</i>	Hiperlipidemia
<i>DGAT2</i>	ENA
<i>ALAS1</i>	Porfiria
Antitrombina III	Trastornos hemorrágicos infrecuentes
<i>Amiloide A en suero</i>	SAA-amiloidosis
Factor VII	Trombosis
Receptor de la hormona del crecimiento	Acromegalia
<i>miR-122</i>	Virus de la hepatitis C
<i>ApoB-100</i>	Hipercolesterolemia
<i>ApoCIII</i>	Hipertrigliceridemia
<i>PCSK9</i>	Hipercolesterolemia
<i>PCR</i>	Trastornos inflamatorios
<i>KSP o VEGF</i>	Cáncer de hígado
<i>PLK1</i>	Cáncer de hígado
<i>miR-34</i>	Cáncer de hígado
<i>FGFR4</i>	Obesidad
Factor IXa	Trombosis
Factor XI	Trombosis
<i>TTR</i>	Amiloidosis por TTR
<i>GCCR</i>	Diabetes de tipo 2
<i>PTP-1B</i>	Diabetes de tipo 2
<i>GCCR</i>	Síndrome de Cushing
Transportador 1 de glucosa-6-fosfato hepático	homeostasis de la glucosa, la diabetes, diabetes de tipo 2

Secuencias

- 5 En algunos modos de realización, los oligómeros, o la primera región de los mismos, comprenden una secuencia de nucleótidos contiguos que corresponde al complemento inverso de una secuencia de nucleótidos presente en el ácido nucleico diana (es decir, la secuencia a la que se dirige el oligómero). La tabla 3 proporciona un grupo de dianas de ARNm y miARN que están en desarrollo preclínico o clínico usando compuestos oligonucleotídicos para la indicación asociada, y, por lo tanto, son adecuadas para dirigirse a ellas con los compuestos de la presente invención.
- 10 En algunos modos de realización, la diana se selecciona del grupo que consiste en: *miR-122*, *ApoB-100*, *ApoCIII*, *PCSK9*, *CRP*, *KSP*, *VEGF*, *PLK1*, *miR-34*, *FGFR4*, *Factor IXa*, *Factor XI*, *TTR*, *GCCR*, *PTP-1B*, *GCCR*, *AAT*, *ALDH2*, la vía HAMP, *miR-33*, *Apo(a)*, *miR-7*, *miR-378*, *miR-21*, *Myc*, *miR-122*, el genoma del VHC tal como la 5'UTR del VHC o ARN de NS5B del VHC o ARN de NS3, *TMPRSS6*, antitrombina III, *ApoCIII*, *ANGPLT3*, *MTP*, *DGAT2*, *ALAS1*, antitrombina III, amiloide A sérico y Factor VII.
- 15 En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos comprende no más de un único emparejamiento erróneo cuando hibrida con la secuencia diana.

Al determinar el grado de "complementariedad" entre los oligómeros de la invención (o las regiones de los mismos) y la región diana del ácido nucleico, tal como las que se divulgan en el presente documento, el grado de "complementariedad" (también, "homología" o "identidad") se expresa como el porcentaje de identidad (o porcentaje de homología) entre la secuencia del oligómero (o región del mismo) y la secuencia de la región diana (o el complemento inverso de la región diana) que mejor se alinea con el mismo. El porcentaje se calcula contando el número de bases alineadas que son idénticas entre las 2 secuencias, dividiendo entre el número total de monómeros contiguos en el oligómero y multiplicando por 100. En dicha comparación, si existen interrupciones, es preferente que dichas interrupciones sean simplemente emparejamientos erróneos en lugar de áreas donde el número de monómeros dentro de la interrupción difiere entre el oligómero de la invención y la región diana.

Como se usa en el presente documento, los términos "homólogo" y "homología" son intercambiables con los términos "identidad" e "idénticos".

Los términos "correspondientes a" y "corresponde a" se refieren a la comparación entre la secuencia de nucleótidos del oligómero (es decir, la secuencia de nucleobases o bases) o la secuencia de nucleótidos contiguos (una primera región) y la secuencia de nucleótidos contiguos equivalente de otra secuencia seleccionada de i) una subsecuencia del complemento inverso de la diana del ácido nucleico. Los análogos nucleotídicos se comparan directamente con sus nucleótidos equivalentes o correspondientes. Una primera secuencia que corresponde a otra secuencia en i) o ii) es típicamente idéntica a esa secuencia a lo largo de la primera secuencia (tal como la secuencia de nucleótidos contiguos) o, como se describe en el presente documento, en algunos modos de realización, es al menos un 80 % homóloga a una secuencia correspondiente, tal como al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 % al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 % homóloga, tal como un 100 % homóloga (idéntica).

Se pretende que los términos "análogo nucleotídico correspondiente" y "nucleótido correspondiente" indiquen que el nucleótido en el análogo nucleotídico y el nucleótido natural son idénticos. Por ejemplo, cuando la unidad 2-desoxirribosa del nucleótido se une a una adenina, el "análogo nucleotídico correspondiente" contiene una unidad pentosa (diferente de 2-desoxirribosa) unida a una adenina.

Los términos "complemento inverso", "complementario inverso" y "complementariedad inversa" como se usan en el presente documento son intercambiables con los términos "complemento", "complementario" y "complementariedad".

La secuencia de nucleobases contiguas del oligómero (primera región o primera y segunda región), por lo tanto, puede ser complementaria de una diana, tal como las que se mencionan en el presente documento.

En algunos modos de realización, la primera región o la primera y segunda región forman una única secuencia de nucleobases contiguas que es complementaria de una región de una diana de ARNm, tales como las que mencionan en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, ApoB-100 (NM_000384.2 GI:105990531 o PCSK9 (NM_174936.3 GI:299523249).

Longitud

Los oligómeros pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos contiguos de un total de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 nucleótidos contiguos en longitud.

En algunos modos de realización, los oligómeros comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos contiguos de un total de 10-22, tal como 12-18, tal como 13-17 o 12-16, tal como 13, 14, 15, 16 nucleótidos contiguos en longitud.

En algunos modos de realización, los oligómeros comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos contiguos de un total de 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos contiguos en longitud.

En algunos modos de realización, el oligómero de acuerdo con la invención consiste en no más de 22 nucleótidos, tal como no más de 20 nucleótidos, tal como no más de 18 nucleótidos, tal como 15, 16 o 17 nucleótidos. En algunos modos de realización, el oligómero de la invención comprende menos de 20 nucleótidos. Debe entenderse que cuando se proporciona un intervalo para un oligómero, o una longitud de una secuencia de nucleótidos contiguos, incluye las longitudes más baja y más alta proporcionadas en el intervalo, por ejemplo, desde (o entre) 10-30, incluye tanto 10 como 30.

Nucleósidos y análogos nucleosídicos

El término "nucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a un glucósido que comprende un resto glucídico (o un análogo del mismo), un resto de base y un grupo unido covalentemente (grupo de enlace), tal como un grupo de enlace internucleotídico fosfato o fosforotioato, y cubre tanto nucleótidos naturales, tales como ADN o ARN, como nucleótidos no naturales que comprenden restos glucídicos y/o de bases modificados, que también se

denominan "análogos nucleotídicos" en el presente documento. En el presente documento, un solo nucleótido (unidad) también se puede denominar unidad monomérica o de ácido nucleico.

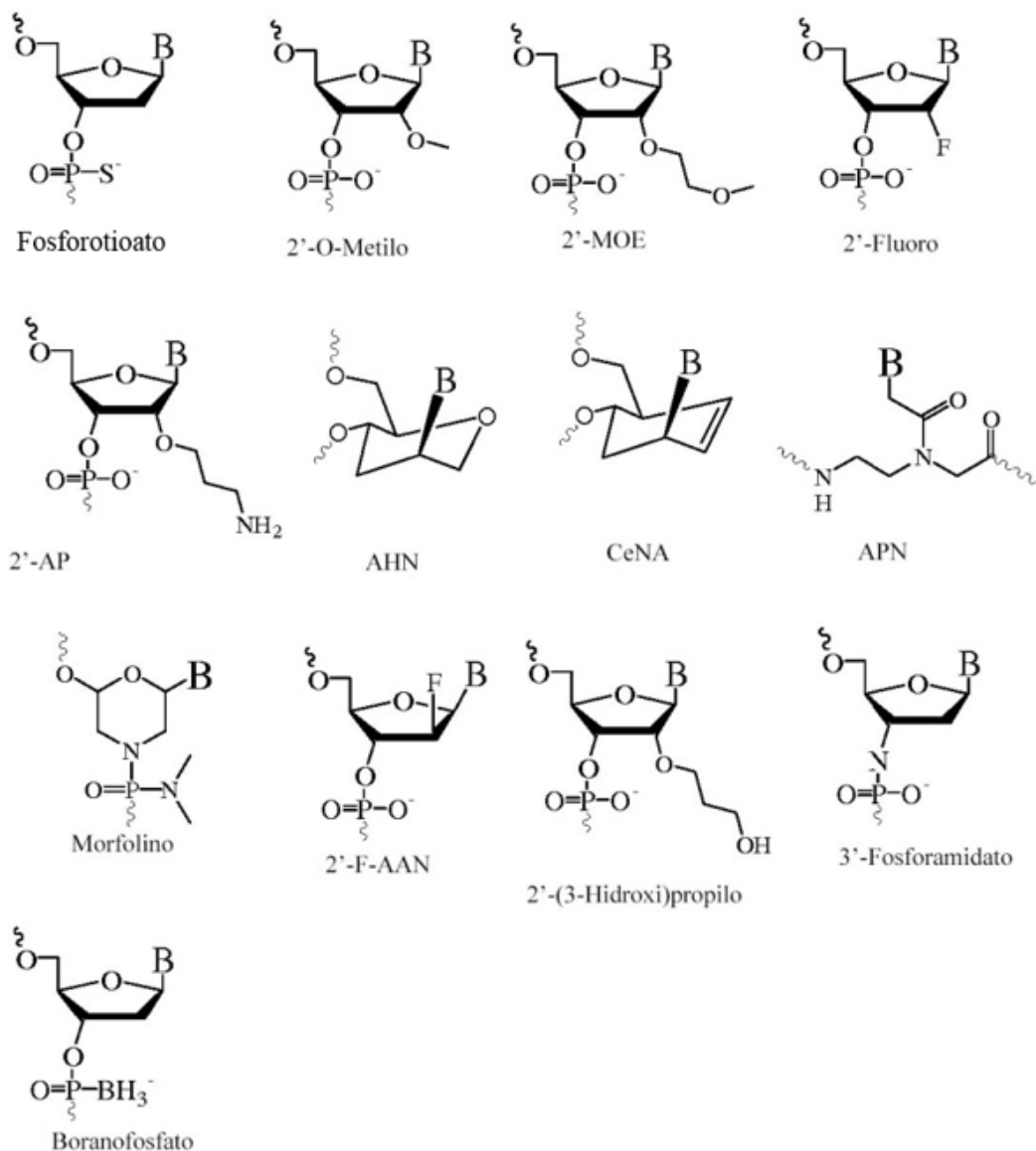
5 Se reconocerá que, en el contexto de la presente invención, el término nucleósido y nucleótido se usan para referirse tanto a nucleótidos/sidos naturales, tales como ADN y ARN, así como a análogos nucleotídicos/sídicos.

10 En el campo de la bioquímica, el término "nucleósido" se usa habitualmente para referirse a un glucósido que comprende un resto glucídico y un resto de base, y, por lo tanto, se puede usar cuando se hace referencia a las unidades de nucleótidos, que se unen covalentemente por los enlaces internucleosídicos entre los nucleótidos del oligómero. En el campo de la biotecnología, el término "nucleótido" se usa a menudo para referirse a un monómero o
15 se puede referir a un "nucleósido", por ejemplo, se puede usar el término "nucleótido", incluso cuando se especifica la presencia o la naturaleza de los enlaces entre los nucleósidos.

20 Como reconocería un experto en la técnica, el nucleótido terminal 5' de un oligonucleótido no comprende un grupo de enlace internucleosídico 5', aunque puede comprender o no un grupo terminal 5'.

Los nucleótidos no naturales incluyen nucleótidos que tienen restos glucídicos modificados, tales como nucleótidos bicíclicos o nucleótidos modificados en 2', tales como nucleótidos sustituidos en 2'.

25 Los "análogos nucleotídicos" son variantes de nucleótidos naturales, tales como nucleótidos de ADN o ARN, en virtud de modificaciones en los restos glucídicos y/o de bases. En principio, los análogos pueden ser simplemente "sinónimos" o "equivalentes" a los nucleótidos naturales en el contexto del oligonucleótido, es decir, no tienen un efecto funcional sobre la forma en que el oligonucleótido actúa para inhibir la expresión génica de la diana. Sin embargo, dichos análogos "equivalentes" pueden ser útiles si, por ejemplo, son más fáciles o más baratos de fabricar, o son más estables en las condiciones de almacenamiento o fabricación, o representan una marca o marcador.
30 Preferentemente, sin embargo, los análogos tendrán un efecto funcional sobre la forma en que el oligómero actúa para inhibir la expresión; por ejemplo, produciendo una mayor afinidad de unión a la diana y/o una mayor resistencia a las nucleasas intracelulares y/o una mayor facilidad de transporte a la célula. Se describen ejemplos específicos de análogos nucleosídicos, por ejemplo, por Freier y Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; *Curr. Opinión in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213, y en el esquema 1
35



Esquema 1

- 5 El oligómero puede, por tanto, comprender o consistir en una secuencia simple de nucleótidos naturales, preferentemente 2'-desoxinucleótidos (denominados en el presente documento, en general, "ADN"), pero también posiblemente ribonucleótidos (denominados en el presente documento, en general, "ARN"), o una combinación de dichos nucleótidos naturales y uno o más nucleótidos no naturales, es decir, análogos nucleotídicos. Dichos análogos nucleotídicos pueden potenciar adecuadamente la afinidad del oligómero por la secuencia diana.
- 10 El documento WO2007/031091 proporciona ejemplos de análogos nucleotídicos adecuados y preferente o se hace referencia a ellos en el mismo. Otros análogos nucleotídicos que se pueden usar en el oligómero de la invención incluyen ácidos nucleicos tricíclicos, por ejemplo, véanse los documentos WO2013154798 y WO2013154798.
- 15 La incorporación de análogos nucleotídicos que potencian la afinidad en el oligómero, tal como LNA o glúcidos sustituidos en 2', puede permitir que se reduzca el tamaño del oligómero de unión específica, y también puede reducir el límite superior al tamaño del oligómero antes de se produzca una unión inespecífica o aberrante.
- 20 Los compuestos oligoméricos, tales como los oligonucleótidos de antisentido, tales como los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo la región A, y en algunos modos de realización opcionales, la región B, pueden contener uno o más nucleósidos en los que se ha modificado el grupo glúcido. Dichos

nucleósidos modificados con glúcidos (análogos nucleosídicos) pueden impartir una estabilidad potenciada de las nucleasas, una mayor afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos de antisentido. En algunos modos de realización, los nucleósidos comprenden un resto de anillo de ribofuranosa modificado químicamente.

En algunos modos de realización, el oligómero, o la primera región del mismo, comprende al menos uno, tal como al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, en al menos 22, al menos 23, al menos 24 o 25 análogos nucleosídicos, tales como análogos nucleosídicos modificados con glúcidos.

Los análogos nucleosídicos bicíclicos incluyen análogos nucleosídicos que comprenden un puente (o birradical) que une el segundo y el cuarto carbono del anillo de ribosa, (puente o birradical C4*-C2*). La presencia del birradical entre el 2.º y el 4.º carbono bloquea la ribosa en una confirmación 3' endo-(norte), y como tales los análogos nucleosídicos bicíclicos con un birradical C2*-C4* se denominan a menudo ácido nucleico bloqueado (LNA). En algunos modos de realización, los análogos nucleosídicos son (opcionalmente seleccionados independientemente del grupo que consiste en análogos nucleosídicos bicíclicos (tales como LNA), y/o análogo nucleosídico sustituidos en 2', tales como (opcionalmente independientemente) seleccionados del grupo que consiste en unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, 2'-AP, 2'-FANA, 2'-(3-hidroxi)propilo, y unidades de 2'-fluoro-ADN, y/u otros (opcionalmente) análogos nucleosídicos modificados con glúcidos tales como morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA), CeNA, ácido nucleico no unido (UNA), ácido hexitol nucleico (HNA), biciclo-HNA (véase, por ejemplo, el documento WO2009/100320). En algunos modos de realización, los análogos nucleosídicos aumentan la afinidad de la primera región por su ácido nucleico diana (o una secuencia de ADN o ARN complementario).

En algunos modos de realización, el oligómero comprende al menos un análogo nucleotídico bicíclico, tal como LNA. En algunos modos de realización, la primera región comprende al menos un análogo nucleosídico bicíclico (por ejemplo, LNA) y/o análogos nucleosídicos sustituidos en 2'. En algunos modos de realización, los análogos nucleosídicos presentes en el oligómero comprenden, todos, la misma modificación glucídica. En algunos modos de realización, al menos un análogo nucleosídico presente en la primera región es un análogo nucleosídico bicíclico, tal como al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, por ejemplo, todos los análogos nucleosídicos (excepto los nucleósidos de ADN y/o ARN de la región B) son análogos nucleosídicos modificados con glúcidos, tales como análogos nucleosídicos bicíclicos, tales como LNA, por ejemplo, beta-DX-LNA o alfa-LX-LNA (en el que X es oxi, amino o tio), u otros LNA divulgados en el presente documento, incluyendo, pero no limitado a, (R/S) cET, cMOE o 5'-Me-LNA.

Los ejemplos de anillos de ribofuranosa modificados químicamente incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes en 5' y 2'); puente de átomos del anillo no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA); reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N(R) o C(R₁)(R₂) (R = H, alquilo C₁-C₂ o un grupo protector); y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de glúcidos modificados químicamente incluyen, nucleósido sustituido con 2'-F-5'-metilo (véase la solicitud internacional PCT WO 2008/101157, publicado el 21/8/08 para otros nucleósidos sustituidos con 5',2'-bis divulgados), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S con otra sustitución en la posición 2' (véase la solicitud de patente estadounidense publicada US2005/0130923, publicada el 16 de junio de 2005), o, de forma alternativa, sustitución en 5' de un BNA (véase la solicitud internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 22/11/07, en la que el LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o 5'-vinilo).

Ejemplos de nucleósidos que tienen restos glucídicos modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprende grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ y 2'-O(CH₂)₂ O CH₃. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, alquilo O-C₁-C₁₀, OCF₃, O (CH₂)₂SCH₃, O (CH₂)₂-O-N(Rm)(Rn) y O-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn), donde cada Rm y Rn es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

Como se usa en el presente documento, "nucleósidos bicíclicos" se refieren a nucleósidos modificados que comprenden un resto glucídico bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo en 4' y 2'. En algunos modos de realización, los compuestos proporcionados en el presente documento incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos en los que el puente comprende un nucleósido bicíclico de 4' a 2'. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos de 4' a 2' incluyen, pero no se limitan a, una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2*, y análogos de los mismos (véase la patente de EE. UU. 7.399.845, expedida el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2', y análogos de la misma (véase la solicitud internacional PCT publicada WO2009/006478, publicada el 8 de enero de 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2', y análogos de la misma (véase, la solicitud internacional PCT publicada WO2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (véase la solicitud de patente de EE. UU. publicada US2004/0171570, publicada el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', en la R es H, alquilo C₁-C₁₀ o un grupo protector (véase, la patente de EE. UU. 7.427.672, expedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (véase Chattopadhyaya, *et al.*, J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2', y análogos de

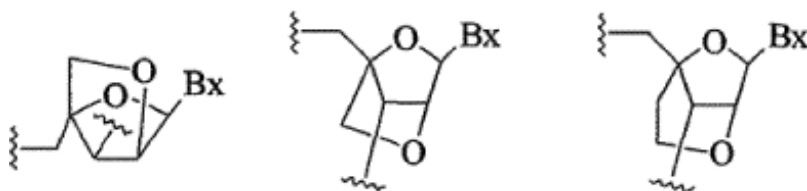
la misma (véase la solicitud internacional PCT publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008). Véase también, por ejemplo: Singh *et al.*, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin *et al.*, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh *et al.*, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 129(26) 8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi *et al.*, Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch *et al.*, Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Oram *et al.*, Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; las patentes de EE. UU. n.º U.S. 6.670.461, 7.053.207, 6.268.490, 6.770.748, 6.794.499, 7.034.133, 6.525.191, 7.399.845; las solicitudes internacionales PCT publicadas WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570 y WO 2007/134181; las publicaciones de patente de EE. UU. n.º US2004/0171570, US2007/0287831, y US2008/0039618; y las patentes de EE. UU. de números de serie 12/129.154, 60/989.574, 61/026.995, 61/026.998, 61/056.564, 61/086.231, 61/097.787, y 61/099.844; y las solicitudes internacionales PCT n.º PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 y PCT/US2008/068922. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores se puede preparar con una o más configuraciones glucídicas estereoquímicas, incluyendo, por ejemplo, a-L-ribofuranosa y beta-D-ribofuranosa (véase la solicitud internacional PCT PCT DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como documento WO 99/14226).

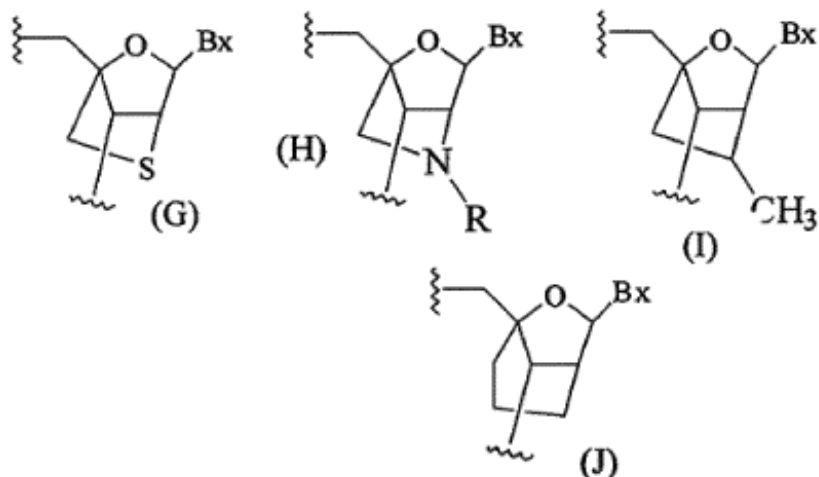
En algunos modos de realización, los restos glucídicos bicíclicos de los nucleósidos de BNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre las posiciones 4' y 2' del resto glucídico pentofuranosilo en los que dichos puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 unidos grupos seleccionados independientemente de $-[C(R_a)X(R_b)]_{1,-}$, $-C(R_a)=C(R_b)-$, $-C(R_a)=N-$, $-C(=NR_a)-$, $-C(=O)-$, $-C(=S)-$, $-O-$, $-Si(R_a)_2-$, $-S(=O)_x-$, and $-N(R_a)-$; en las que: x es 0, 1 o 2; n es 1, 2, 3 o 4; cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenoilo C_2-C_{12} , alquenoilo C_2-C_{12} sustituido, alquinoilo C_2-C_{12} , alquinoilo C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20} , arilo C_5-C_{20} sustituido, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C_5-C_7 , radical alicíclico C_5-C_7 sustituido, halogeno, OJ_1 ; NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $COOJ_1$, acilo ($C(=O)-H$), acilo sustituido, CN, sulfonilo ($S(=O)_2-J_1$), o sulfoxilo ($S(=O)-J_1$); y cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenoilo C_2-C_{12} , alquenoilo C_2-C_{12} sustituido, alquinoilo C_2-C_{12} , alquinoilo C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20} , arilo C_5-C_{20} sustituido, acilo ($C(=O)-H$), acilo sustituido, un radical heterocíclico, un radical heterocíclico sustituido, aminoalquilo C_1-C_{12} , aminoalquilo C_1-C_{12} sustituido, o un grupo protector.

En algunos modos de realización, el puente de un resto glucídico bicíclico es $-[C(R_a)(R_b)]_{n,-}$, $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$, o $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$. En algunos modos de realización, el puente es 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2' y 4'-CH₂-N(R)-O-2', en el que cada R es, independientemente, H, un grupo protector, o alquilo C_1-C_{12} .

En algunos modos de realización, los nucleósidos bicíclicos se definen además por configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2'metileno-oxi, puede estar en la configuración a-L o en la configuración beta-D. Previamente, BNA a-L-metileno-oxi (4'-CH₂-O-2') se habían incorporado a oligonucleótidos de antisentido que mostraban actividad antisentido (Frieden *et al.*, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

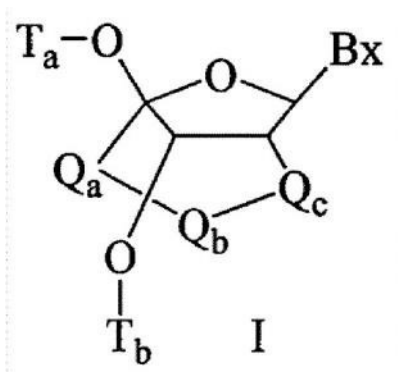
En algunos modos de realización, los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, a-L-metileno-oxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) beta-D-metileno-oxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) etileno-oxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) amino-oxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, (E) oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, (F), metil(metileno-oxi) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA, (G) metileno-tio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) metileno-amino (4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (I) metilo carbocíclico (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA y (J) propileno carbocíclico (4'-(CH₂)₃-2') BNA, como se representa a continuación.





en los que Bx es el resto de base y R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₂.

5 En determinados modos de realización, el nucleósido bicíclico que tiene la fórmula I:



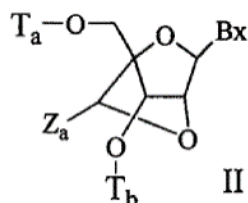
en la que:

10 Bx es un resto de base heterocíclico;
 -Q_a-Q_b-Q_c- is -CH₂-N(R_c)-CH₂-, -C(=O)-N(R_c)-CH₂-, -CH₂-O-N(R_c)-, -CH₂-N(R_c)-O-, o -N(R_c)-O-CH₂;

15 R_c es alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector amino; y

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte.

20 En algunos modos de realización, el nucleósido bicíclico que tiene la fórmula II:



en la que:

25 Bx es un resto de base heterocíclico;

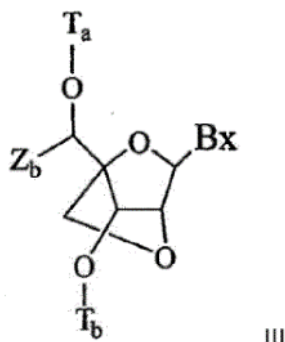
T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo, o una unión covalente a un medio de soporte; Z_a es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tio sustituido.

30

En algunos modos de realización, cada uno de los grupos sustituidos está, independientemente, mono- o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_c , NJ_d , SJ_c , N_3 , $OC(=X)J_c$ y $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$, en los que cada J_c , J_d y J_e es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido y X es O o NJ_c .

5

En algunos modos de realización, el nucleósido bicíclico que tiene la fórmula III:



10

en la que:

Bx es un resto de base heterocíclico;

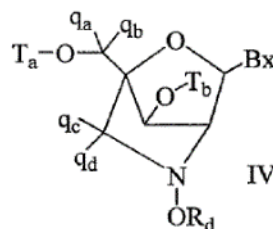
15

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

Z_b es alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 sustituido, o acilo ($C(=O)-$) sustituido.

20

En algunos modos de realización, el nucleósido bicíclico que tiene la fórmula IV:



25

en la que:

Bx es un resto de base heterocíclico;

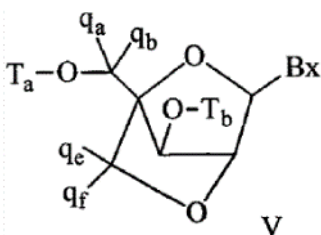
30

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

R_d es alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 sustituido; cada q_b , q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 , o alquino C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6 , alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;

35

En algunos modos de realización, el nucleósido bicíclico que tiene la fórmula V:



en la que:

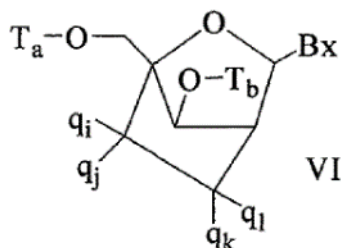
Bx es un resto de base heterocíclico;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte; q_a, q_b, q_c y q_f y son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k o N(H)C(=S)NJ_jJ_k; o q_e y q_f conjuntamente son =C(q_g)(q_h); q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido.

Se ha descrito la síntesis y preparación de los monómeros de metileno (4'-CH₂-O-2') BNA adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con sus propiedades de oligomerización y reconocimiento de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Koshkin *et al.*, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). Los BNA y la preparación de los mismos también se describen en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

También se han preparado análogos de metileno (4'-CH₂-O-2') BNA, metileno (4'-CH₂-O-2') BNA y 2'-tio-BNA (véase, por ejemplo, Kumar *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos nucleosídicos bloqueados que comprenden doble hebra de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para polimerasas de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Wengel *et al.*, documento WO 99/14226). Además, la síntesis de 2'-amino-BNA, un novedoso análogo oligonucleotídico de alta afinidad conformacionalmente restringido, se ha descrito en la técnica (véase, por ejemplo, Singh *et al.*, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino y 2'-metilamino-BNA y se ha informado previamente de la estabilidad térmica de sus dobles hebras con hebras de ARN y ADN complementarias.

En algunos modos de realización, el nucleósido bicíclico tiene la fórmula VI:



en la que:

Bx es un resto de base heterocíclico;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte; cada q_i, q_j, q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₁-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₂-C₁₂ sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k o N(H)C(=S)NJ_jJ_k; y q_i y q_j o q_l y q_k conjuntamente son =C(q_g)(q_h); en el que q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₆ sustituido.

Se han descrito un nucleósido bicíclico carbocíclico que tiene un puente 4'-(CH₂)₃-2' y el análogo de alqueno, 4'-CH=CH-CH₂-2' (véase, por ejemplo, Freier *et al.*, Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443 y Albaek *et al.*, J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-77 '40). También se han descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con sus estudios de oligomerización y bioquímicos (véase, por ejemplo, Srivastava *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379).

Como se usa en el presente documento, "nucleósido bicíclico 4'-2'" o "nucleósido bicíclico 4' a 2'" se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta el átomo de carbono en 2' y el átomo de carbono en 4'.

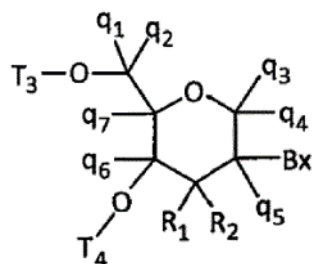
Como se usa en el presente documento, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden restos glucídicos modificados que no son restos glucídicos bicíclicos. En algunos modos de realización, el resto glucídico, o análogo de resto glucídico, de un nucleósido se puede modificar o sustituir en cualquier posición.

Como se usa en el presente documento, "glúcido modificado en 2'" significa un glúcido furanosilo modificado en la posición 2'. En algunos modos de realización, dichas modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados de: un haluro, incluyendo, pero no limitados a, alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido, y alquinilo sustituido y no sustituido. En algunos modos de realización, las modificaciones en 2' se seleccionan de sustituyentes, incluyendo, pero no limitados a: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10.

Otros grupos sustituyentes en 2' también se pueden seleccionar de: alquilo C_1-C_{12} ; alquilo sustituido; alqueno; alquinilo; alcarilo; aralquilo; O-alcarilo u O-aralquilo; SH; SCH_3 ; OCN; Cl; Br; CN; CF_3 ; OCF_3 ; $SOCH_3$; SO_2CH_3 ; ONO_2 ; NO_2 ; N_3 ; NH_2 ; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un R; un grupo de escisión; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas; y un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto de antisentido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunos modos de realización, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE (véase, por ejemplo, Baker *et al.*, J. Biol. Chem., 1997, 272, 1 1944-12000). Dicha sustitución 2'-MOE se ha descrito con una afinidad de unión mejorada en comparación con nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, tales como 2'-O-metilo, O-propilo y O-aminopropilo. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores de antisentido de la expresión génica con características prometedoras para su uso *in vivo* (véase, por ejemplo, Martin, P., *He/v. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann *et al.*, *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; y Altmann *et al.*, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).

Como se usa en el presente documento, un "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido de THP modificado" significa un nucleósido que tiene un "glúcido" de tetrahidropirano de seis miembros sustituido por el residuo pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sustituto glúcido). Los nucleósidos de THP modificados incluyen, pero no se limitan a, lo que se denomina en la técnica ácido nucleico hexitilo (HNA), ácido nucleico anitilo (ANA), ácido nucleico manitilo (MNA) (véase Leumann, C.J. *Bioorg. and Med. Chem.* (2002) 10:841-854), flúor HNA (F-HNA), o aquellos compuestos que tienen la fórmula X:

Fórmula



X en la que independientemente para cada uno de dichos al menos un análogo nucleosídico de tetrahidropirano de fórmula X:

Bx es un resto de base heterocíclico;

T_3 y T_4 son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo nucleosídico de tetrahidropirano al compuesto de antisentido o uno de T_3 y T_4 es un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo nucleosídico de tetrahidropirano al compuesto de antisentido y el otro de T_3 y T_4 es H, un grupo protector hidroxilo, un grupo de conjugado unido, o un grupo 5' o 3' terminal; q_1 q_2 q_3 q_4 q_5 , q_6 y q_7 son cada uno, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido; y uno de R_1 y R_2 es hidrógeno y el otro se selecciona de halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ, J_2 , SJ, N_3 , $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ y CN, en los que X es O, S o NJ_1 y cada J_1 , J_2 y J_3 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_6 .

En algunos modos de realización, se proporcionan los nucleósidos de THP modificados de fórmula X en los que q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t y q_u son cada uno H. En algunos modos de realización, al menos uno de q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t y q_u es distinto de H. En algunos modos de realización, al menos uno de q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t y q_u es metilo. En algunos modos de realización, se proporcionan nucleósidos de THP de fórmula X en los que uno de R_1 y R_2 es F. En algunos modos de realización, R_1 es flúor y R_2 es H, R_1 es metoxi y R_2 es H, y R_1 es metoxietoxi y R_2 es H.

Como se usa en el presente documento, "modificado en 2'" o "sustituido en 2'" se refiere a un nucleósido que comprende un glúcido que comprende un sustituyente en la posición 2' diferente de H u OH. Los nucleósidos modificados en 2', incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos con sustituyentes en 2' sin puente, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, alquil O- C_1-C_{10} , $-OCF_3$, $O-(CH_2)_2-O-CH_3$, $2'-O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ u O- CH_2-

$C(=O)-N(R_m)(R_n)$, donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido. Los nucleósidos modificados en 2' pueden comprender además otras modificaciones, por ejemplo, en otras posiciones del glúcido y/o en la nucleobase.

5 Como se usa en el presente documento, "2'-F" se refiere a un glúcido que comprende un grupo flúor en la posición 2'.

Como se usa en el presente documento, "2'-OMe" o "2'-OCH₃" o "2'-O-metilo" se refiere a un nucleósido que comprende un glúcido que comprende un grupo -OCH₃ en la posición 2' del anillo glucídico.

10 Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos.

En algunos modos de realización, se modifica uno o más de la pluralidad de nucleósidos. En algunos modos de realización, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

15 También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillos glucídicos sustitutos bicíclicos y tricíclicos y se pueden usar para modificar nucleósidos para su incorporación a compuestos de antisentido (véase, por ejemplo, el artículo de revisión: Leumann, J. C, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854). Dichos sistemas de anillo pueden sufrir diversas sustituciones adicionales para potenciar su actividad. Los procedimientos para la eliminación de glúcidos modificados son bien conocidos por los expertos en la técnica. En nucleótidos que tienen restos glucídicos modificados, los restos de nucleobase (naturales, modificados o una combinación de los mismos) se mantienen para su hibridación con una diana de ácido nucleico apropiada.

25 En algunos modos de realización, los compuestos de antisentido comprenden uno o más nucleótidos que tienen restos glucídicos modificados. En algunos modos de realización, el resto glucídico modificado es 2'-MOE. En algunos modos de realización, los nucleótidos modificados en 2'-MOE están dispuestos en un motivo de gámpero. En algunos modos de realización, el resto glucídico modificado es un cEt. En algunos modos de realización, los nucleótidos modificados en cEt están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo de gámpero.

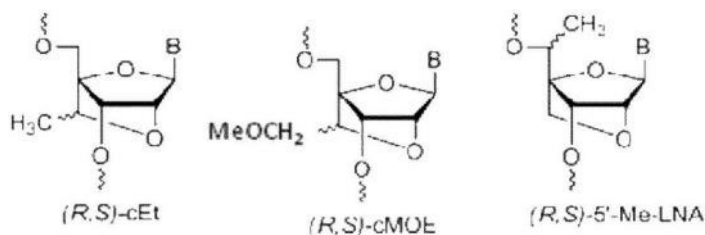
30 En algunos modos de realización, en el BNA (LNA), R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente el birradical $-O-CH(CH_2OCH_3)-$ (ácido nucleico bicíclico 2'O-metoxietilo - Seth *et al.*, 2010, J. Org. Chem), en la configuración R- o S-.

En algunos modos de realización, en el BNA (LNA), R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente el birradical $-O-CH(CH_2CH_3)-$ (ácido nucleico bicíclico 2'O-etilo - Seth *et al.*, 2010, J. Org. Chem), en la configuración R- o S-.

35 En algunos modos de realización, en el BNA (LNA), R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente el birradical $-O-CH(CH_3)-$, en la configuración R- o S-. En algunos modos de realización, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente el birradical $-O-CH_2-O-CH_2-$ (Seth *et al.*, 2010, J. Org. Chem).

40 En algunos modos de realización, en el BNA (LNA), R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente el birradical $-O-NR-CH_3-$ (Seth *et al.*, 2010, J. Org. Chem).

En algunos modos de realización, las unidades LNA tienen una estructura seleccionada del siguiente grupo:



45 El oligómero puede, por tanto, comprender o consistir en una secuencia simple de nucleótidos naturales, preferentemente 2'-desoxinucleótidos (denominados en el presente documento, en general, "ADN"), pero también posiblemente ribonucleótidos (denominados en el presente documento, en general, "ARN"), o una combinación de dichos nucleótidos naturales y uno o más nucleótidos no naturales, es decir, análogos nucleotídicos. Dichos análogos nucleotídicos pueden potenciar adecuadamente la afinidad del oligómero por la secuencia diana.

50 La incorporación de análogos nucleotídicos que potencian la afinidad en el oligómero, tal como BNA, (por ejemplo) LNA o glúcidos sustituidos en 2', puede permitir que se reduzca el tamaño del oligómero de unión específica, y también puede reducir el límite superior al tamaño del oligómero antes de se produzca una unión inespecífica o aberrante.

55 En algunos modos de realización, el oligómero comprende al menos 1 análogo nucleosídico. En algunos modos de realización, el oligómero comprende al menos 2 análogos nucleotídicos. En algunos modos de realización, el

oligómero comprende de 3-8 análogos nucleotídicos, por ejemplo, 6 o 7 análogos nucleotídicos. En los modos de realización más preferentes con diferencia, al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es un BNA, tal como ácido nucleico bloqueado (LNA); por ejemplo, al menos 3 o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, u 8, de los análogos nucleotídicos pueden ser BNA, tal como LNA. En algunos modos de realización, todos los análogos nucleotídicos pueden ser BNA, tal como LNA.

Se reconocerá que, cuando se hace referencia a un motivo de secuencia de nucleótidos o secuencia de nucleótidos preferentes, que consiste solo en nucleótidos, los oligómeros de la invención que están definidos por esa secuencia pueden comprender un análogo nucleotídico correspondiente en lugar de uno o más de los nucleótidos presentes en dicha secuencia, tales como unidades de BNA u otros análogos nucleotídicos, que elevan la estabilidad de la doble hebra/ T_m de la doble hebra de oligómero/diana (es decir, análogos nucleotídicos que potencian la afinidad).

Un análogo nucleotídico preferente es LNA, tal como oxi-LNA (tal como beta-D-oxi-LNA y alfa-L-oxi-LNA), y/o amino-LNA (tal como beta-D-amino-LNA y alfa-L-amino-LNA) y/o tio-LNA (tal como beta-D-tio-LNA y alfa-L-tio-LNA) y/o ENA (tal como beta-D-ENA y alfa-L-ENA). El más preferente es el beta-D-oxi-LNA.

En algunos modos de realización, los análogos nucleotídicos presentes dentro del oligómero de la invención se seleccionan independientemente de, por ejemplo: unidades de 2'-O-alquil-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de BNA, por ejemplo, unidades de LNA, unidades de ácido nucleico arabino (ANA), unidades de 2'-fluoro-ANA, unidades de HNA, unidades de INA (ácido nucleico intercalante - Christensen, 2002. Nucl. Acids Res. 2002 30: 4918-4925) y unidades de 2'MOE. En algunos modos de realización, solo hay uno de los tipos anteriores de análogos nucleotídicos presentes en el oligómero de la invención, tal como la primera región, o la secuencia de nucleótidos contiguos de la misma.

En algunos modos de realización, los análogos nucleotídicos son 2'-O-metoxietilo (2'MOE), monómeros de 2'-fluoro-ADN o análogos nucleotídicos de LNA, y como tal, el oligonucleótido de la invención puede comprender análogos nucleotídicos que se seleccionan independientemente de estos tres tipos de análogos, o pueden comprender solo un tipo de análogo seleccionado de los tres tipos. En algunos modos de realización, al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es 2'-MOE-ARN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de nucleótidos de 2'-MOE-ARN. En algunos modos de realización, al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es 2'-fluoro ADN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de nucleótidos de 2'-fluoro-ADN.

En algunos modos de realización, el oligómero de acuerdo con la invención comprende al menos un BNA, por ejemplo, una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA), tal como 1,2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de BNA/LNA, tal como de 3-7 o de 4 a 8 unidades de BNA/LNA, o 3, 4, 5, 6 o 7 unidades de BNA/LNA. En algunos modos de realización, todos los análogos nucleotídicos son BNA, tal como LNA. En algunos modos de realización, el oligómero puede comprender tanto beta-D-oxi-LNA y una o más de las siguientes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA y/o ENA en cualquiera de las configuraciones beta-D o alfa-L o combinaciones de las mismas. En algunos modos de realización, todos los BNA, tales como LNA, las unidades de citosina son 5-metil-citosina. En algunos modos de realización de la invención, el oligómero (tal como la primera y opcionalmente la segunda regiones) puede comprender tanto unidades de BNA y LNA como de ADN. En algunos modos de realización, el total combinado de unidades de LNA y ADN es de 10-25, tal como 10-24, preferentemente 10-20, tal como 10-18, tal como 12-16. En algunos modos de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos del oligómero, de la primera región del mismo, tal como la secuencia de nucleótidos contiguos, consiste en al menos un BNA, por ejemplo, LNA y las unidades de nucleótidos restantes son unidades de ADN. En algunos modos de realización, el oligómero, o la primera región del mismo, comprende solo BNA, por ejemplo, LNA, análogos nucleotídicos y nucleótidos naturales (tales como ARN o ADN, lo más preferentemente nucleótidos de ADN), opcionalmente con enlaces internucleotídicos modificados tales como fosforotioato.

El término "nucleobase" se refiere al resto de base de un nucleótido y cubre tanto las variantes naturales como las no naturales. Por tanto, "nucleobase" cubre no solo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también los análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Se reconocerá que los nucleósidos de ADN o ARN de la región B pueden tener una o más nucleobases naturales y/o no naturales.

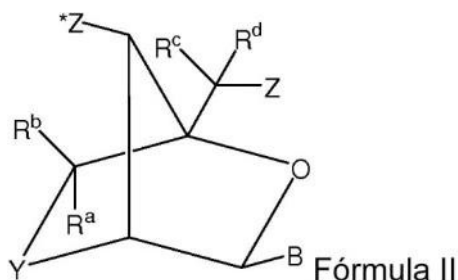
Los ejemplos de nucleobases incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina, hipoxantina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopiclina, 2-aminopirina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina. En algunos modos de realización, las nucleobases se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, 5-metilcitosina. En algunos modos de realización, las nucleobases se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en adenina, guanina, citosina, timidina y 5-metilcitosina.

En algunos modos de realización, al menos una de las nucleobases presentes en el oligómero es una nucleobase modificada seleccionada del grupo que consiste en 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

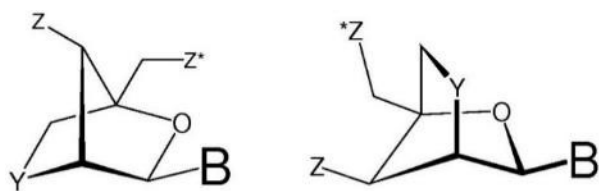
LNA

5 El término "LNA" se refiere a un análogo nucleosídico bicíclico que comprende un birradical C2*-C4* (un puente), y se conoce como "ácido nucleico bloqueado". Se puede referir a un monómero de LNA o, cuando se usa en el contexto de un "oligonucleótido de LNA", LNA se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más de dichos análogos nucleosídicos bicíclicos. En algunos aspectos, los análogos nucleosídicos bicíclicos son nucleótidos de LNA y, por lo tanto, estos términos se pueden usar de manera intercambiable, y en dichos modos de realización, ambos se caracterizan por la presencia de un grupo conector (tal como un puente) entre C2' y C4' de un anillo glucídico de ribosa.

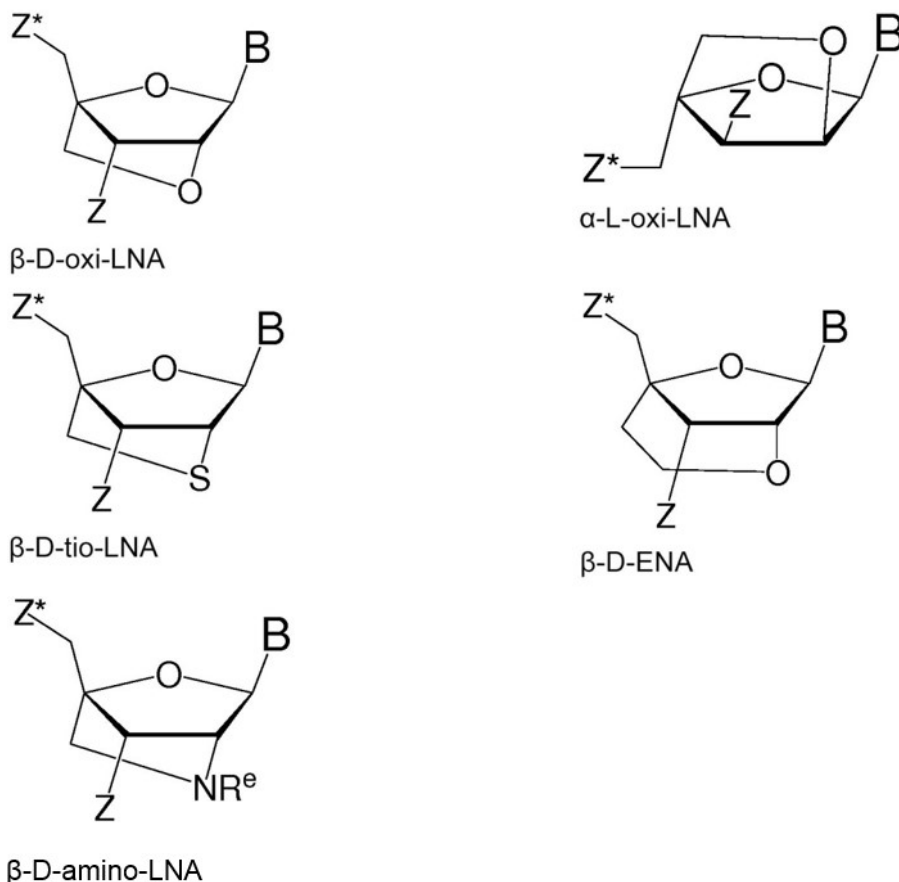
10 En algunos modos de realización, el LNA usado en los compuestos oligonucleotídicos de la invención tiene preferentemente la estructura de la fórmula general II:



15 en la que Y se selecciona del grupo que consiste en -O-, -CH₂O-, -S-, -NH-, N(R^e) y/o -CH₂-; Z y Z* se seleccionan independientemente entre un enlace internucleotídico, R^H, un grupo terminal o un grupo protector; B constituye un resto de base de nucleótidos natural o no natural (nucleobase), y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄; R^a, R^b, R^c, R^d y R^e se seleccionan, opcionalmente independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂, opcionalmente sustituido alquénilo C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquínilo C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C₁₋₁₂, alcoxialquilo C₂₋₁₂, alquénilo C₂₋₁₂, carboxi, alcóxicarbonilo C₁₋₁₂, alquilcarbonilo C₁₋₁₂, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(alquil-C₁₋₆)amino, carbamoilo, mono- y di(alquil-C₁₋₆)-amino-carbonilo, amino-alquil-C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y di(alquil-C₁₋₆)amino-alquil-C₁₋₆-aminocarbonilo, alquil-C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanóilo C₁₋₆, sulfono, alquilsulfonilo C₁₋₆, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C₁₋₆, halógeno, intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos y donde dos sustituyentes geminales R^a y R^b conjuntamente pueden designar metileno (=CH₂) opcionalmente sustituido; y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄. En algunos modos de realización, R^a, R^b, R^c, R^d y R^e se seleccionan, opcionalmente independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁₋₆, tal como metilo. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos se pueden encontrar en orientación R o S, por ejemplo, dos isómeros estereoquímicos ejemplares incluyen las isoformas beta-D y alfa-L, que se pueden ilustrar de la siguiente manera:



35 Las unidades LNA ejemplares específicas se muestran a continuación:



El término "tio-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior se selecciona de S o $-\text{CH}_2\text{-S}-$. El tio-LNA puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

5 El término "amino-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior se selecciona de $-\text{N}(\text{H})-$, $\text{N}(\text{R})-$, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{H})-$ o $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{R})-$, donde R se selecciona de hidrógeno y alquilo C_{1-4} . El amino-LNA puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

10 El término "oxi-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior representa $-\text{O}-$. El oxi-LNA puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

15 El término "ENA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior es $-\text{CH}_2\text{-O}-$ (donde el átomo de oxígeno de $-\text{CH}_2\text{-O}-$ está unido a la posición 2' en relación con la base B). R^e es hidrógeno o metilo.

En algunos modos de realización ejemplares, el LNA se selecciona de beta-D-oxi-LNA, alfa-L-oxi-LNA, beta-D-amino-LNA y beta-D-tio-LNA, en particular beta-D-oxi-LNA.

Reclutamiento de RNasa

20 Se reconoce que un compuesto oligomérico puede funcionar por medio de la degradación no mediada por la RNasa del ARNm diana, tal como por impedimento estérico de la traducción, u otros procedimientos. En algunos modos de realización, los oligómeros de la invención pueden reclutar una endorribonucleasa (RNasa), tal como una RNasa H.

25 Es preferente que dichos oligómeros, tales como la región A, o la secuencia de nucleótidos contiguos, comprendan una región de al menos 6, tal como al menos 7 unidades de nucleótidos consecutivas, tal como al menos 8 o al menos 9 unidades de nucleótidos consecutivos (residuos), incluyendo 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos consecutivos que, cuando se forman en una doble hebra con el ARN diana complementario, pueden reclutar RNasa. La secuencia contigua que puede reclutar RNasa puede ser la región Y' a la que se hace referencia en el contexto de un gámpero como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, el tamaño de la secuencia contigua que puede reclutar RNasa, tal como la región Y', puede ser mayor, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de nucleótidos.

30

El documento EP 1 222 309 proporciona procedimientos *in vitro* para determinar la actividad de la RNasa H, que se pueden usar para determinar la capacidad de reclutar la RNasa H. Se considera que un oligómero puede reclutar RNasa H si, cuando está provisto de la diana de ARN complementario, tiene una tasa inicial, medida en pmol//min, de al menos un 1 %, tal como al menos un 5 %, tal como al menos un 10 % o más de un 20 % de la tasa inicial determinada usando oligonucleótido solo de ADN, que tiene la misma secuencia de bases pero que contiene solo monómeros de ADN, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los monómeros en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por el ejemplo 91-95 del documento EP 1 222 309.

En algunos modos de realización, se considera que un oligómero esencialmente no puede reclutar RNasa H si, cuando está provista de la diana de ARN complementario, y RNasa H, la tasa inicial de RNasa H, medida en pmol//min, es de menos de un 1 %, tal como menos de un 5 %, tal como menos de un 10 % o menos de un 20 % de la tasa inicial determinada usando el oligonucleótido solo de ADN equivalente, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por el ejemplo 91-95 del documento EP 1 222 309.

En otros modos de realización, se considera que un oligómero puede reclutar RNasa H si, cuando está provista de la diana de ARN complementario, y RNasa H, la tasa inicial de RNasa H, medida en pmol//min, es al menos un 20 %, tal como al menos un 40 %, tal como al menos un 60 %, tal como al menos un 80 % de la tasa inicial determinada usando el oligonucleótido solo de ADN equivalente, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por el ejemplo 91-95 del documento EP 1 222 309.

Típicamente, la región del oligómero que forma las unidades de nucleótidos consecutivas que, cuando se forma en una doble hebra con el ARN diana complementario puede reclutar RNasa, consiste en unidades de nucleótidos que forman una doble hebra de tipo ADN/ARN con la diana de ARN. El oligómero de la invención, tal como la primera región, puede comprender una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos y análogos nucleotídicos, y puede estar, por ejemplo, en forma de un gápmero, un headmero o un míxmero.

Un "headmero" se define como un oligómero que comprende una región X' y una región Y' que es contigua a la misma, con el monómero más en 5' de la región Y' unido al monómero más en 3' de la región X'. La región X' comprende un tramo contiguo de análogo nucleosídico que no recluta RNasa y la región Y' comprende un tramo contiguo (tal como al menos 7 monómeros contiguos) de monómeros de ADN o monómeros de análogos nucleosídicos reconocibles y escindibles por la RNasa.

Un "tailmero" se define como un oligómero que comprende una región X' y una región Y' que es contigua a la misma, con el monómero más en 5' de la región Y' unido al monómero más en 3' de la región X'. La región X' comprende un tramo contiguo (tal como al menos 7 monómeros contiguos) de monómeros de ADN o monómeros de análogos nucleosídicos reconocibles y escindibles por la RNasa, y la región Y' comprende un tramo contiguo de análogos nucleosídicos que no reclutan RNasa.

Otros oligómeros "quiméricos", llamados "míxmeros", consisten en una composición alterna de (i) monómeros de ADN o monómeros de análogos nucleosídicos reconocibles y escindibles por RNasa, y (ii) monómeros de análogos nucleosídicos que no reclutan RNasa.

En algunos modos de realización, además de potenciar la afinidad del oligómero por la región diana, algunos análogos nucleosídicos también median la unión y escisión de la RNasa (por ejemplo, la RNasa H). Dado que los monómeros de α -L-LNA (BNA) reclutan la actividad de la RNasa H en determinada medida, en algunos modos de realización, las regiones de interrupción (por ejemplo, la región Y' como se denomina en el presente documento) de oligómeros que contienen monómeros de α -L-LNA consisten en menos monómeros reconocibles escindible por la RNasa H, y se introduce más flexibilidad en la construcción del míxmero.

Diseño de gápmeros

En algunos modos de realización, el oligómero de la invención, tal como la primera región, comprende o es un gápmero. Un oligómero gápmero es un oligómero que comprende un tramo contiguo de nucleótidos que puede reclutar una RNasa, tal como la RNasa H, tal como una región de al menos 6 o 7 nucleótidos de ADN, denominada en el presente documento región Y' (Y'), en la que la región Y' está flanqueada tanto en 5' como en 3' por regiones de análogos nucleotídicos que potencian la afinidad, tales como de 1-6 análogos nucleotídicos 5' y 3' al tramo contiguo de nucleótidos que puede reclutar RNasa; estas regiones se denominan regiones X' (X') y Z' (Z'), respectivamente. En los documentos WO2004/046160, WO2008/113832 y WO2007/146511 se divulgan ejemplos de gápmeros.

En algunos modos de realización, los monómeros que pueden reclutar RNasa se seleccionan del grupo que consiste en monómeros de ADN, monómeros alfa-L-LNA, monómeros de ADN alquilados en C4' (véase el documento WO2009/090182 y Vester *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296-2300), y nucleótidos de UNA (ácido nucleico no unido) (véase Fluiter *et al.*, Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039). El UNA es un ácido nucleico desbloqueado, típicamente donde se ha eliminado el enlace C2-C3 C-C de la ribosa, formando un residuo "glucídico" desbloqueado.

- Preferentemente, el gápmero comprende una secuencia de (poli)nucleótidos de fórmula (5' a 3'), X'-Y'-Z', en la que la región X' (X') (región 5') consiste en o comprende al menos un análogo nucleotídico, tal como al menos una unidad de BNA (por ejemplo, LNA), tal como de 1-6 análogos nucleotídicos, tal como, por ejemplo, unidades de BNA (por ejemplo, LNA); y la región Y' (Y') consiste en o comprende al menos cinco nucleótidos consecutivos que pueden reclutar RNasa (cuando se forman en una doble hebra con una molécula de ARN complementario, tal como la diana de ARNm), tal como nucleótidos de ADN; y la región Z' (Z') (región 3') consiste en o comprende al menos un análogo nucleotídico, tal como al menos un BNA (por ejemplo, unidad de LNA), tal como de 1-6 análogos nucleotídicos, tal como unidades de BNA (por ejemplo, LNA).
- En algunos modos de realización, la región X' consiste en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 análogos nucleotídicos, tales como unidades BNA (por ejemplo, LNA), tales como 2-5 análogos nucleotídicos, tales como 2-5 unidades de LNA, tales como como 3 o 4 análogos nucleotídicos, tales como 3 o 4 unidades de LNA; y/o la región Z' consiste en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 análogos nucleotídicos, tales como unidades de BNA (por ejemplo, LNA), tales como de 2-5 análogos nucleotídicos, tales como 2-5 BNA (por ejemplo, unidades de LNA), tales como 3 o 4 análogos nucleotídicos, tales como 3 o 4 unidades de BNA (por ejemplo, LNA).
- En algunos modos de realización, Y' consiste en o comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos consecutivos que pueden reclutar RNasa, o de 6-10, o de 7-9, tal como 8 nucleótidos consecutivos que pueden reclutar RNasa. En algunos modos de realización, la región Y' consiste en o comprende al menos una unidad de nucleótidos de ADN, tal como 1-12 unidades de ADN, preferentemente de 4-12 unidades de ADN, más preferentemente de 6-10 unidades de ADN, tal como de 7-10 unidades de ADN, lo más preferentemente 8, 9 o 10 unidades de ADN.
- En algunos modos de realización, la región X' consiste en 3 o 4 análogos nucleotídicos, tales como BNA (por ejemplo, LNA), la región X' consiste en 7, 8, 9 o 10 unidades de ADN, y la región Z' consiste en 3 o 4 análogos nucleotídicos, tales como BNA (por ejemplo, LNA). Dichos diseños incluyen (X'-Y'-Z') 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3.
- Otros diseños de gápmeros se divulgan en el documento WO2004/046160. El documento WO2008/113832, que reivindica prioridad respecto a la solicitud provisional de EE. UU. 60/977.409, se refiere a oligómeros gápmeros 'más cortos'. En algunos modos de realización, los oligómeros presentados en el presente documento pueden ser dichos gápmeros más cortos.
- En algunos modos de realización, el oligómero, por ejemplo, la región X', consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos de un total de 10, 11, 12, 13 o 14 unidades de nucleótidos, en el que la secuencia de nucleótidos contiguos comprende o tiene la fórmula (5'-3') X'-Y'-Z', en la que X' consiste en 1, 2 o 3 unidades de análogos nucleotídicos, tales como unidades de BNA (por ejemplo, LNA); Y' consiste en 7, 8 o 9 unidades de nucleótidos contiguos que pueden reclutar RNasa cuando se forman en una doble hebra con una molécula de ARN complementario (tal como una diana de ARNm); y Z' consiste en 1, 2 o 3 unidades de análogos nucleotídicos, tales como unidades de BNA (por ejemplo, LNA).
- En algunos modos de realización, X' consiste en 1 unidad de BNA (por ejemplo, LNA). En algunos modos de realización, X' consiste en 2 unidades de BNA (por ejemplo, LNA). En algunos modos de realización, X' consiste en 3 unidades de BNA (por ejemplo, LNA). En algunos modos de realización, Z' consiste en 1 unidad de BNA (por ejemplo, LNA). En algunos modos de realización, Z' consiste en 2 unidades de BNA (por ejemplo, LNA). En algunos modos de realización, Z' consiste en 3 unidades de BNA (por ejemplo, LNA). En algunos modos de realización, Y' consiste en 7 unidades de nucleótidos. En algunos modos de realización, Y' consiste en 8 unidades de nucleótidos. En algunos modos de realización, Y' consiste en 9 unidades de nucleótidos. En determinados modos de realización, la región Y' consiste en 10 monómeros de nucleósidos. En determinados modos de realización, la región Y' consiste en o comprende 1-10 monómeros de ADN. En algunos modos de realización, Y' comprende de 1-9 unidades de ADN, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades de ADN. En algunos modos de realización, Y' consiste en unidades de ADN. En algunos modos de realización, Y' comprende al menos una unidad de BNA que está en la configuración alfa-L, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades de LNA en la configuración alfa-L. En algunos modos de realización, Y' comprende al menos una unidad de BNA/LNA alfa-L-oxi o en la que todas las unidades de LNA en la configuración alfa-L son unidades alfa-L-oxi-LNA. En algunos modos de realización, el número de nucleótidos presentes en X'-Y'-Z' se selecciona del grupo que consiste en (unidades de análogos nucleotídicos - región Y' - unidades de análogos nucleotídicos): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, o; 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, o; 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1. En algunos modos de realización, el número de nucleótidos en X'-Y'-Z' se selecciona del grupo que consiste en: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 y 4-7-3. En determinados modos de realización, cada una de las regiones X' e Y' consiste en tres monómeros de BNA (por ejemplo, LNA), y la región Y' consiste en 8 o 9 o 10 monómeros de nucleósidos, preferentemente monómeros de ADN. En algunos modos de realización, tanto X' como Z' consisten en dos unidades de BNA (por ejemplo, LNA) cada una, e Y' consta de 8 o 9 unidades de nucleótidos, preferentemente unidades de ADN. En diversos modos de realización, otros diseños de gápmeros incluyen aquellos donde las regiones X' y/o Z' consisten en 3, 4, 5 o 6 análogos nucleosídicos, tales como monómeros que contienen un glúcido 2'-O-metoxietil-ribose (2'-MOE) o monómeros que contienen un glúcido 2'-fluoro-desoxirribose, y la región Y' consiste en 8, 9, 10, 11 o 12 nucleósidos,

tales como monómeros de ADN, donde las regiones X'-Y'-Z' tienen 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 o 4-12-4 monómeros. En el documento WO2007/146511A2 se divulgan otros diseños de gápmers.

Oligómeros con conmutación de empalme

En algunos modos de realización, el oligonucleótido de antisentido es un oligómero con conmutación de empalme, es decir, un oligómero que se dirige al preARNm provocando un empalme alternativo del preARNm.

Las dianas para el oligómero con conmutación de empalme pueden incluir el receptor de TNF, por ejemplo, el SSO puede ser uno o más de los SSO de TNFR divulgados en los documentos WO2007/058894, WO08051306 A1 y WO2008/131807.

Los oligómeros de conmutación de empalme típicamente (esencialmente) no pueden reclutar RNasa H y, como tales, los diseños de gápmers, tailmers o headmers no son, en general, deseables. Sin embargo, los diseños de míxmeros y totálmeros son diseños adecuados para SSO.

Los oligómeros de conmutación de empalme también se han usado para dirigirse a la deficiencia de distrofina en la distrofia muscular de Duchenne.

Míxmeros

La mayoría de los oligonucleótidos de antisentido son compuestos que están diseñados para reclutar enzimas RNasa (como la RNasa H) para degradar su diana pretendida. Dichos compuestos incluyen oligonucleótidos de fosforotioato de ADN y gápmers, headmers y tailmers. Estos compuestos típicamente comprenden una región de al menos 5 o 6 nucleótidos de ADN, y en el caso de los gápmers están flanqueados en cada lado por análogos nucleotídicos que potencian la afinidad.

Los oligómeros de la presente invención pueden funcionar por medio de un mecanismo independiente de RNasa (tal como RNasa H). Ejemplos de oligómeros que funcionan por medio de un mecanismo distinto de la RNasa H (o de la RNasa) son míxmeros y totálmeros.

El término "míxmero" se refiere a oligómeros que comprenden nucleótidos tanto naturales como no naturales, donde, a diferencia de los gápmers, los tailmers y los headmers, no existe ninguna secuencia contigua de más de 5, y en algunos modos de realización no más de 4 nucleótidos consecutivos, tales como no más de tres consecutivos naturales, tales como unidades de ADN. En algunos modos de realización, el míxmero no comprende más de 5 análogos nucleosídicos consecutivos, tales como BNA (LNA), y en algunos modos de realización no más de 4 análogos nucleosídicos consecutivos, tales como no más de tres consecutivos, tales como BNA (LNA). En dichos míxmeros, los nucleósidos restantes pueden, por ejemplo, ser nucleósidos de ADN, y/o en análogos nucleosídicos no bicíclicos, tales como a los que se hace referencia en el presente documento, por ejemplo, análogos nucleosídicos sustituidos en 2', tales como 2'-O-MOE y o 2'fluoro.

El oligómero de acuerdo con la invención puede ser míxmero; de hecho, varios diseños de míxmeros son altamente eficaces como oligómero o la primera región del mismo, en particular cuando se dirigen a microARN (antimiR), sitios de unión a microARN en ARNm (Blockmir) o como oligómeros con conmutación de empalme (SSO). Véase, por ejemplo, el documento WO2007/112754 (LNA-AntimiR™), el documento WO2008/131807 (oligos con conmutación de empalme de LNA).

En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero puede estar compuesto por BNA y análogos nucleosídicos sustituidos en 2', opcionalmente con nucleósidos de ADN; véanse, por ejemplo, los documentos WO07027894 y WO2007/112754. Los ejemplos específicos incluyen oligómeros o primeras regiones que comprenden LNA, 2'-O-MOE y DNA, LNA, 2'fluoro y 2'-O-MOE, 2'-O-MOE y 2'fluoro, 2'-O-MOE. y 2'fluoro y LNA, o LNA y 2'-O-MOE y LNA y ADN.

En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos de patrón de repetición de análogo nucleotídico y nucleótidos naturales, o un tipo de análogo nucleotídico y un segundo tipo de análogos nucleotídicos. El patrón de repetición puede ser, por ejemplo, que cada segundo o cada tercer nucleótido sea un análogo nucleotídico, tal como BNA (LNA), y los nucleótidos restantes son nucleótidos naturales, tal como ADN, o son un análogo nucleotídico sustituido en 2', tal como 2'MOE de análogos 2'fluoro como a los que se hace referencia en el presente documento, o, en algunos modos de realización seleccionados, forman los grupos de análogos nucleotídicos a los que se hace referencia en el presente documento. Se reconoce que el patrón de repetición de análogos nucleotídicos, tales como unidades de LNA, se puede combinar con análogos nucleotídicos en posiciones fijas, por ejemplo, en los extremos 5' o 3'.

En algunos modos de realización, el primer nucleótido del oligómero o míxmero, contando desde el extremo 3', es un análogo nucleotídico, tal como un nucleótido de LNA.

- En algunos modos de realización, que pueden ser iguales o diferentes, el segundo nucleótido de oligómero o míxmero, contando desde el extremo 3', es un análogo nucleotídico, tal como un nucleótido de LNA.
- 5 En algunos modos de realización, que pueden ser iguales o diferentes, el séptimo y/u octavo nucleótido de oligómero o míxmero, contando desde el extremo 3', son análogos nucleotídicos, tales como nucleótidos de LNA.
- En algunos modos de realización, que pueden ser iguales o diferentes, el noveno y/o el décimo nucleótidos del primer y/o segundo oligómero, contando desde el extremo 3', son análogos nucleotídicos, tales como nucleótidos de LNA.
- 10 En algunos modos de realización, que pueden ser iguales o diferentes, el extremo 5' del oligómero o míxmero es un análogo nucleotídico, tal como un nucleótido de LNA.
- Las características de diseño anteriores se pueden, en algunos modos de realización, incorporar al diseño del míxmero, como los míxmeros antimiriR.
- 15 En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero no comprende una región de más de 4 unidades de nucleótidos de ADN consecutivas o 3 unidades de nucleótidos de ADN consecutivas. En algunos modos de realización, el míxmero no comprende una región de más de 2 unidades de nucleótidos de ADN consecutivas.
- 20 En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero comprende al menos una región que consiste en al menos dos unidades de análogos nucleotídicos consecutivas, tales como al menos dos unidades de LNA consecutivas.
- En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero comprende al menos una región que consiste en al menos tres unidades de análogos nucleotídicos consecutivas, tales como al menos tres unidades de LNA consecutivas.
- 25 En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero de la invención no comprende una región de más de 7 unidades de análogos nucleotídicos consecutivas, tales como unidades de LNA. En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero de la invención no comprende una región de más de 6 unidades de análogos nucleotídicos consecutivas, tales como unidades de LNA. En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero de la invención no comprende una región de más de 5 unidades de análogos nucleotídicos consecutivas, tales como unidades de LNA. En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero de la invención no comprende una región de más de 4 unidades de análogos nucleotídicos consecutivas, tales como unidades de LNA. En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero de la invención no comprende una región de más de 3 unidades de análogos nucleotídicos consecutivas, tales como unidades de LNA. En algunos modos de realización, el oligómero o míxmero de la invención no comprende una región de más de 2 unidades de análogos nucleotídicos consecutivas, tales como unidades de LNA. Un míxmero es un oligómero que puede comprender una o más regiones cortas de ADN de no más de 4 nucleótidos de ADN consecutivos, y típicamente comprende regiones alternas de un análogo nucleotídico (tales como unidades de LNA) y nucleótidos de ADN, opcionalmente regiones de otros análogos nucleotídicos (por ejemplo, análogos nucleotídicos distintos de LNA). Los totalmeros no comprenden nucleótidos de ADN o ARN (aunque pueden comprender análogos o derivados de ADN y ARN).
- 30 En algunos modos de realización, el oligómero (por ejemplo, la región A) de la invención, en algunos modos de realización, puede comprender no más de 4 nucleótidos de ADN consecutivos, o no más de 3 nucleótidos de ADN consecutivos.
- 35 Los siguientes modos de realización se pueden aplicar a míxmeros u oligómeros totalmeros (por ejemplo, como región A): El oligómero (por ejemplo, la región A) de la invención puede, en algunos modos de realización, comprender al menos dos regiones alternas de nucleótidos LNA y distintos de LNA (tales como ADN o análogos nucleotídicos sustituidos en 2').
- 40 El oligómero de la invención, en algunos modos de realización, puede comprender una secuencia contigua de fórmula: 5' ([nucleótidos de LNA]₁₋₅ y [nucleótidos distintos de LNA]₁₋₄)₂₋₁₂ 3'.
- 45 En algunos modos de realización, el nucleótido 5' de la secuencia de nucleótidos contiguos (o el oligómero) es un nucleótido de LNA.
- 50 En algunos modos de realización, el nucleótido 3' de la secuencia de nucleótidos contiguos es un análogo nucleotídico, tal como LNA, o los 2, 3, 4, 5' nucleótidos 3' son análogos nucleotídicos, tales como nucleótidos de LNA, u otros análogos nucleotídicos que confieren estabilidad sérica potenciada al oligómero.
- 55 En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos del oligómero tiene una fórmula 5' ([nucleótidos de LNA]₁₋₅ - [nucleótidos distintos de LNA]₁₋₄)₂₋₁₁ - [nucleótidos de LNA]₁₋₅3'.
- 60 En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos del oligómero tiene 2, 3 o 4 regiones contiguas nucleótidos de LNA y distintos de LNA; por ejemplo, comprende la fórmula 5' ([nucleótidos de LNA]₁₋₅ y [nucleótidos distintos de LNA]₁₋₄)₂₋₃, opcionalmente con otra región de LNA 3' [nucleótidos de LNA]₁₋₅.
- 65

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos del oligómero comprende 5' ([nucleótidos de LNA]₁₋₃ y [nucleótidos distintos de LNA]₁₋₃)₂₋₅, opcionalmente con otra región de LNA 3' [nucleótidos de LNA]₁₋₃.

- 5 En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos del oligómero comprende 5' ([nucleótidos de LNA]₁₋₃ y [nucleótidos distintos de LNA]₁₋₃)₃, opcionalmente con otra región de LNA 3' [nucleótidos de LNA]₁₋₃.

En algunos modos de realización, los nucleótidos distintos de LNA son todos nucleótidos de ADN.

- 10 En algunos modos de realización, los nucleótidos distintos de LNA se seleccionan independientemente o dependientemente del grupo que consiste en unidades de ADN, unidades de ARN, unidades de 2'-O-alkuil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN y unidades de 2'-fluoro-ADN.

- 15 En algunos modos de realización, los nucleótidos distintos de LNA se (seleccionan opcionalmente independientemente del grupo que consiste en análogos nucleosídicos sustituidos en 2', tales como (opcionalmente independientemente) seleccionados del grupo que consiste en unidades de 2'-O-alkuil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-AP, 2'-FANA, 2'-(3-hidroxi)propilo y 2'-fluoro-ADN, y/u otros análogos nucleosídicos (opcionalmente) modificados con glúcidos, tales como morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA), CeNA, ácido nucleico no unido (UNA), ácido hexitol nucleico (HNA), biciclo-HNA (véase, por ejemplo, el documento WO2009/100320). En algunos modos de realización, los análogos nucleosídicos aumentan la afinidad de la primera región por su ácido nucleico diana (o una secuencia de ADN o ARN complementario). Diversos análogos nucleosídicos se divulgan en Freier y Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213.

- 25 En algunos modos de realización, los nucleótidos distintos de LNA son nucleótidos de ADN. En algunos modos de realización, el oligómero o secuencia de nucleótidos contiguos comprende nucleótidos de LNA y opcionalmente otros análogos nucleotídicos (tales como los análogos nucleotídicos enumerados en nucleótidos distintos de LNA) que pueden ser análogos nucleotídicos que potencian la afinidad y/o análogos nucleotídicos que potencian la estabilidad sérica.

- 30 En algunos modos de realización, el oligómero o secuencia de nucleótidos contiguos del mismo consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos de dichos análogos nucleotídicos.

- 35 En algunos modos de realización, el oligómero o secuencia de nucleótidos contiguos del mismo consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos de nucleótidos de LNA.

En algunos modos de realización, el oligómero o la secuencia de nucleótidos contiguos es de 8-12, tal como 8-10 o 10-20, tal como 12-18 o 14-16 nt de longitud.

- 40 En algunos modos de realización, el oligómero o secuencia de nucleótidos contiguos puede formar una doble hebra con una molécula de ácido nucleico de ARN complementario monocatenario con enlaces internucleosídicos fosfodiéster, en el que la doble hebra tiene una T_m de al menos aproximadamente 60 °C, tal como al menos 65 °C.

- 45 Ejemplo de un ensayo de T_m : El oligonucleótido: Se diluyen doble de oligonucleótido y diana de ARN (PO) a 3 mM en 500 ml de agua libre de RNasa y se mezclan con 500 ml de tampón de T_m 2x (NaCl 200 mM, EDTA 0,2 mM, fosfato de Na 20 mM, pH 7,0). La solución se calienta a 95 °C durante 3 minutos y, a continuación, se deja enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las temperaturas de fusión de las dobles hebras (T_m) se miden en un espectrofotómetro Lambda 40 UV/VIS equipado con un programador de temperatura Peltier PTP6 usando un programa informático PE TempLAB (Perkin Elmer). La temperatura se aumenta de 20 °C a 95 °C y, a continuación, se baja a 25 °C, registrándose la absorción a 260 nm. La primera derivada y los máximos locales tanto de la fusión como del templado se usan para evaluar la T_m de las dobles hebras.

Totálmeros

- 55 Un totálmero es un oligómero monocatenario que solo comprende nucleósidos no naturales, tales como análogos nucleosídicos modificados con glúcidos.

- 60 La primera región de acuerdo con la invención puede ser totálmeros; de hecho, diversos diseños de totálmeros son altamente eficaces como oligómeros o la primera región de los mismos, por ejemplo, en particular cuando se dirigen a microARN (antimiR) o como oligómeros con conmutación de empalme (SSO). En algunos modos de realización, el totálmero comprende o consiste en al menos un motivo de secuencia XYX o YXY, tal como una secuencia repetida XYX o YXY, en la que X es LNA e Y es un análogo nucleotídico alternativo (es decir, distinto de LNA), tal como una unidad de 2'-O-MOE ARN y una unidad de 2'-fluoro ADN. El motivo de secuencia anterior, en algunos modos de realización, puede ser XXY, XYX, YXY o YYX, por ejemplo.

65

En algunos modos de realización, el totalmero puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos contiguos de entre 7 y 16 nucleótidos, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos, tal como entre 7 y 12 nucleótidos.

En algunos modos de realización, la secuencia de nucleótidos contiguos del totalizador comprende al menos un 30 %, tal como al menos un 40 %, tal como al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, tal como al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, tal como al menos un 90 %, tal como un 95 %, tal como un 100 % de unidades de BNA (LNA). Las unidades restantes se pueden seleccionar de los análogos nucleotídicos distintos de LNA a los que se hace referencia en el presente documento, tales como los seleccionados del grupo que consiste en una unidad 2'-O-alquilo-ARN, una unidad 2'-OMe-ARN, una unidad 2'-amino-ADN, una unidad 2'-flúor-ADN, una unidad de LNA, una unidad de PNA, una unidad de HNA, una unidad de INA y una unidad de 2'MOE ARN, o una unidad del grupo 2'-OMe ARN y una unidad 2'-flúor ADN.

En algunos modos de realización, el totalmero consiste en o comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que consiste solo en unidades de LNA. En algunos modos de realización, el totalmero, tal como el totalmero de LNA, tiene una longitud de entre 7-12 nucleósidos. En algunos modos de realización, el totalmero (como el oligómero o la primera región del mismo) se puede dirigir contra un microARN (es decir, ser antimir), como al que se hace referencia en el documento WO2009/043353.

En algunos modos de realización, el oligómero o la secuencia de nucleótidos contiguos comprende nucleótidos de LNA y opcionalmente otros análogos nucleotídicos que pueden ser análogos nucleotídicos que potencian la afinidad y/o análogos nucleotídicos que potencian la estabilidad sérica.

En algunos modos de realización, el oligómero o secuencia de nucleótidos contiguos del mismo consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos de dichos análogos nucleotídicos.

En algunos modos de realización, el oligómero o secuencia de nucleótidos contiguos del mismo consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos de nucleótidos de LNA.

Modulación del microARN por medio del oligómero o la primera región del mismo.

En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo es un antimir, que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos que corresponde a o es completamente complementaria de todo el microARN maduro. El uso de la presente invención para controlar la actividad *in vivo* del microARN se considera de primordial importancia debido al hecho de que los microARN regulan típicamente numerosos ARNm en el sujeto. La capacidad de inactivar antimir terapéuticos es, por lo tanto, muy deseable.

Numerosos microARN están relacionados con una serie de enfermedades. Por ejemplo: ejemplos no limitantes de indicaciones terapéuticas que se pueden tratar con las composiciones farmacéuticas de la invención:

microARN	Posibles indicaciones médicas
miR-1	Arritmia cardíaca
miR-21	Glioblastoma, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, sensibilización de gliomas a fármacos citotóxicos, hipertrofia cardíaca
miR-21, miR-200b y miR-141	Respuesta a la quimioterapia y regulación del crecimiento del colangiocarcinoma
miR-122	hipercolesterolemia, infección por hepatitis C, hemocromatosis
miR-19b	linfoma y otros tipos de tumores
miR-26a	Diferenciación en osteoblastos de células madre humanas.
miR-155	linfoma, desarrollo de tumores pancreáticos, cáncer de mama y pulmón.
miR-203	Psoriasis
miR-375	diabetes, trastornos metabólicos, secreción de insulina inducida por glucosa desde las células endocrinas pancreáticas
miR-181	diferenciación de mioblastos, trastornos autoinmunitarios
miR-10b	Infiltración de células de cáncer de mama y metástasis
miR-125b-1	Cáncer de mama, pulmón, ovario y cuello uterino
miR-221 y 222	Carcinoma de próstata, cáncer papilar de tiroides humano, carcinoma hepatocelular humano
miRNA-372 y -373	tumores de células germinales testiculares.
miR-142	Leucemia de linfocitos B
Clúster miR-17-19b	Linfomas de linfocitos B, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular

El ARNm del gen supresor tumoral tropomisina 1 (TPM1) se ha indicado como diana de miR-21. El ARNm de miotrofina (mtpn) se ha indicado como diana de miR 375.

El oligómero o la primera región del mismo pueden ser, por lo tanto, un antimir que se dirige (es decir, comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos que es completamente complementaria de (una región correspondiente de) a uno de los microARN listados anteriormente o comprende más de un único emparejamiento erróneo al mismo.

Por tanto, algunos aspectos de la invención se relacionan con el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de microARN seleccionados del grupo que consiste en enfermedades infecciosas tales como enfermedades víricas tales como el virus de la hepatitis C y el VIH, retraso mental por X frágil, enfermedades inflamatorias, cáncer, tal como leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de colon.

Los microARN (miARN) son una clase abundante de ARN endógenos cortos que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica mediante el emparejamiento de bases con sus ARNm diana. Los miARN maduros se procesan secuencialmente a partir de transcritos de horquilla más largos por las RNasa III (ribonucleasas) de Drosha. MicroARN maduros (miR) típicamente entre 20 y 25 nucleótidos de ARN contiguos. Actualmente se ha establecido ampliamente que varios microARN están asociados con afecciones médicas y enfermedades, y varias empresas están desarrollando tratamientos basados en oligómeros que imitan a los microARN o hibridan específicamente con microARN específicos asociados con fenotipos de enfermedades; dichos oligómeros se denomina, en el presente documento, imitadores de microARN y antimir, respectivamente, y el oligómero o la primera región del mismo, en algunos modos de realización, pueden ser dichos oligómeros moduladores de microARN.

En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo de acuerdo con la invención, consiste en o comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que corresponde a o es completamente complementaria de una secuencia de microARN, tal como una secuencia de microARN madura, tal como los microARN humanos publicados en miRBase (http://microna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/mirna_summary.pl?org=hsa). En algún modo de realización, el microARN es un microARN vírico. En el momento de escribir, en miRbase 19, existen 1600 precursores y 2042 secuencias de miARN humano maduro en miRBase, incluida la secuencia de microARN maduro de cada microARN humano. Otros microARN humanos a los que se puede dirigir el oligómero o la primera región del mismo incluyen los divulgados en el documento WO08040355A. En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo de acuerdo con la invención, consiste en o comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que corresponde a o es completamente complementaria de una secuencia de microARN seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR19b, hsa-miR21, hsa-miR 122, hsa-miR 142 a7b, hsa-miR 155 y hsa-miR 375. En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo de acuerdo con la invención, consiste en o comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que corresponde a o es totalmente complementaria de una secuencia de microARN seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR221 y hsa-miR222. En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo de acuerdo con la invención, consiste en o comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que corresponde a o es completamente complementaria de hsa-miR122 (NR_029667.1 GI:262205241), tal como la ha-miR-122 madura.

En algunos modos de realización, cuando el oligómero o la primera región del mismo se dirige a miR-122, el oligómero es para el uso en el tratamiento de la infección por hepatitis C.

Oligómeros antimir

Los diseños de oligómeros 'antimir' preferentes o de la primera región de los mismos se divulgan en los documentos WO2007/112754, WO2007/112753, PCT/DK2008/000344 y las solicitudes provisionales estadounidenses 60/979217 y 61/028062. En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo es un antimir que es un mixmero o un totalmero.

Los oligómeros antimir son oligómeros que consisten en o comprenden una secuencia de nucleótidos contiguos que es completamente complementaria, o esencialmente complementaria (es decir, puede comprender uno o dos emparejamientos erróneos), de una secuencia de microARN, o una subsecuencia correspondiente de la misma. A este respecto, se considera que el antimir puede comprender una secuencia de nucleótidos contiguos que es complementaria o esencialmente complementaria de todo el microARN maduro, o el antimir puede comprender una secuencia de nucleótidos contiguos que es complementaria o esencialmente complementaria de una subsecuencia del microARN maduro o premicroARN; dicha subsecuencia (y, por lo tanto, la secuencia de nucleótidos contiguos correspondiente) es típicamente de al menos 8 nucleótidos de longitud, tal como entre 8 y 25 nucleótidos, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 nucleótidos de longitud, tal como entre 10-17 o 10-16 nucleótidos, tal como entre 12-15 nucleótidos.

Se han sugerido numerosos diseños de Antimir, y típicamente los antimir para uso terapéutico, tal como la secuencia de nucleótidos contiguos de los mismos, comprenden una o más unidades de análogos nucleotídicos.

En algunos modos de realización, el antimir puede tener una estructura de gámpero como se describe en el presente documento. Sin embargo, como se explica en los documentos WO2007/112754 y WO2007/112753, pueden ser preferentes otros diseños, tales como mixmeros o totalmeros.

Los documentos WO2007/112754 y WO2007/112753 proporcionan oligómeros antimicroARN y diseños de oligómeros antimicroARN donde los oligómeros son complementarios del microARN maduro.

5 En algunos modos de realización, una subsecuencia del antimicroARN corresponde a la región de partida de miARN. En algunos modos de realización, la primera o segunda nucleobase 3' del oligómero corresponde al segundo nucleótido 5' de la secuencia del microARN.

10 En algunos modos de realización de antimicroARN, las unidades de nucleobase 1 a 6 (inclusive) del oligómero según se mide desde el extremo 3' de la región del oligómero son complementarias de la secuencia de la región de partida del microARN.

15 En algunos modos de realización de antimicroARN, las unidades de nucleobase 1 a 7 (inclusive) del oligómero según se mide desde el extremo 3' de la región del oligómero son complementarias de la secuencia de la región de partida del microARN.

En algunos modos de realización de E antimicroARN, las unidades de nucleobase 2 a 7 (inclusive) del oligómero según se mide desde el extremo 3' de la región del oligómero son complementarias de la secuencia de la región de partida del microARN.

20 En algunos modos de realización, el oligómero antimicroARN comprende al menos una unidad de análogos nucleotídicos, tal como al menos una unidad de LNA, en una posición que está dentro de la región complementaria de la región de partida del miARN. El oligómero antimicroARN, en algunos modos de realización, puede comprender entre uno y 6 o entre 1 y 7 unidades de análogos nucleotídicos, tal como entre 1 y 6 y 1 y 7 unidades de LNA, en una posición que está dentro de la región complementaria de la región de partida del miARN.

25 En algunos modos de realización, el antimicroARN de la invención tiene una longitud de 7, 8 o 9 nucleótidos, y comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que es complementaria de una región de partida de un microARN humano o vírico, y en la que al menos un 80 %, tal como un 85 %, tal como un 90 %, tal como un 95 %, tal como un 100 % de los nucleótidos son LNA.

30 En algunos modos de realización, el antimicroARN de la invención tiene una longitud de 7, 8 o 9 nucleótidos, y comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que es complementaria de una región de partida de un microARN humano o vírico, y en la que al menos un 80 % de los nucleótidos son LNA, y en la que al menos un 80 %, tal como un 85 %, tal como un 90 %, tal como un 95 %, tal como un 100 % de los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato.

35 En algunos modos de realización, el antimicroARN comprende una o dos unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. Esto se considera ventajoso para la estabilidad de la hélice A formada por la doble hebra de oligonucleótido: microARN, una doble hebra que se asemeja a la estructura de una doble hebra de ARN:ARN.

40 La tabla en las páginas 48 línea 15 a página 51, línea 9 del documento WO2007/112754 proporciona ejemplos de oligómeros anti microARN (es decir, antimicroARN que pueden ser el oligómero o la primera región del mismo).

Imitadores de microARN

45 En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo está en forma de un imitador de miARN que se puede introducir en una célula para reprimir la expresión de una o más dianas de ARNm. Los imitadores de miARN son típicamente completamente complementarios de la secuencia de miARN de longitud completa. Los imitadores de miARN son compuestos que comprenden una secuencia de nucleótidos contiguos que es homóloga a una región correspondiente de una, o más, de las secuencias de miARN proporcionadas o a las que se hace referencia en el presente documento. El uso de imitadores de miARN o antimicroARN se puede usar para (opcionalmente) reprimir además las dianas de ARNm, o para silenciar (regular por disminución) el miARN, inhibiendo de este modo la función del miARN endógeno, provocando la desrepresión y el aumento de la expresión de la diana de ARNm.

Aptámeros

55 En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo puede ser un aptámero terapéutico, un spiegelmer. Téngase en cuenta que los aptámeros también pueden ser ligandos, tales como ligandos de receptores, y, por lo tanto, se pueden usar como un resto de direccionamiento (es decir, la región 3). Los aptámeros (también denominados *Spiegelmers*) en el contexto de la presente invención como ácidos nucleicos de entre 20 y 50 nucleótidos de longitud, que se han seleccionado en base a su estructura conformacional en lugar de la secuencia de nucleótidos, provocan su efecto terapéutico al unirse con una proteína diana directamente *in vivo* y, por lo tanto, no forman parte del complemento inverso de su diana; de hecho, su diana no es un ácido nucleico sino una proteína. Los aptámeros específicos que pueden ser el oligómero o la primera región del mismo incluyen Macugen (OSI Pharmaceuticals) o ARC1779, (Archemix, Cambridge, MA). En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo no es un aptámero. En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo no es un spiegelmer.

Complejos de ARNip

5 En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo pueden formar parte de un complejo de ARNip, es decir, la hebra de antisentido o pasajera del complejo del ARNip. Un complejo de ARNip puede mediar la interferencia del ARN.

10 En algunos modos de realización, el complejo de ARNip comprende dos oligómeros monocatenarios de entre 17 y 25 nt de longitud, tal como 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 nucleótidos de longitud, tal como entre 21-23 nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, la hebra de sentido y/o de antisentido del ARNip puede comprender un nucleótido protuberante en 3', típicamente de 1, 2 o 3 nucleótidos. Adecuadamente, la hebra de sentido y/o de antisentido puede comprender uno o más análogos nucleotídicos.

15 En algunos modos de realización, el complejo de ARNip es un siLNA, tal como los diseños de ARNip descritos en los documentos WO2004/000192, WO2005/073378, WO2007/085485. Un siLNA es un ARNip que comprende al menos una unidad de LNA.

20 En algunos modos de realización, el complejo de ARNip es un sisiLNA, tal como los descritos en el documento WO2007/107162. En algunos modos de realización, el oligómero o la primera región del mismo, de la invención es la hebra de sentido del ARNip y, como tal, puede no ser complementario de la diana (de hecho, puede ser homólogo de la diana pretendida).

En algunos modos de realización, el oligómero o compuesto de la invención no es un ARNip ni un siLNA.

Enlaces internucleotídicos

25 Los monómeros nucleosídicos de los oligómeros (por ejemplo, la primera y segunda regiones) descritos en el presente documento se acoplan entre sí por medio de grupos de enlace [internucleosídicos]. Adecuadamente, cada monómero se une al monómero adyacente 3' por medio de un grupo de enlace.

30 La persona experta en la técnica entendería que, en el contexto de la presente invención, el monómero 5' en el extremo de un oligómero no comprende un grupo de enlace 5', aunque puede comprender o no un grupo 5' terminal.

35 Se pretende que los términos "grupo de enlace" o "enlace internucleotídico" signifiquen un grupo que puede acoplar covalentemente dos nucleótidos. Los ejemplos específicos y preferentes incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato.

40 Los nucleótidos del oligómero de la invención o la secuencia de nucleótidos contiguos del mismo se acoplan entre sí por medio de grupos de enlace. Adecuadamente, cada nucleótido se une al nucleótido adyacente 3' por medio de un grupo de enlace.

45 Los enlaces internucleotídicos adecuados incluyen los enumerados dentro del documento WO2007/031091, por ejemplo, los enlaces internucleotídicos enumerados en el primer párrafo de la página 34 del documento WO2007/031091.

50 En algunos modos de realización, es distinto del enlace o enlaces fosfodiéster o región B, el preferente para modificar el enlace internucleotídico de su fosfodiéster normal a uno que sea más resistente al ataque de la nucleasa, tal como fosforotioato o boranofosfato; estos dos, al ser escindibles por la RNasa H, también permiten esa ruta de inhibición de antisentido para reducir la expresión del gen diana.

55 Pueden ser preferentes enlaces internucleotídicos adecuados que contienen azufre (S) como se proporcionan en el presente documento, tales como fosforotioato o fosfoditioato. También son preferentes enlaces internucleotídicos fosforotioato, en particular para la primera región, tal como en gápmeros, míxmeros, oligómeros con conmutación de empalme de antimir y totálmeros.

Para los gápmeros, los enlaces internucleotídicos en el oligómero pueden ser, por ejemplo, fosforotioato o boranofosfato para permitir la escisión de la RNasa H por el ARN dirigido. Es preferente el fosforotioato, para una resistencia mejorada a las nucleasas y otras razones, tales como la facilidad de fabricación.

60 En un aspecto, con la excepción del enlace fosfodiéster entre la primera y segunda región, y opcionalmente dentro de la región B, los enlaces internucleosídicos restantes del oligómero de la invención, los nucleótidos y/o análogos nucleotídicos están unidos entre sí por medio de grupos fosforotioato. En algunos modos de realización, al menos un 50 %, tal como al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, tal como al menos un 90 % tal como todos los enlaces internucleosídicos entre nucleósidos en la primera región son distintos de fosfodiéster (fosfato), tales que se seleccionan del grupo que consiste en fosforotioato, fosforoditioato o boranofosfato. En algunos modos de realización,

65

al menos un 50 %, tal como al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, tal como al menos un 90 % tal como todos los enlaces internucleosídicos entre nucleósidos en la primera región son fosforotioato.

El documento WO09124238 se refiere a compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico unido a los extremos 3' o 5' por un enlace internucleosídico neutro. Por lo tanto, los oligómeros de la invención pueden tener al menos un nucleósido bicíclico unido a los extremos 3' o 5' por un enlace internucleosídico neutro, tal como uno o más fosfotriéster, metilfosfonato, MMI, amida-3, formacetal o tioformacetal. Los enlaces restantes pueden ser fosforotioato.

10 **Conjugados, restos de direccionamiento y grupos de bloqueo**

Se pretende que el término "conjugado" indique una molécula heterogénea formada por la unión covalente ("conjugación") del oligómero como se describe en el presente documento a uno o más restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos. Los ejemplos de restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos incluyen agentes macromoleculares tales como proteínas, cadenas de ácidos grasos, residuos glucídicos, glucoproteínas, polímeros, o combinaciones de los mismos. Típicamente las proteínas pueden ser anticuerpos contra una proteína diana. Los polímeros típicos pueden ser polietilenglicol.

Por lo tanto, en diversos modos de realización, el oligómero de la invención puede comprender tanto una región polinucleotídica que típicamente consiste en una secuencia contigua de nucleótidos, como otra región no nucleotídica. Cuando se hace referencia al oligómero de la invención que consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos, el compuesto puede comprender componentes no nucleotídicos, tales como un componente de conjugado.

En diversos modos de realización de la invención, el compuesto oligomérico se une a ligandos/conjugados, que se pueden usar, por ejemplo, para aumentar la captación celular de compuestos oligoméricos. El documento WO2007/031091 proporciona ligandos y conjugados adecuados.

En diversos modos de realización en los que el compuesto de la invención consiste en una secuencia especificada de ácidos nucleicos o nucleótidos, como se divulga en el presente documento, el compuesto también puede comprender al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico (por ejemplo, que no comprende uno o más nucleótidos o análogos nucleotídicos) unido covalentemente a dicho compuesto.

En algunos modos de realización, el conjugado puede ser un conjugado lipófilo o una proteína (por ejemplo, anticuerpos, enzimas, proteínas séricas); péptidos; vitaminas (hidrosolubles o liposolubles); polímeros (hidrosolubles o liposolubles); moléculas pequeñas, incluyendo fármacos, toxinas, moléculas indicadoras y ligandos de receptores; complejos con hidratos de carbono; complejos de escisión de ácidos nucleicos; quelantes de metales (por ejemplo, porfirinas, texafirinas, éteres de corona, etc.); intercaladores, incluyendo fotonucleasa/intercaladores híbridos; agentes de reticulación (por ejemplo, fotoactivos, oxidorreductores activos) y combinaciones y derivados de los mismos. Se proporcionan numerosos restos de conjugados adecuados, su preparación y enlace a compuestos oligoméricos, por ejemplo, en el documento WO 93/07883 y la patente de EE. UU. n.º 6.395.492. También se informa de conjugados de oligonucleótidos y sus síntesis en revisiones exhaustivas de Manoharan en *Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications*, S.T. Crooke, ed., Cap. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001 y Manoharan, *Antisense and Nucleic Drug Development*, 2002, 12, 103. La conjugación (a un resto de conjugado) puede potenciar la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligómero de la invención. Dichos restos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, polipéptidos, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-s-tritilitiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo, fosfolípidos, por ejemplo, di-hexadecil-*rac*-glicerol o trietilamonio 1,2-di-*o*-hexadecil-*rac*-glicero-3-h-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, un ácido adamantano acético, un resto de palmitilo, un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Los oligonucleótidos de la invención también se pueden conjugar con sustancias farmacéuticas activas, por ejemplo, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, una sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

En determinados modos de realización, el resto conjugado es un esterol, tal como colesterol.

En diversos modos de realización, el resto conjugado comprende o consiste en un polímero cargado positivamente, tal como péptidos cargados positivamente de, por ejemplo, de 1-50, tal como 2-20 tal como 3-10 residuos de aminoácidos de longitud, y/u óxido de polialqueno tal como polietilglicol (PEG) o polipropilenglicol; véase el documento WO 2008/034123.

El uso de un conjugado a menudo se asocia con propiedades dinámicas farmacocinéticas o farmacodinámicas mejoradas. Sin embargo, la presencia de un grupo de conjugado puede interferir en la actividad del oligonucleótido contra su diana pretendida, por ejemplo, por medio de impedimento estérico que evita la hibridación o el reclutamiento de nucleasas (por ejemplo, el reclutamiento de RNasa H o RISC). El uso de una región de fosfodiéster de ADN y/o ARN (región B) entre el oligonucleótido (región A) y el resto de conjugado (X), de acuerdo con la presente invención,

permite las propiedades mejoradas debido a la presencia del grupo de conjugado, al tiempo que garantiza que, una vez en el tejido diana, el grupo de conjugado no evita una actividad eficaz del oligonucleótido.

El oligonucleótido de la invención, en algunos modos de realización, se une covalentemente a uno o más grupos de conjugados, opcionalmente a través de uno o más conectores. Los compuestos de conjugados resultantes pueden, por ejemplo, tener propiedades potenciadas modificadas, tales como propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y otras modificadas o potenciadas en comparación con compuestos oligoméricos no conjugados. Un resto de conjugado que puede modificar o potenciar las propiedades farmacocinéticas de un compuesto oligomérico puede mejorar la distribución celular, la biodisponibilidad, el metabolismo, la excreción, la permeabilidad y/o la captación celular del compuesto oligomérico. Un resto de conjugado que puede modificar o potenciar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto oligomérico puede mejorar la actividad, la resistencia a la degradación, la hibridación específica de la secuencia, la captación y similares. En algunos modos de realización, el grupo de conjugado puede reducir o evitar la actividad apropiada del oligonucleótido, por ejemplo, actividad inespecífica o actividad en tejidos u órganos no diana. Esto se puede lograr mediante el uso de un resto de bloqueo, que puede ser, por ejemplo, un conjugado; la presencia del grupo de bloqueo unido covalentemente al oligonucleótido (opcionalmente por medio de un conector) puede evitar o dificultar la hibridación y/o actividad del oligonucleótido. La escisión de la región fosfodiéster de ADN/ARN (por ejemplo, en el sitio diana pretendido) elimina el grupo de bloqueo, lo que permite la administración del oligonucleótido activo en el sitio pretendido.

En algunos modos de realización, el compuesto de la invención comprende un grupo de conjugado.

Se reconocerá que se puede usar un grupo de conjugado, por ejemplo, para dirigirse a un tejido específico, por ejemplo, un grupo lipófilo para dirigirse al hígado, y se puede usar un segundo grupo de conjugado para proporcionar un beneficio adicional, por ejemplo, un grupo de bloqueo u otra entidad terapéutica. Uno o ambos conjugados/restos adecuados se pueden unir al oligonucleótido por medio de la región fosfodiéster de ADN/ARN de acuerdo con la presente invención. En algunos modos de realización, el conjugado se une covalentemente al oligonucleótido, opcionalmente por medio de un conector, en los extremos 5' y/o 3' del oligonucleótido. A este respecto, si se usan dos grupos de conjugado/resto, uno se puede unir a los extremos 5' y otro a los extremos 3'.

Conjugados con hidratos de carbono

En algunos modos de realización, el grupo de conjugado se selecciona del grupo que consiste en un hidrato de carbono, un resto lipófilo, un polímero, una proteína o péptido, un marcador o tinte, una molécula pequeña, tal como un resto terapéutico de molécula pequeña, un ligando de un receptor de superficie celular.

En algunos modos de realización, el conjugado es o puede comprender un hidrato de carbono o comprende un grupo de hidratos de carbono. En algunos modos de realización, el hidrato de carbono se selecciona del grupo que consiste en galactosa, lactosa, *n*-acetilgalactosamina, manosa y manosa-*e*-fosfato. En algunos modos de realización, el grupo de conjugado es o puede comprender manosa o manosa-6-fosfato. Los conjugados con hidratos de carbono se pueden usar para potenciar la administración o la actividad en una variedad de tejidos, tales como el hígado y/o el músculo. Véanse, por ejemplo, los documentos EP1495769, WO99/65925, Yang *et al.*, Bioconjug Chem (2009) 20(2):213-21. Zatsepin y Oretskaya Chem Biodivers. (2004) 1(10): 1401-17.

En algunos modos de realización, el grupo de conjugado es un resto glucídico. Además, el oligómero puede comprender además uno o más restos de conjugados adicionales, de los cuales los restos lipófilos o hidrófobos son, en particular, interesantes. Estos pueden actuar, por ejemplo, como moduladores farmacocinéticos y se pueden unir covalentemente al conjugado con un hidrato de carbono, a un conector que une el conjugado de un hidrato de carbono con el oligómero o a un conector que une conjugados con múltiples hidratos de carbono (multivalentes), o al oligómero, opcionalmente por medio de un conector, como un conector bioescindible. I

En algunos modos de realización, el conjugado es o puede comprender un hidrato de carbono o comprende un grupo de hidratos de carbono. En algunos modos de realización, el hidrato de carbono se selecciona del grupo que consiste en galactosa, lactosa, *n*-acetilgalactosamina, manosa y manosa-6-fosfato. En algunos modos de realización, el grupo de conjugado es o puede comprender manosa o manosa-6-fosfato. Los conjugados con hidratos de carbono se pueden usar para potenciar la administración o la actividad en una variedad de tejidos, tales como el hígado y/o el músculo. Véanse, por ejemplo, los documentos EP1495769, WO99/65925, Yang *et al.*, Bioconjug Chem (2009) 20(2):213-21. Zatsepin y Oretskaya Chem Biodivers. (2004) 1(10): 1401-17.

Conjugados con GalNAc

La invención también proporciona oligonucleótidos, tales como oligómeros de antisentido de LNA, que están conjugados con un resto de direccionamiento a un receptor de asialoglicoproteína. En algunos modos de realización, el resto de conjugado (tal como la tercera región o región C) comprende un resto de direccionamiento al receptor de asialoglicoproteína, tal como galactosa, galactosamina, *N*-formil-galactosamina, *N*-acetilgalactosamina, *N*-propionil-galactosamina, *N*-*n*-butanoil-galactosamina y *N*-isobutanoilgalactosamina. En algunos modos de realización, el conjugado comprende un complejo con galactosa, tal como el trímero de *N*-acetilgalactosamina. En algunos modos

de realización, el resto de conjugado comprende una GalNAc (*N*-acetilgalactosamina), tal como una GalNAc monovalente, divalente, trivalente o tetravalente. Se pueden usar conjugados con GalNAc trivalentes para dirigir el compuesto al hígado. Se han usado conjugados con GalNAc con metilfosfonato y oligonucleótidos de antisentido de PNA (por ejemplo, el documento US 5.994517 y Hangeland *et al.*, Bioconjug Chem. 1995 Nov-Dic; 6(6):695-701) y ARNip (por ejemplo, los documentos WO2009/126933, WO2012/089352 y WO2012/083046). El documento WO2012/083046 describe ARNip con restos de conjugados con GalNAc que comprenden moduladores farmacocinéticos escindibles, que son adecuados para su uso en la presente invención; los moduladores farmacocinéticos preferentes son grupos hidrófobos C16 tales como palmitoilo, hexadec-8-enoilo, oleilo (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoilo, dioctanoilo y acilo C16-C20. Los moduladores farmacocinéticos escindibles '046 también pueden ser colesterol.

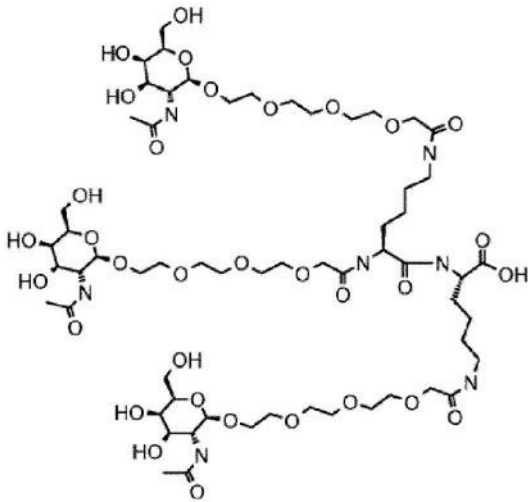
Los restos de direccionamiento (restos de conjugados) se pueden seleccionar del grupo que consiste en: galactosa, galactosamina, *N*-formil-galactosamina, *N*-acetilgalactosamina, *N*-propionil-galactosamina, *N*-n-butanoil-galactosamina, *N*-iso-butanoil-galactosamina-amina, complejo con galactosa y trímero de *N*-acetilgalactosamina, y pueden tener un modulador farmacocinético seleccionado del grupo que consiste en: grupo hidrófobo que tiene 16 o más átomos de carbono, grupo hidrófobo que tiene 16-20 átomos de carbono, palmitoilo, hexadec-8-enoilo, oleilo, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoilo, dioctanoilo y acilo C16-C20, y colesterol. Determinados complejos con GalNAc descritos en '046 incluyen: (E)-hexadec-8-enoilo (C16), oleilo (C18), (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoilo (C18), octanoilo (C8), dodecanoilo (C12), acilo C-20, acilo C24, dioctanoilo (2 × C8). El resto de direccionamiento-resto de direccionamiento modulador farmacocinético se puede unir al polinucleótido por medio de un enlace fisiológicamente lábil o, por ejemplo, un enlace disulfuro, o un conector de PEG. La invención también se refiere al uso de conectores de fosfodiéster entre el oligómero y el grupo de conjugado (estos se denominan región B en el presente documento, y se sitúan adecuadamente entre el oligómero de LNA y el grupo de conjugado con un hidrato de carbono).

Para dirigirse a los hepatocitos en el hígado, un ligando de direccionamiento preferente es un complejo con galactosa.

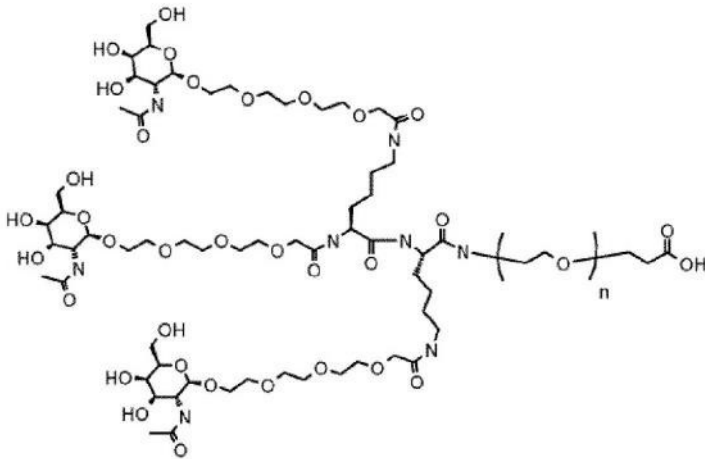
Un complejo con galactosa comprende una molécula que tiene, por ejemplo, que comprende de dos a cuatro derivados de galactosa terminales. Como se usa en el presente documento, el término derivado de galactosa incluye tanto galactosa como derivados de galactosa que tienen una afinidad por el receptor de asialoglucoproteína igual o mayor que la de la galactosa. Un derivado de galactosa terminal se une a una molécula a través de su carbono C-1. El receptor de asialoglucoproteínas (ASGPr) es exclusivo de los hepatocitos y se une a las glucoproteínas terminales de galactosa ramificadas. Un complejo con galactosa preferente tiene tres galactosaminas o derivados de galactosamina terminales, cada uno de los cuales tiene afinidad por el receptor de asialoglucoproteína. Un complejo con galactosa más preferente tiene tres *N*-acetil-galactosaminas terminales. Otros términos frecuentes en la técnica incluyen galactosa tri-antennaria, galactosa trivalente y trímero de galactosa. Se sabe que los complejos con derivados de galactosa tri-antennarios se unen al ASGPr con mayor afinidad que las estructuras de derivados de galactosa biantennarios o monoantennarios (Baenziger y Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly *et al.*, 1982,1. Biol. Chem., 257,939-945). Se requiere multivalencia para lograr la afinidad en nM. De acuerdo con el documento WO 2012/083046, la unión de un único derivado de galactosa que tiene afinidad por el receptor de asialoglucoproteína no permite la administración funcional del polinucleótido de ARNi a hepatocitos *in vivo* cuando se coadministra con el polímero de administración.

Un complejo con galactosa puede comprender dos o preferentemente tres derivados de galactosa, cada uno unido a un punto de ramificación central. Los derivados de galactosa se unen al punto de la rama central a través de los carbonos C-1 de los sacáridos. El derivado de galactosa se une preferentemente al punto de ramificación por medio de conectores o espaciadores (que pueden ser la región Y). Un espaciador preferente es un espaciador hidrófilo flexible (patente de EE. UU. 5885968; Biessen *et al.* J. Med. Chem. 1995 Vol. 39 p. 1538-1546). Un espaciador hidrófilo flexible preferente es un espaciador de PEG. Un espaciador de PEG preferente es un espaciador de PEG3. El punto de ramificación puede ser cualquier molécula pequeña que permita la unión de los tres derivados de galactosa y además permita la unión del punto de ramificación al oligómero. Un grupo de puntos de ramificación ejemplar es una dilisina. Una molécula de dilisina contiene tres grupos amina a través de los cuales se pueden unir tres derivados de galactosa y un grupo reactivo carboxilo a través del cual la dilisina se puede unir al oligómero. La unión del punto de ramificación al oligómero se puede producir a través de un conector o espaciador. Un espaciador preferente es un espaciador hidrófilo flexible. Un espaciador hidrófilo flexible preferente es un espaciador de PEG. Un espaciador de PEG preferente es un espaciador de PEG3 (tres unidades de etileno). El complejo con galactosa se puede unir al extremo 3' o 5' del oligómero usando procedimientos conocidos en la técnica.

Un derivado de galactosa preferente es una *N*-acetil-galactosamina (GalNAc). Otros sacáridos que tienen afinidad por el receptor de asialoglucoproteína se pueden seleccionar de la lista que comprende: galactosamina, *N*-n-butanoilgalactosamina y *N*-iso-butanoilgalactosamina. Se han estudiado las afinidades de numerosos derivados de galactosa por el receptor de asialoglucoproteína (véase, por ejemplo: Jobst, S.T. y Drickamer, K. JB.C. 1996, 271, 6686) o se determinan fácilmente usando procedimientos típicos en la técnica.



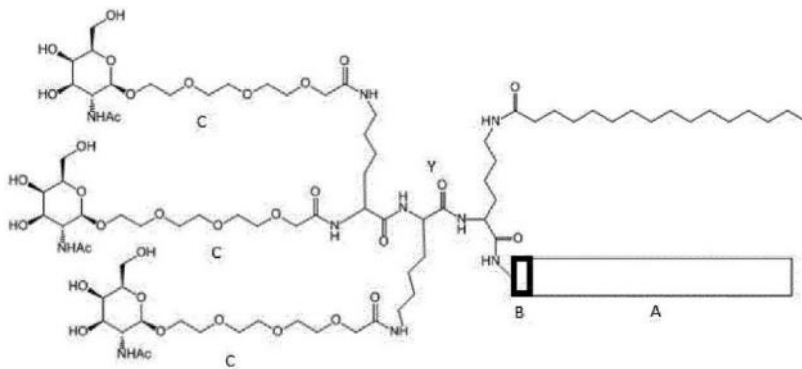
Un modo de realización de un complejo con galactosa

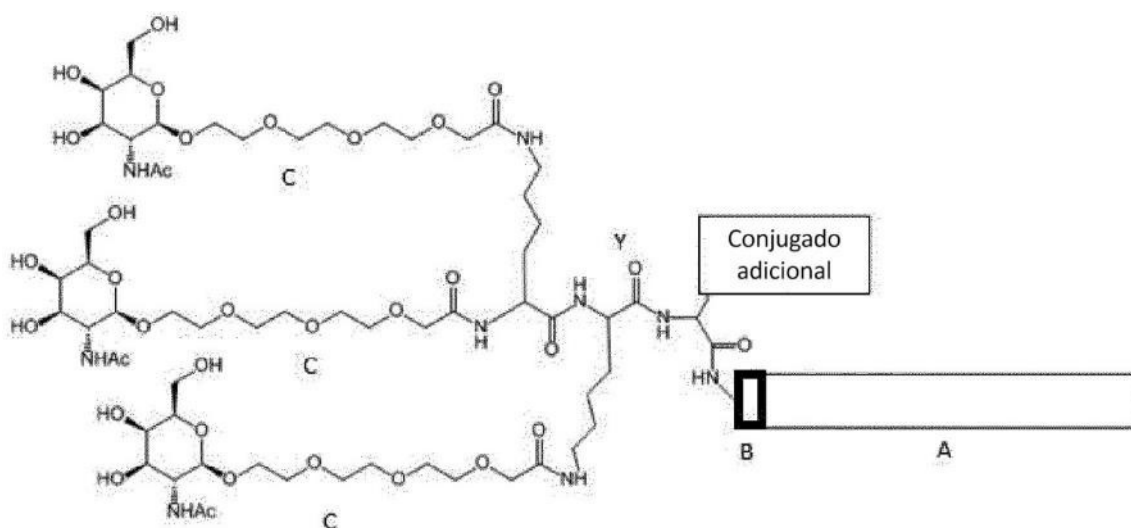
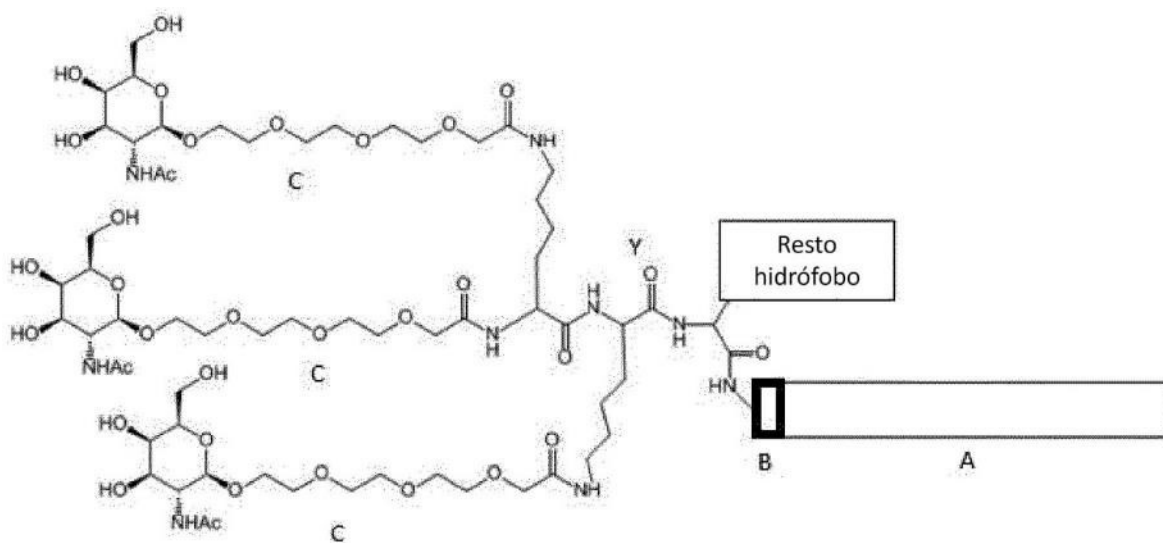


Complejo con galactosa con espaciador con PEG entre el punto ramificado y el ácido nucleico

Un conjugado con GalNac se ilustra en la figura 1. Otros ejemplos del conjugado de la invención se ilustran a continuación:

5





5 La región A puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido de antisentido de LNA.

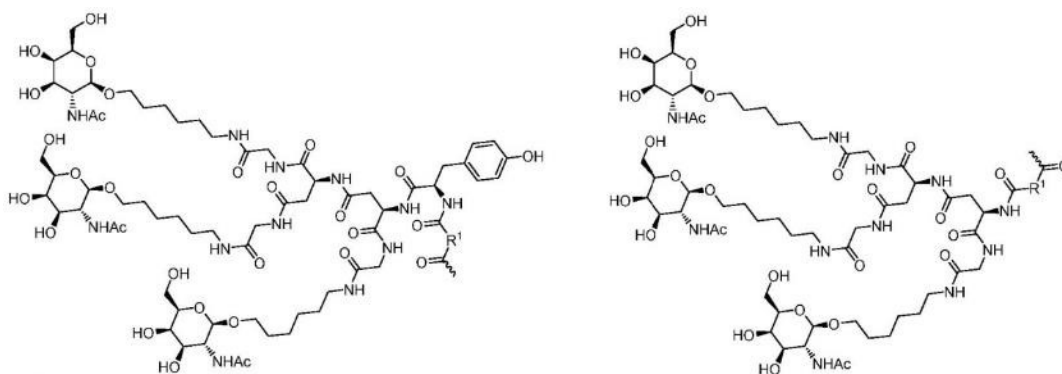
Como se describe en el presente documento, un conjugado con hidratos de carbono (por ejemplo, GalNAc) se puede unir al oligómero por medio de un conector bioescindible, tal como la región B como se define en el presente documento, y opcionalmente la región Y, que se ilustra como una dilisina en los diagramas anteriores.

10 El lugar en el resto hidrófobo o lipófilo (o conjugado adicional) (es decir, modulador farmacocinético) en los conjugados con el complejo GalNAc anteriores, cuando se usan oligómeros de BNA o LNA, tales como oligonucleótidos de antisentido de LNA, es opcional.

15 Véanse las figuras para los complejos específicos con GalNAc usados en el presente estudio, Conj 1, 2, 3, 4 y Conj 1a, 2a, 3a y 4a (que se muestran con un conector C6 opcional que une el complejo con GalNAc con el oligómero - véanse las figuras 12 y 17).

20 Por lo tanto, cada resto glucídico de un complejo con GalNAc (por ejemplo, GalNAc) se puede unir al oligómero por medio de un espaciador, tal como un conector de (poli)etilenglicol (PEG), tal como un conector de di, tri, tetra, penta, hexa-etilenglicol. Como se muestra anteriormente, el resto de PEG forma un espaciador entre el resto glucídico de galactosa y un conector peptídico (se muestra trilisina).

25 En algunos modos de realización, el complejo con GalNAc comprende un conector peptídico, por ejemplo, un tripéptido Tyr-Asp(Asp) o dipéptido Asp(Asp), que se une al oligómero (o a la región Y o región B) por medio de un conector birradical, por ejemplo el complejo con GalNAc puede comprender los siguientes conectores birradicales:



R¹ es un birradical seleccionado preferentemente de -C₂H₄-, -C₃H₆-, -C₄H₈-, -C₅H₁₀-, -C₆H₁₂-, 1,4-ciclohexil (-C₆H₁₀-), 1,4-fenil (-C₆H₄-), -C₂H₄OC₂H₄-, -C₂H₄(OC₂H₄)₂- o -C₂H₄(OC₂H₄)₃-.

Además, el conjugado con un hidrato de carbono (por ejemplo, GalNAc), o el resto de glúcido-conector (por ejemplo, el resto de glúcido-PEG) se pueden enlazar covalentemente (unir) al oligómero (o región B) por medio de un grupo de puntos de ramificación, tal como un aminoácido, o péptido, que comprende adecuadamente dos o más grupos amino (tales como 3, 4 o 5), tales como lisina, dilisina o trilisina o tetralisina. Una molécula de trilisina contiene cuatro grupos amina a través de los cuales se pueden unir tres grupos de conjugados con hidratos de carbono, como galactosa y derivados (por ejemplo, GalNAc) y otro conjugado, tal como un resto/grupo hidrófobo o lipófilo, se puede unir a un grupo reactivo carboxilo a través del cual la trilisina se puede unir al oligómero. El otro conjugado, tal como el resto lipófilo/hidrófobo, se puede unir al residuo de lisina que se une al oligómero. En algunos modos de realización, el conjugado (C) no es una GalNAc monovalente.

La invención también proporciona oligonucleótidos de antisentido de LNA que se conjugan con un resto de direccionamiento a un receptor de asialoglicoproteína. En algunos modos de realización, el resto de conjugado (tal como la tercera región o región C) comprende un resto de direccionamiento al receptor de asialoglicoproteína, tal como galactosa, galactosamina, *N*-formil-galactosamina, *N*-acetilgalactosamina, *N*-propionil-galactosamina, *N*-n-butanoil-galactosamina y *N*-isobutanoilgalactos-amina.

En algunos modos de realización, el conjugado comprende un complejo con galactosa, tal como el trímero de *N*-acetilgalactosamina. En algunos modos de realización, el resto de conjugado comprende una GalNAc (*N*-acetilgalactosamina), tal como una GalNAc monovalente, divalente, trivalente o tetravalente. Se pueden usar conjugados con GalNAc trivalentes para dirigir el compuesto al hígado.

Se han usado conjugados con GalNAc con metilfosfonato y oligonucleótidos de antisentido de PNA (por ejemplo, el documento US 5.994517 y Hangeland *et al.*, Bioconjug Chem. 1995 Nov-Dic;6(6):695-701) y ARNip (por ejemplo, los documentos WO2009/126933, WO2012/089352 y WO2012/083046). El documento WO2012/083046 describe restos de conjugados con GalNAc que comprenden moduladores farmacocinéticos escindibles; los moduladores farmacocinéticos preferentes son grupos hidrófobos C16 tales como palmitoilo, hexadec-8-enoilo, oleilo (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoilo, dioctanoilo y acilo C16-C20. Los moduladores farmacocinéticos escindibles '046 también pueden ser colesterol. Los restos de direccionamiento '046 se pueden seleccionar del grupo que consiste en: galactosa, galactosamina, *N*-formil-galactosamina, *N*-acetilgalactosamina, *N*-propionil-galactosamina, *N*-n-butanoil-galactosamina, *N*-iso-butanoil-galactosamina-amina, complejo con galactosa y trímero de *N*-acetilgalactosamina, y pueden tener un modulador farmacocinético seleccionado del grupo que consiste en: grupo hidrófobo que tiene 16 o más átomos de carbono, grupo hidrófobo que tiene 16-20 átomos de carbono, palmitoilo, hexadec-8-enoilo, oleilo, (9E, 12E)-octadeca-9,12dienoilo, dioctanoilo y acilo C16-C20, y colesterol. Determinados complejos con GalNAc descritos en '046 incluyen: (E)-hexadec-8-enoilo (C16), oleilo (C18), (9E,12E)-octadeca-9,12-dienoilo (C18), octanoilo (C8), dodececanoilo (C12), acilo C-20, acilo C24, dioctanoilo (2 × C8). De acuerdo con '046, el resto de direccionamiento-resto de direccionamiento modulador farmacocinético se puede unir al polinucleótido por medio de un enlace fisiológicamente lábil o, por ejemplo, un enlace disulfuro, o un conector de PEG.

Otros restos de conjugados pueden incluir, por ejemplo, oligosacáridos y complejos glucídicos tales como Tyr-Glu-Glu- (aminohexil GalNAc)₃ (YEE(ahGalNAc)₃); un glucotripéptido que se une a los receptores de Gal/GalNAc en los hepatocitos, véase, por ejemplo, Duff, *et al.*, Methods Enzymol, 2000, 313, 297); complejos con galactosa a base de lisina (por ejemplo, L3G4; Biessen, *et al.*, Cardiovasc. Med., 1999, 214); y complejos con galactosa a base de colanos (por ejemplo, motivo de reconocimiento de hidratos de carbono para el receptor de asialoglicoproteína). Otros conjugados adecuados pueden incluir oligosacáridos que se pueden unir a los dominios de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD) que se encuentran en el receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R). Ejemplos de restos de conjugados que contienen oligosacáridos y/o complejos glucídicos se proporcionan en la patente de EE. UU. n.º 6.525.031.

Moduladores farmacocinéticos

5 El compuesto de la invención puede comprender además uno o más restos de conjugados adicionales, de los cuales los restos lipófilos o hidrófobos son, en particular, interesantes, tal como cuando el grupo de conjugado es un resto glucídico. Dichos restos lipófilos o hidrófobos pueden actuar, por ejemplo, como moduladores farmacocinéticos y se pueden unir covalentemente al conjugado con un hidrato de carbono, a un conector que une el conjugado con un hidrato de carbono con el oligómero o a un conector que une conjugados de múltiples hidratos de carbono (multivalentes), o al oligómero, opcionalmente por medio de un conector, como un conector bioescindible.

10 El oligómero o el resto de conjugado, por lo tanto, pueden comprender un modulador farmacocinético, tal como un resto lipófilo o hidrófobo. Dichos restos se describen dentro del contexto de los conjugados de ARNip en el documento WO2012/082046. El resto hidrófobo puede comprender un ácido graso C8-C36, que puede ser saturado o insaturado. En algunos modos de realización, se pueden usar ácidos grasos C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30, C32 y C34. El grupo hidrófobo puede tener 16 o más átomos de carbono. Los grupos hidrófobos adecuados
15 ejemplares se pueden seleccionar del grupo que comprende: ésterol, colesterol, palmitoilo, hexadec-8-enoilo, oleilo, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoilo, dioctanoilo y acilo C16-C20. De acuerdo con el documento WO'346, los grupos hidrófobos que tienen menos de 16 átomos de carbono son menos eficaces para potenciar el direccionamiento de los polinucleótidos, pero se pueden usar en múltiples copias (por ejemplo, 2×, como 2× C8 o C10, C12 o C14) para potenciar la eficacia. Los moduladores farmacocinéticos útiles como restos de direccionamiento de polinucleótidos se
20 pueden seleccionar del grupo que consiste en: colesterol, grupo alquilo, grupo alquenoilo, grupo alquinilo, grupo arilo, grupo aralquilo, grupo aralquenoilo y grupo aralquinilo, cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico. Los moduladores farmacocinéticos son preferentemente hidratos de carbono, que contienen solo átomos de carbono e hidrógeno. Sin embargo, se pueden permitir las sustituciones o los heteroátomos que mantienen la hidrofobia, por ejemplo, el flúor.

25 Sorprendentemente, los autores de la presente invención han descubierto que los conjugados con GalNac para su uso con oligómeros de LNA no requieren un modulador farmacocinético y, como tal, en algunos modos de realización, el conjugado con GalNac no se une covalentemente a un resto lipófilo o hidrófobo, tal como los descritos en el presente documento, por ejemplo, no comprenden un ácido graso C8-C36 o un ésterol. Por lo tanto, la invención también
30 proporciona conjugados con GalNac y oligómeros de LNA que no comprenden un modulador farmacocinético lipófilo o hidrófobo o un grupo/resto de conjugado.

Conjugados lipófilos

35 Los compuestos de la invención pueden ser conjugados que comprenden el oligómero (A) y un conjugado lipófilo (C). Se ha descubierto que el conector bioescindible (B) es, en particular, eficaz para mantener o potenciar la actividad de dichos conjugados de oligómeros. En algunos modos de realización, el grupo de conjugado (C) y/o el grupo conector (Y) comprenden un grupo lipófilo.

40 Los restos de conjugados representativos pueden incluir moléculas lipófilas (aromáticas y no aromáticas), incluyendo moléculas de ésterol y esteroides. Los restos de conjugados lipófilos se pueden usar, por ejemplo, para contrarrestar la naturaleza hidrófila de un compuesto oligomérico y potenciar la penetración celular. Los restos lipófilos incluyen, por ejemplo, esteroides y compuestos relacionados tales como colesterol (patente de EE. UU. n.º 4.958.013 y Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553), tiocolésterol (Oberhauser *et al.*, Nucl Acids Res., 1992,
45 20, 533), lanosterol, coprostanol, estigmasterol, ergosterol, calciferol, ácido cólico, ácido desoxicólico, estrona, estradiol, estratriol, progesterona, estilbestrol, testosterona, androsterona, desoxicorticosterona, cortisona, 17-hidroxycorticosterona, sus derivados y similares.

Otros restos de conjugados lipófilos incluyen grupos alifáticos, tales como, por ejemplo, alquilos, alquenoilos y alquinilos de cadena lineal, ramificados y cíclicos. Los grupos alifáticos pueden tener, por ejemplo, 5 hasta aproximadamente
50 50, 6 hasta aproximadamente 50, 8 hasta aproximadamente 50, o 10 hasta aproximadamente 50 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alifáticos incluyen undecilo, dodecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, terpenos, bornilo, adamantilo, derivados de los mismos y similares. En algunos modos de realización, uno o más átomos de carbono en el grupo alifático se pueden reemplazar por un heteroátomo tal como O, S o N (por ejemplo, geraniloxihexilo). Otros restos de conjugados lipófilos adecuados incluyen derivados alifáticos de gliceroles tales como alquilgliceroles, bis(alquil)gliceroles, tris(alquil)gliceroles, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. En algunos
55 modos de realización, el conjugado lipófilo es di-hexildecil-*rac*-glicerol o 1,2-di-*O*-hexildecil-*rac*-glicerol (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea, *et al.*, Nuc. Acids Res., 1990, 18, 3777) o fosfonatos de los mismos. Las funcionalidades grasas saturadas e insaturadas, tales como, por ejemplo, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos y aminas grasas, también pueden servir como restos de conjugados lipófilos. En algunos modos de realización,
60 las funcionalidades grasas pueden contener de aproximadamente 6 carbonos hasta aproximadamente 30 o aproximadamente 8 hasta aproximadamente 22 carbonos. Los ejemplos de ácidos grasos incluyen los ácidos cáprico, caprílico, láurico, palmítico, mirístico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquidónico, icosenoico y similares.

65 En otros modos de realización, los grupos de conjugados lipófilos pueden ser grupos aromáticos policíclicos que tienen de 6 hasta aproximadamente 50, 10 hasta aproximadamente 50, o 14 hasta aproximadamente 40 átomos de carbono.

- Los ejemplos de grupos aromáticos policíclicos incluyen pirenos, purinas, acridinas, xantenos, fluorenos, fenantrenos, antracenos, quinolinas, isoquinolinas, naftalenos, derivados de los mismos y similares. Otros restos de conjugados lipófilos adecuados incluyen mentoles, tritilos (por ejemplo, dimetoxitritilo (DMT)), fenoxazinas, ácido lipoico, fosfolípidos, éteres, tioéteres (por ejemplo, hexil-S-tritilitol), derivados de los mismos y similares. La preparación de conjugados lipófilos de compuestos oligoméricos está bien descrita en la técnica, tal como en, por ejemplo, Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J., 1991, 10, 1111; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1993, 75, 49; (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229, y Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651.
- Los compuestos oligoméricos que contienen restos de conjugados con afinidad por lipoproteínas de baja densidad (LDL) pueden ayudar a proporcionar un sistema de administración dirigida eficaz. Los altos niveles de expresión de receptores para LDL en células tumorales hacen de LDL un vehículo atractivo para la administración selectiva de fármacos a estas células (Rump, *et al.*, Bioconjugate Chem., 1998, 9, 341; Firestone, Bioconjugate Chem., 1994, 5, 105; Mishra, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229). Los restos que tienen afinidad por LDL incluyen muchos grupos lipófilos tales como esteroides (por ejemplo, colesterol), ácidos grasos, derivados de los mismos y combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, los restos de conjugados que tienen afinidad por LDL pueden ser ésteres dioleílicos de ácidos cólicos tales como ácido quenodesoxicólico y ácido litocólico.
- En algunos modos de realización, el grupo de conjugado es o puede comprender un resto lipófilo, tal como un esteroil (por ejemplo, colesterol, colesterilo, colestanol, estigmasterol, ácido colánico y ergosterol). En algunos modos de realización, el conjugado es o puede comprender colesterol. Véase, por ejemplo, Soutschek *et al.*, Nature (2004) 432, 173; Krützfeldt Nature 2005, NAR 2007.
- En algunos modos de realización, el conjugado es, o puede comprender un lípido, un fosfolípido o un alcohol lipófilo, tal como lípidos catiónicos, lípidos neutros, esfingolípidos y ácidos grasos tales como ácidos esteárico, oleico, eláidico, linoleico, linoleáidico, linoleico y mirístico. En algunos modos de realización, el ácido graso comprende una cadena de alquilo C4-C30 saturada o insaturada. La cadena de alquilo puede ser lineal o ramificada.
- En algunos modos de realización, los conjugados lipófilos pueden ser o pueden comprender biotina. En algunos modos de realización, el conjugado lipófilo puede ser o puede comprender un glicérido o éster de glicérido.
- Se pueden usar conjugados lipófilos, tales como colesterol o como se divulga en el presente documento, para potenciar la administración del oligonucleótido a, por ejemplo, el hígado (típicamente los hepatocitos).
- Las siguientes referencias se refieren al uso de conjugados lipófilos: Kobylanska *et al.*, Acta Biochim Pol. (1999); 46(3): 679-91. Felber *et al.*, Biomaterials (2012) 33(25): 599-65; Grijalvo *et al.*, J Org Chem (2010) 75(20): 6806-13. Koufaki *et al.*, Curr Med Chem (2009) 16(35): 4728-42. Godeau *et al.*, J. Med. Chem. (2008) 51(15): 4374-6.

Conjugados poliméricos

- Los restos de conjugados también pueden incluir polímeros. Los polímeros pueden proporcionar un volumen añadido y diversos grupos funcionales para afectar la permeación, el transporte celular y la localización del compuesto oligomérico conjugado. Por ejemplo, el aumento del radio hidrodinámico provocado por la conjugación de un compuesto oligomérico con un polímero puede ayudar a evitar la entrada en el núcleo y fomentar la localización en el citoplasma. En algunos modos de realización, el polímero no reduce sustancialmente la captación celular ni interfiere en la hibridación a una hebra complementaria u otra diana. En otros modos de realización, el resto de polímero del conjugado tiene, por ejemplo, un peso molecular de menos de aproximadamente 40, menos de aproximadamente 30, o menos de aproximadamente 20 kDa. Adicionalmente, los restos de conjugados poliméricos pueden ser hidrosolubles y, opcionalmente, comprenden además otros restos de conjugado tales como péptidos, hidratos de carbono, fármacos, grupos indicadores u otros restos de conjugados.
- En algunos modos de realización, los conjugados poliméricos incluyen polietilenglicol (PEG) y copolímeros y derivados de los mismos. Se ha demostrado que la conjugación con PEG aumenta la estabilidad de la nucleasa de un compuesto oligomérico. Los restos de conjugado con PEG pueden ser de cualquier peso molecular, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, aproximadamente 2000, aproximadamente 5000, aproximadamente 10 000 y más alto. En algunos modos de realización, los restos de conjugado con PEG contienen al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 25 residuos de etilenglicol. En otros modos de realización, el resto de conjugado con PEG contiene de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10, aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7, o aproximadamente 6 residuos de etilenglicol. El resto de conjugado con PEG también se puede modificar de modo que un hidroxilo terminal sea sustituido por alcoxi, carboxi, acilo, amido u otra funcionalidad. Otros restos de conjugados, tales como grupos indicadores, incluyendo, por ejemplo, biotina o fluoresceína, también se pueden unir a un resto de conjugado con PEG. Los copolímeros de PEG también son adecuados como restos de conjugados. La preparación y la actividad biológica de los conjugados con polietilenglicol de oligonucleótidos se describen, por ejemplo, en Bonora, *et al.*, Nucleosides Nucleotides, 1999, 18, 1723; Bonora, *et al.*, Farmaco, 1998, 53, 634; Efimov, Bioorg. Khim. 1993, 19, 800; y Jaschke, *et al.*, Nucleic Acids Res., 1994, 22,

4810. Otros ejemplos de restos de conjugados con PEG y la preparación de los compuestos oligoméricos conjugados correspondientes se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.904.582 y 5.672.662. Los compuestos oligoméricos conjugados con uno o más restos de PEG están disponibles comercialmente.

5 Otros polímeros adecuados como restos de conjugados incluyen poliaminas, polipéptidos, polimetacrilatos (por ejemplo, metacrilato de hidroxilpropilo (HPMA)), poli(L-lactida), poli DL lactida-co-glicólido (PGLA), poli(ácidos acrílicos), polietileniminas (PEI), poli(ácidos alquilacrílico), poliuretanos, poli(acrilamidas, *N*-alquilacrilamidas, poliespermina (PSP), poliéteres, ciclodextrinas, derivados de los mismos y copolímeros de los mismos. Muchos polímeros, tales como PEG y las poliaminas, tienen receptores presentes en determinadas células, lo que facilita la captación celular. Las poliaminas y otros polímeros que contienen aminas pueden existir en forma protonada a pH fisiológico, contrarrestando eficazmente una cadena principal aniónica de algunos compuestos oligoméricos, potenciando eficazmente la permeación celular. Algunos ejemplos de poliaminas incluyen polipéptidos (por ejemplo, polilisina, poliornitina, polihistadina, poliarginina y copolímeros de los mismos), trielentetraamina, espermina, polispermina, espermidina, sinnoespermidina, espermidina ramificada en C y derivados de los mismos. La preparación y la actividad biológica de los conjugados con poliamina se describen, por ejemplo, en Guzaev, *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 3671; Corey, *et al.*, J Am. Chem. Soc., 1995, 117, 9373; y Prakash, *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4, 1733. Ejemplos de conjugados polipeptídicos de oligonucleótidos se proporcionan, por ejemplo, en Wei, *et al.*, Nucleic Acids Res., 1996, 24, 655 y Zhu, *et al.*, Antisense Res. Dev., 1993, 3, 265. También se pueden usar polímeros dendrímicos como restos de conjugados, tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.714.166. Como se analiza anteriormente para las poliaminas y polímeros relacionados, otros restos que contienen aminas también pueden servir como restos de conjugados adecuados debido, por ejemplo, a la formación de especies catiónicas en condiciones fisiológicas. Ejemplos de grupos que contienen aminas incluyen 3-aminopropilo, 3-(*N,N*-dimetilamino)propilo, 2-(2-(*N,N*-dimetilamino)etoxi)etilo, 2-(*N*-(2-aminoetil)-*N*-metilaminooxi)etilo, 2-(1-imidazolil)etilo y similares. El resto G-clamp también puede servir como un resto de conjugado que contiene amina (Lin, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531).

En algunos modos de realización, el conjugado puede ser, o puede comprender, un polímero, tal como un polímero seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), poliamidoamina (PAA), óxido de polietileno y polietilenimina (PEI). Galactosa, lactosa, *n*-acetilgalactosamina, manosa, manosa-6-fosfato, en algunos modos de realización, el polímero es un polímero policatiónico. En algunos modos de realización, los restos de conjugados pueden ser, o estar basados en (incluir), polímeros catiónicos. Numerosos estudios han demostrado que los polímeros catiónicos, tales como la albúmina catiónica, pueden potenciar en gran medida la administración a determinados tipos de células y/o tejidos (por ejemplo, la administración al cerebro, véase Lu, W. *et al.* (2005) J of Control Release 107:428-448). Dados los beneficios de estas moléculas, los restos de conjugados pueden ser polímeros catiónicos tales como polietilenimina, dendrímeros, sales de poli(alquilpiridinio) o albúmina catiónica. En algunos modos de realización es un polímero hidrófilo. En algunos modos de realización, el polímero es poli(vinilpirrolidona) (PVP). En algunos modos de realización, el polímero es una poliamina o poliamida (por ejemplo, documentos US7.816.337 y US5525465). Para conjugados de polímeros, véanse, por ejemplo, Zhao *et al.*, Bioconjugate Chem 2005, 16, 758-766; Kim *et al.*, J. Control Release (2006) 116; 123. Pettit *et al.*, Ther. Deliv. (2011) 2(7): 907-17. Yang *et al.*, Bioconjug Chem (2009) 20(2): 213-21. Winkler *et al.* (2009) Eur J Med Chem 44(2): 670-7. Zelikin *et al.*, Biomacromolecules (2007) 8(9): 2950-3. Véase también el documento WO12092373 que se refiere a conjugados para administración de polinucleótidos escindibles enzimáticamente.

Conjugados con proteínas y péptidos

45 Otros restos de conjugados pueden incluir proteínas, subunidades o fragmentos de las mismas. Las proteínas incluyen, por ejemplo, enzimas, enzimas indicadoras, anticuerpos, receptores y similares. En algunos modos de realización, los restos de conjugado con proteínas pueden ser anticuerpos o fragmentos de los mismos (Kuijpers, *et al.*, Bioconjugate Chem., 1993, 4, 94). Se pueden diseñar anticuerpos para unirse a las dianas deseadas, como antígenos tumorales y otros relacionados con enfermedades. En otros modos de realización, los restos de conjugados con proteínas pueden ser proteínas séricas tales como HAS o glucoproteínas tales como asialoglucoproteína (Rajur, *et al.*, Bioconjugate Chem., 1997, 6, 935). Aún en otros modos de realización, los compuestos oligoméricos se pueden conjugar con proteínas relacionadas con ARNi, complejos de proteínas relacionadas con ARNi, subunidades y fragmentos de los mismos. Por ejemplo, se pueden conjugar compuestos oligoméricos con Dicer o RISC. Los intercaladores y los ligandos del surco menor (MGB) también pueden ser adecuados como restos de conjugados. En algunos modos de realización, el MGB puede contener subunidades de repetición de DPI (1,2-dihidro-3*H*-pirrolo(2,3-*e*)indol-7-carboxilato) o derivados de las mismas (Lukhtanov, *et al.*, Bioconjugate Chem., 1996, 7, 564 y Afonina, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 3199). Los intercaladores adecuados incluyen, por ejemplo, aromáticos policíclicos tales como naftaleno, perileno, fenantridina, benzofenantridina, fenazina, antraquinona, acridina y derivados de los mismos. Los intercaladores/ligandos híbridos incluyen el ligando fotonucleasa/intercalador éster 6-[[[9-[[6-(4-nitrobenzamido)hexil]amino]acridin-4-il]carbonil]amino]hexanoil-pentafluorofenilico. Este compuesto es tanto un resto de acridina que es un intercalador como un grupo *p*-nitro benzamido que es una fotonucleasa. En otros modos de realización, los agentes de escisión pueden servir como restos de conjugados. Los agentes de escisión pueden facilitar la degradación de la diana, tal como los ácidos nucleicos de la diana, por mecanismos de escisión hidrolítica u oxidoreductora. Los grupos de escisión que pueden ser adecuados como restos de conjugados incluyen, por ejemplo, metalocomplejos, péptidos, aminas, enzimas y construcciones que contienen constituyentes de los sitios

activos de nucleasas tales como imidazol, guanidinio, carboxilo, grupos amino, etc.). Los ejemplos de metalocomplejos incluyen, por ejemplo, complejos de Cu-terpiridilo, complejos de Fe-porfirina, complejos de Ru y complejos de lantánidos tales como diversos complejos de Eu(III) (Hall, *et al.*, Chem. Biol, 1994, 1, 185; Huang, *et al.*, J. Biol. Inorg. Chem., 2000, 5, 85; y Baker, *et al.*, Nucleic Acids Res., 1999, 27, 1547). Otros metalocomplejos con propiedades de escisión incluyen metaloporfirinas y derivados de las mismas. Los péptidos de ejemplo con propiedades de escisión de la diana incluyen los dedos de zinc (patente de EE. UU. n.º 6.365.379; Lima, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 10010). Construcciones de ejemplo que contienen constituyentes del sitio activo de la nucleasa incluyen bisimidazol e histamina.

Los restos de conjugados también pueden incluir péptidos. Los péptidos adecuados pueden tener de 2 hasta aproximadamente 30, de 2 hasta aproximadamente 20, de 2 hasta aproximadamente 15, o de 2 hasta aproximadamente 10 residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos pueden ser naturales o no naturales, incluyendo los isómeros tanto D como L. En algunos modos de realización, los restos de conjugados peptídicos son péptidos sensibles al pH tales como péptidos fusogénicos. Los péptidos fusogénicos pueden facilitar la liberación endosomal de agentes tales como compuestos oligoméricos al citoplasma. Se cree que los péptidos fusogénicos cambian de conformación en el pH ácido, desestabilizando eficazmente la membrana endosómica, potenciando de este modo la administración citoplásmica de los contenidos endosómicos. Los ejemplos de péptidos fusogénicos incluyen péptidos derivados de polimixina B, gripe HA2, GALA, KALA, EALA, péptido derivado de melitina, péptido a-helicoidal o péptido de amiloide beta de Alzheimer, y similares. La preparación y la actividad biológica de los oligonucleótidos conjugados con péptidos fusogénicos se describen, por ejemplo, en Bongartz, *et al.*, Nucleic Acids Res., 1994, 22, 4681 y las patente de EE. UU. n.º 6.559.279 y 6.344.436. Otros péptidos que pueden servir como restos de conjugados incluyen péptidos de administración que tienen la capacidad de transportar moléculas polares relativamente grandes (incluyendo péptidos, oligonucleótidos y proteínas) a través de las membranas celulares. Los ejemplos de péptidos de administración incluyen el péptido Tat de la proteína Tat del VIH y el péptido Ant de la proteína de la antena de *Drosophila*. La conjugación de Tat y Ant con oligonucleótidos se describe, por ejemplo, en Astriab-Fisher, *et al.*, Biochem. Pharmacol, 2000, 60, 83. Estos y otros péptidos de administración que se pueden usar como restos de conjugados se proporcionan a continuación en la tabla I:

Los péptidos de administración conjugados pueden ayudar a controlar la localización de compuestos oligoméricos en regiones específicas de una célula, incluidos, por ejemplo, el citoplasma, el núcleo, el nucléolo y el retículo endoplásmico (ER). La localización nuclear se puede efectuar mediante la conjugación de una señal de localización nuclear (NLS). Por el contrario, la localización citoplásmica se puede facilitar mediante la conjugación de una señal de exportación nuclear (NES). Los péptidos adecuados para la localización de compuestos oligoméricos conjugados en el núcleo incluyen, por ejemplo, el péptido *N,N*-dipalmitilglicil-*apo E* o el péptido *N,N*-dipalmitilglicil-apolipoproteína E (dpGapoE) (Liu, *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol, 1999, 19, 2207; Chaloin, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 243, 601). La localización en el núcleo o nucleolar también se puede facilitar mediante péptidos que tienen motivos ricos en arginina y/o lisina, tal como en los péptidos derivados del VIH-1 Tat, FXR2P y angiogenina (Lixin, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001, 284, 185). Además, el péptido señal de localización nuclear (NLS) derivado del antígeno T de SV40 (Branden, *et al.*, Nature Biotech, 1999, 17, 784) se puede usar para administrar compuestos oligoméricos conjugados al núcleo de una célula. Otros péptidos adecuados con propiedades de localización nuclear o nucleolar se describen, por ejemplo, en Antopolsky, *et al.*, Bioconjugate Chem., 1999, 10, 598; Zanta, *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. USA, 1999 (antígeno de tumor grande del virus 40 de simio); Hum. Mol. Genetics, 2000, 9, 1487; y FEBS Lett., 2002, 532, 36).

En algunos modos de realización, el péptido de administración para localización en el núcleo o nucleolar comprende al menos tres residuos de arginina consecutivos o al menos cuatro residuos de arginina consecutivos. La localización nuclear también se puede facilitar mediante conjugados peptídicos que contienen motivos de repetición RS, RE o RD (Cazalla, *et al.*, Mol Cell. Biol, 2002, 22, 6871). En algunos modos de realización, el conjugado peptídico contiene al menos dos motivos RS, RE o RD.

La localización de los compuestos oligoméricos en el RE se puede efectuar, por ejemplo, mediante conjugación con el péptido señal KDEL (SEQ ID NO: 18) (Arar, *et al.*, Bioconjugate Chem., 1995, 6, 573; Pichon, *et al.*, Mol. Pharmacol. 1997, 57, 431). La localización citoplásmica de compuestos oligoméricos se puede facilitar mediante conjugación con péptidos que tienen, por ejemplo, una señal de exportación nuclear (NES) (Meunier, *et al.*, Nucleic Acids Res., 1999, 27, 2730). Los péptidos NES incluyen péptidos NES ricos en leucina derivados del VIH-1 Rev (Henderson, *et al.*, Exp. Cell Res., 2000, 256, 213), el factor de transcripción III A, MAPKK, PKI-alfa, ciclina B1 y actina (Wada, *et al.*, EMBO J., 1998, 17, 1635) y proteínas relacionadas. Los péptidos antimicrobianos, tales como los derivados de la dermaseptina, también pueden facilitar la localización citoplásmica (Hariton-Gazal, *et al.*, Biochemistry, 2002, 41, 9208). Los péptidos que contienen motivos de repetición RG y/o KS también pueden ser adecuados para dirigir compuestos oligoméricos al citoplasma. En algunos modos de realización, los restos de conjugado peptídico contienen al menos dos motivos RG, al menos dos motivos KS, o al menos un motivo RG y un motivo KS. Como se usa en todo el documento, "péptido" incluye no solo la molécula o secuencia específica citada en el presente documento (si está presente), sino que también incluye fragmentos de la misma y moléculas que comprenden la totalidad o parte de la secuencia citada, donde se retiene la funcionalidad deseada. En algunos modos de realización, los fragmentos de péptidos contienen no menos de 6 aminoácidos. Los péptidos también pueden contener sustituciones de aminoácidos conservadoras que no cambian sustancialmente sus características funcionales. La sustitución conservadora se puede hacer entre los

siguientes conjuntos de aminoácidos funcionalmente similares: neutro-débilmente hidrófobo (T, A, G, P, S, T), hidrófilo-aminoácido (N, D, Q, E), hidrófilo-básico (I, M, L, V) e hidrófobo-aromático (F, W, Y). Los péptidos también incluyen péptidos homólogos. La homología se puede medir de acuerdo con el porcentaje de identidad, usando, por ejemplo, el algoritmo BLAST (parámetros predeterminados para secuencias cortas). Por ejemplo, los péptidos homólogos pueden tener una identidad mayor de un 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento. Los procedimientos para conjugar péptidos con compuestos oligoméricos tales como oligonucleótidos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.559.279.

En algunos modos de realización, el resto de conjugado es o comprende una proteína o péptido. En algunos modos de realización, el péptido es un péptido que penetra en las células, por ejemplo, Penetratin, transportano, Peptaibol (por ejemplo, tricolorin-XIIa (TV-XIIa)), péptido TAT (VIH). En algunos modos de realización, el péptido es poliarginina (por ejemplo, estearil-(RxR)(4)). En algunos modos de realización, el péptido es *N*-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HPMA) que contiene el tetrapéptido Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG). En algunos modos de realización, el péptido es un péptido amiloide beta. En algunos modos de realización, la proteína o el péptido en un anticuerpo o un sitio de unión a antígeno que contiene un fragmento del mismo (sitio de unión de epítipo). En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende M6P-HPMA-GFLG (véase Yang *et al.* 2009). En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende péptidos ricos en arginina (documento WO2005/115479); véase también el documento WO09005793, péptidos RGD. En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende un vehículo de proteínas (por ejemplo, albúmina, conjugado albúmina-PEG, RGD-PEG-albúmina) (Kang *et al.*), véase también el documento WO09045536. En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende oligolisina histidilada (por ejemplo, el documento WO0032764). En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende glucoproteínas: transferrina-policación (por ejemplo, los documentos US5354844, WO9217210, WO9213570). En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende asialoglucoproteína (documento US5346696). En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende una proteína policatiónica (por ejemplo, el documento US603095). En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende conjugados de poliseudolisina (por ejemplo, el documento WO07113531).

Grupos indicadores y de conjugado con tinte

Los grupos indicadores que son adecuados como restos de conjugados incluyen cualquier resto que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectroscópicos. Los ejemplos de grupos indicadores incluyen tintes, fluoróforos, fósforos, radiomarcadores y similares. En algunos modos de realización, el grupo indicador es biotina, fluoresceína, rodamina, cumarina o compuestos relacionados. Los grupos indicadores también se pueden unir a otros restos de conjugados. En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende un marcador o un tinte, tal como un fluoróforo, tal como FAM (carboxifluoresceína).

Los agentes de reticulación también pueden servir como restos de conjugados. Los agentes de reticulación facilitan el enlace covalente de los compuestos oligoméricos conjugados con otros compuestos. En algunos modos de realización, los agentes de reticulación pueden unir covalentemente ácidos nucleicos bicatenarios, aumentando eficazmente la estabilidad de la doble hebra y modulando las propiedades farmacocinéticas. En algunos modos de realización, los agentes de reticulación pueden ser fotoactivos u oxidorreductores activos. Los agentes de reticulación de ejemplo incluyen psoralenos que pueden facilitar la reticulación entre hebras de ácidos nucleicos mediante fotoactivación (Lin, *et al.*, Faseb J, 1995, 9, 1371). Otros agentes de reticulación incluyen, por ejemplo, mitomicina C y análogos de los mismos (Maruenda, *et al.*, Bioconjugate Chem., 1996, 7, 541; Maruenda, *et al.*, Anti-Cancer Drug Des., 1997, 12, 473; and Huh, *et al.*, Bioconjugate Chem., 1996, 7, 659). La reticulación mediada por mitomicina C se puede efectuar por activación reductora, tal como, por ejemplo, con agentes reductores biológicos (por ejemplo, NADPH-citocromo c reductasa/sistema NADPH). Otros agentes de fotorreticulación incluyen aril azidas tales como, por ejemplo, *N*-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HSAB) y *N*-succinimidil-6(-4'-azido-2'-nitrofenil-amino)hexanoato (SANPAH). Las aril azidas conjugadas con oligonucleótidos efectúan la reticulación con ácidos nucleicos y proteínas tras la irradiación. También se pueden reticular con proteínas portadoras (tales como KLH o BSA).

Varios grupos de conjugados funcionales

Otros restos de conjugados adecuados incluyen, por ejemplo, poliboranos, carboranos, metalopoliboranos, metalocarboranos, derivados de los mismos y similares (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.272.250).

Muchos fármacos, ligandos de receptores, toxinas, moléculas indicadoras y otras moléculas pequeñas pueden servir como restos de conjugados. Los restos de conjugados con moléculas pequeñas a menudo tienen interacciones específicas con determinados receptores u otras biomoléculas, lo que permite dirigir los compuestos oligoméricos conjugados a células o tejidos específicos. Ejemplos de restos de conjugados con moléculas pequeñas incluyen ácido micofenólico (inhibidor de la inosina-5'-monofosfato dihidrogenasa; útil para tratar la psoriasis y otros trastornos cutáneos), curcumina (tiene aplicaciones terapéuticas para la psoriasis, el cáncer, enfermedades bacterianas y víricas). En otros modos de realización, los restos de conjugados con moléculas pequeñas pueden ser ligandos de proteínas del suero tales como la seroalbúmina humana (HSA). Son conocidos numerosos ligandos de HSA e incluyen, por ejemplo, ácidos arilpropiónicos, ibuprofeno, warfarina, fenilbutazona, suprofen, carprofeno, fenfufeno, ketoprofeno, ácido acetilsalicílico, indometacina, (S)- (+)-pranoprofeno, dansilsarcosina, 2,3-triidobenzoico, ácido

flufenámico, ácido fólico, benzotiadiazida, clorotiazida, diacepinas, indometicina, barbitúricos, cefalosporinas, sulfamidas, antibacterianos, antibióticos (por ejemplo, puromicina y pamamicina) y similares. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen, por ejemplo, en el documento WO 00/76554.

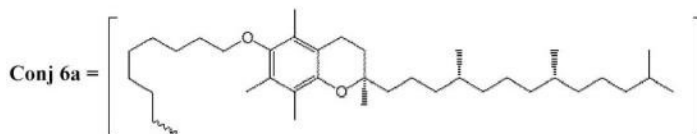
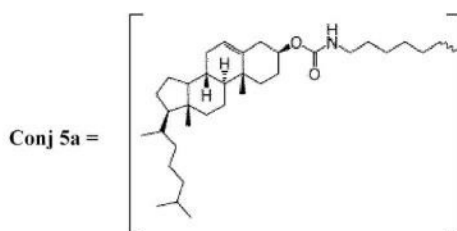
5 En algunos modos de realización, el conjugado puede ser o comprender una molécula pequeña, tal como un fármaco de molécula pequeña o profármaco. Determinados fármacos son altamente eficaces para dirigirse a células o tejidos específicos y, como tales, se pueden usar para dirigir un oligonucleótido a su sitio de acción pretendido. Además, la molécula pequeña puede tener en sí misma una actividad terapéutica, típicamente una vez escindida del componente oligonucleotídico del conjugado. Los ejemplos incluyen bisfosfonatos (ampliamente usados para el tratamiento de la osteoporosis y eficaces para dirigirse a tejidos óseos), fármacos antineoplásicos y agentes quimioterápicos (por ejemplo, doxorubicina o mitomicina C; véase el documento US5776907). En algunos modos de realización, el fármaco puede ser un análogo nucleosídico, tal como un inhibidor de la nucleósido polimerasa.

15 Aún en otros modos de realización, los conjugados con moléculas pequeñas se pueden dirigir o unir a determinados receptores o células. Es conocido que los linfocitos T tienen grupos amino expuestos que pueden formar complejos de base de Schiff con moléculas apropiadas. Por tanto, las moléculas pequeñas que contienen grupos funcionales tales como aldehídos que pueden interactuar o reaccionar con grupos amino expuestos también pueden ser restos de conjugados adecuados. Se pueden conjugar tucaresol y compuestos relacionados con compuestos oligoméricos de modo que dejen al aldehído libre para interactuar con las dianas de los linfocitos T. Se cree que la interacción del tucaresol con los linfocitos T da como resultado la potenciación terapéutica del sistema inmunitario por la formación de base de Schiff (Rhodes, *et al.*, Nature, 1995, 377, 6544).

25 En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende un ligando del receptor (por ejemplo, la superficie celular). En algunos modos de realización, el conjugado es o comprende un ligando del receptor de folato, tal como un grupo de ácido fólico (véase, por ejemplo, el documento EP1572067 o los documentos WO2005/069994, WO2010/045584). Otros ligandos de los receptores de superficie celular incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, antígeno de membrana específico de la próstata, antígenos de superficie neuronal (véase el documento WO2011/131693)

30 En algunos modos de realización, los restos de conjugados son ligandos para receptores o se pueden asociar con moléculas que (a su vez) se asocian con receptores. Se incluyen en esta clase ácidos biliares, ligandos de fármacos de molécula pequeña, vitaminas, aptámeros, hidratos de carbono, péptidos (incluyendo, pero no limitados a, hormonas, proteínas, fragmentos de proteínas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos), proteínas víricas (por ejemplo, cápsides), toxinas (por ejemplo, toxinas bacterianas) y más. También se incluyen en esta clase los conjugados que son de naturaleza esteroidea, por ejemplo, colesterol, colestanol, ácido colánico, estigmasteroles, pregnolonas, progesteronas, corticosteronas, aldosteronas, testosteronas, estradioles, ergosteroles y más. Restos de conjugados preferentes de la divulgación son colesterol (CHOL), colestanol (CHLN), ácido colánico (CHLA), estigmasterol (STIG) y ergosterol (ERGO). En determinados modos de realización preferentes, el resto de conjugado es colesterol.

40 En algunos modos de realización, el conjugado comprende un esteroles, tal como colesterol o tocoferol, incluyendo opcionalmente un conector, tal como un conector de ácido graso, por ejemplo, un conector C6. En algunos modos de realización, los conjugados comprenden Conj5a o Conj6a.



45 Los restos de conjugados también pueden incluir vitaminas. Es conocido que las vitaminas se transportan a las células mediante numerosos sistemas de transporte celular. Típicamente, las vitaminas se pueden clasificar como hidrosolubles o liposolubles. Las vitaminas hidrosolubles incluyen tiamina, riboflavina, ácido nicotínico o niacina, el grupo piridoxal vitamina B6, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, coenzimas cobamida de B12, inositol, colina y ácido ascórbico. Las vitaminas liposolubles incluyen la familia de la vitamina A, la vitamina D, la familia de tocoferoles de la vitamina E y la vitamina K (y los fitoles). Los compuestos relacionados incluyen derivados retinoides tales como

50

tazaroteno y etretinato. En algunos modos de realización, el resto de conjugado incluye folato de ácido fólico) y/o una o más de sus diversas formas, tales como ácido dihidrofólico, ácido tetrahidrofólico, ácido folínico, ácido pteropoliglutámico, dihidrofolatos, tetrahidrofolatos, tetrahidropterinas, análogos del folato 1-deaza, 3-deaza, 5-deaza, 8-deaza, 10-deaza, 1,5-dideaza, 5,10-dideaza, 8,10-dideaza y 5,8-dideaza, y antifolatos. El folato está implicado en la biosíntesis de los ácidos nucleicos y, por lo tanto, influye en la supervivencia y la proliferación de las células. Los cofactores del folato desempeñan un papel en las transferencias de un carbono que son necesarias para la biosíntesis de los nucleósidos de pirimidina. Por lo tanto, las células tienen un sistema de transporte de folatos al citoplasma. Los receptores de folato también tienden a estar sobreexpresados en muchas células cancerosas humanas, y se ha informado del direccionamiento mediado por folato de los oligonucleótidos a células de cáncer de ovario (Li, *et al.*, Pharm. Res. 1998, 15, 1540). La preparación de conjugados de ácidos nucleicos con ácido fólico se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.528.631.

Los restos de conjugados con vitamina incluyen, por ejemplo, vitamina A (retinol) y/o compuestos relacionados. La familia de la vitamina A (retinoides), incluyendo el ácido retinoico y el retinol, se absorben y transportan típicamente a los tejidos diana a través de su interacción con proteínas específicas tal como la proteína de unión al retinol del citosol tipo II (CRBP-II), la proteína de unión al retinol (RBP) y la proteína de unión al retinol celular (CRBP). La familia de compuestos de vitamina A se puede unir a compuestos oligoméricos por medio de las funcionalidades de ácidos o alcoholes que se encuentran en los diversos miembros de la familia. Por ejemplo, la conjugación de un éster *N*-hidroxisuccinimídico de un resto ácido del ácido retinoico con una función amina en una cadena lateral conectora con un oligonucleótido puede dar como resultado el enlace del compuesto de vitamina A con el compuesto oligomérico por medio de un enlace amida. Además, el retinol se puede convertir en su fosforamida, que es útil para la conjugación en 5'. El alfa-tocoferol (vitamina E) y los otros tocoferoles (beta a zeta) se pueden conjugar con compuestos oligoméricos para potenciar la captación debido a su carácter lipófilo. Además, la vitamina D, y sus precursores de ergosterol, se pueden conjugar con compuestos oligoméricos a través de sus grupos hidroxilo activando en primer lugar los grupos hidroxilo a, por ejemplo, ésteres de hemisuccinato. La conjugación se puede efectuar, a continuación, directamente con el compuesto oligomérico o con una cadena lateral conectora amino del compuesto oligomérico. Otras vitaminas que se pueden conjugar con compuestos oligoméricos de forma similar incluyen tiamina, riboflavina, piridoxina, piridoxamina, piridoxal, desoxipiridoxina. La vitamina K liposoluble y los compuestos que contienen quinona relacionados se pueden conjugar por medio de grupos carbonilo en el anillo de quinona. El resto de fitol de la vitamina K también puede servir para potenciar la unión de los compuestos oligoméricos a las células.

Otros grupos funcionales que se pueden usar como conjugados en los compuestos de la invención incluyen conjugado con imidazol - imitadores del centro catalítico de la RNasa A (conjugados de poliamina-imidazol); véase Guerniou *et al.*, Nucleic Acids Res (2007); 35 (20): 6778-87.

Los conjugados son típicamente restos no nucleotídicos. Sin embargo, en el contexto de grupos de bloqueo o grupos de direccionamiento, o tratamientos con análogos nucleotídicos pequeños, se reconoce que el oligonucleótido se puede unir covalentemente a un resto de nucleótido por medio de la región fosfodiéster de ADN/ARN de la invención. Adecuadamente, un grupo de ácido nucleico, como se usa en el contexto de la invención, puede carecer, en algunos modos de realización, de complementariedad con la diana del oligonucleótido (región A).

En algunos modos de realización, el resto de bloqueo o de direccionamiento es un aptámero (véase, por ejemplo, Meng *et al.*, PLoS One (2012) 7(4): e33434, documentos WO2005/111238 y WO12078637).

Un grupo de bloqueo también puede ser o comprender una región oligonucleotídica que es complementaria de, por ejemplo, parte del oligonucleótido de antisentido. A este respecto, el oligonucleótido de bloqueo se une covalentemente a un oligonucleótido de antisentido por medio de la región de fosfodiéster de ADN/ARN (región b), y opcionalmente un conector. El oligonucleótido de bloqueo, en algunos modos de realización, por lo tanto, puede formar una doble hebra con el oligonucleótido de antisentido. Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos de bloqueo (como tercera región o región C) es una secuencia de oligonucleótidos corta de, por ejemplo, 3-10 nucleótidos de longitud que forma una doble hebra (es decir, es complementaria) con una longitud equivalente de la primera región. En algunos modos de realización, se usa un conector entre la segunda región y la región de bloqueo.

Como los péptidos de administración, los ácidos nucleicos también pueden servir como restos de tipo conjugados que pueden afectar a la localización de compuestos oligoméricos conjugados en una célula. Por ejemplo, los restos de conjugados con ácidos nucleicos pueden contener poli A, un motivo reconocido por la proteína de unión a poli A (PABP), que puede localizar moléculas que contienen poli A en el citoplasma (Gorlach, *et al.*, Exp. Cell Res., 1994, 211, 400). En algunos modos de realización, el resto de conjugado con ácido nucleico contiene al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20 y al menos 25 bases A consecutivas. El resto de conjugado con ácido nucleico también puede contener uno o más elementos de secuencia ricos en AU (ARE). Los ARE son reconocidos por proteínas de la familia ELAV que pueden facilitar la localización en el citoplasma (Bollig, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 301, 665). Los ejemplos de ARE incluyen UUAUUUAUU y secuencias que contienen múltiples repeticiones de este motivo. En otros modos de realización, el resto de conjugado con ácido nucleico contiene dos o más motivos AU o AUU. De forma similar, el resto de conjugado con ácido nucleico también puede contener uno o más elementos de secuencia ricos en CU (CRE)

(Wein, *et al.*, Eur. J. Biochem., 2003, 270, 350) que se pueden unir a proteínas HuD y/o HuR de la familia de proteínas ELAV. Al igual que con los ARE, los CRE pueden ayudar a localizar compuestos oligoméricos conjugados en el citoplasma. En algunos modos de realización, el resto de conjugado con ácido nucleico contiene el motivo (CUUU)_n, en el que, por ejemplo, n puede ser 1 hasta aproximadamente 20, 1 hasta aproximadamente 15, o 1 hasta aproximadamente 11. El motivo (CUUU)_n puede ir seguido o precedido opcionalmente por uno o más U. En algunos modos de realización, n es aproximadamente 9 hasta aproximadamente 12 o aproximadamente 11. El resto de conjugado con ácido nucleico también puede incluir sustratos de proteínas hnRNP (ribonucleoproteína nuclear heterogénea), algunos de los cuales están implicados en el transporte de ácidos nucleicos entre el núcleo y el citoplasma (por ejemplo, hnRNP A1 y hnRNP K; véase, por ejemplo, Mili, *et al.*, Mol. Cell Biol, 2001, 21, 7307). Algunos ejemplos de sustratos hnRNP incluyen ácidos nucleicos que contienen la secuencia UAGGA/U o (GG)ACUAGC(A). Otros restos de conjugado con ácido nucleico pueden incluir cadenas Y u otros trectos que se pueden unir a, por ejemplo, linRNP I. En algunos modos de realización, el conjugado con ácido nucleico puede contener al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20 y al menos 25 bases de pirimidina consecutivas. En otros modos de realización, el conjugado con ácido nucleico puede contener más de un 50, más de un 60, más de un 70, más de un 80, más de un 90 o más de un 95 por ciento de bases de pirimidina.

Otros restos de tipo conjugado con ácido nucleico pueden incluir secuencias de reconocimiento de pumilio (proteína put), como se describe en Wang, *et al.*, Cell, 2002, 110, 501. Ejemplos de secuencias de reconocimiento de pumilio pueden incluir UGUANAUR, donde N puede ser cualquier base y R puede ser una base de purina. La localización en el citoplasma se puede facilitar mediante restos de conjugados con ácido nucleico que contienen ARE y/o CRE. Los restos de tipo conjugado con ácido nucleico que sirven como sustratos de hnRNP pueden facilitar la localización de compuestos oligoméricos conjugados en el citoplasma (por ejemplo, hnRNP A1 o K) o el núcleo (por ejemplo, hnRNP I). Además, la localización en el núcleo se puede facilitar mediante restos de tipo conjugado con ácido nucleico que contienen trectos de polipirimidina.

Un grupo reactivo

Un grupo reactivo es un grupo que se usa en la síntesis química, que en el contexto de la presente invención se puede usar para "conjuguar" el oligonucleótido, o de otro modo unir covalentemente el oligonucleótido a la tercera región (X), tal como el conjugado, grupo de bloqueo o grupo de direccionamiento, u opcionalmente el conector (Y). Un ejemplo de un grupo reactivo es una fosforamidita, que se usa ampliamente en la síntesis de oligonucleótidos.

Un grupo de activación

Un grupo de activación es un grupo que se puede activar para formar un grupo reactivo. A este respecto, un grupo de activación se puede considerar un grupo reactivo protegido, que se puede desproteger antes de permitir el uso del grupo reactivo, por ejemplo, en los procedimientos de síntesis/fabricación divulgados en el presente documento.

Grupo de enlace

Un enlace nucleosídico es el grupo de enlace entre nucleósidos en el oligonucleótido o, cuando está presente, también puede describir el grupo que une la tercera región (X o C) o el conector (Y) a la región B; por ejemplo, este conector puede ser un grupo de enlace (que contiene) fosfato o un grupo triazol.

Grupo de bloqueo (también denominado resto de bloqueo/bloqueador)

En algunos aspectos, la tercera región es una región de bloqueo. Un bloqueador es típicamente un conjugado o un oligonucleótido (típicamente no complementario de la región diana), que, por ejemplo (pero no limitado a) ya sea por impedimento estérico o por hibridación a la primera región (o primera y segunda regiones), evita o reduce la actividad del oligómero. La actividad (bloqueada) puede ser contra su diana pretendida (la diana) o, en algunos modos de realización, dianas no pretendidas (dianas inespecíficas).

El compuesto oligomérico de la invención, por lo tanto, puede comprender una primera región, tal como un oligonucleótido gápmero o gaper de LNA (tal como un gápmero de fórmula X'Y'Z), una segunda región que es un conector bioescindible, tal como la región B como se describe en el presente documento, y una tercera región, la región C, que comprende una región de al menos 2 nucleósidos consecutivos, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos que son complementarios de una parte correspondiente de la primera región. En algunos modos de realización, al menos 2 nucleósidos de la región C, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleósidos, son análogos nucleosídicos de alta afinidad, tal como LNA (BNA); en algunos modos de realización, estos pueden formar la parte distal de la región C. Los análogos nucleosídicos de alta afinidad de la región C pueden formar una secuencia contigua de análogos nucleosídicos de alta afinidad, que pueden estar flanqueados por otros nucleósidos, tales como nucleósidos de ADN (también parte de la región C, denominada parte proximal de la región C). En algunos modos de realización, la región C comprende entre 2 y 8 (tal como 3, 4, 5, 6 y 7 nucleótidos de LNA (BNA), y en el mismo modo de realización o en uno diferente, una región de entre 2 y 16 nucleótidos de ADN (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). En algunos modos de realización, la parte distal de la región B comprende una región contigua de

análogos nucleotídicos de alta afinidad, por ejemplo, una región contigua de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos de LNA. La región proximal puede comprender una región contigua de nucleótidos distintos de LNA, tal como a los que se hace referencia en el presente documento, tales como nucleótidos de ADN, tal como una región de 2-16 nucleótidos distintos de LNA. Sin embargo, también se entiende que la región proximal puede comprender análogos nucleotídicos de alta afinidad incluyendo LNA, pero como las regiones contiguas de LNA pueden restringir la flexibilidad conformacional de la región proximal (que se cree que actúa como un bucle), en algunos modos de realización puede ser útil para limitar el uso de tramos largos de LNA en la parte proximal (o parte de formación de bucle), tal como no más de 4 LNA consecutivos, tal como no más de 3 LNA consecutivos, o no más de 2 LNA consecutivos.

En algunos modos de realización, la región de otros nucleótidos en la región C (tales como nucleótidos de ADN) forma una secuencia contigua con la región B, es decir, es proximal al nucleótido terminal de la región B, de modo que la región de los nucleótidos de alta afinidad es distal a la región B. En dicho modo de realización, la región B y la parte proximal de la región C (por ejemplo, la región que comprende nucleótidos de ADN) pueden formar un bucle flexible, que permite que la parte distal de la región C hibride con la primera región. La parte proximal de la región C puede o no ser complementaria de una parte correspondiente de la región A. En algunos modos de realización, la parte distal de la región C es complementaria de los nucleótidos que forman una región que puede reclutar RNasa H, tal como la región de interrupción de un gámpero (denominada en el presente documento región Y'). En un modo de realización de este tipo, la región de bloqueo (región C) forma una doble hebra con la región de interrupción, o parte de la misma, bloqueando de este modo la disponibilidad de la región central del gámpero para interactuar con otras moléculas o la diana o dianas inespecíficas. Por lo tanto, la invención proporciona una solución a la toxicidad inherente de los oligonucleótidos de fosforotioato de ADN (que se usan típicamente para la región de interrupción de gámperos), ya que permite la activación controlada de oligómeros gámperos (región A) dentro del tejido o las células diana. En este sentido, el uso de una región de bloqueo puede actuar como un profármaco. Se reconoce que la región de bloqueo (región C o parte distal de la misma) también se puede dirigir hacia otras regiones de un oligómero, incluyendo un oligómero mixmero o totalmero, o las regiones flanqueantes de un gámpero, o a través de la región del ala y la región de interrupción de un gámpero. En un modo realización de este tipo, la hibridación de región C (o parte distal de la misma) a la región A (o parte de la región A) evita la hibridación de la parte correspondiente de la región A a las biomoléculas y, por lo tanto, también se puede usar para evitar la interacción no intencionada con otras biomoléculas, potenciando la especificidad, la actividad específica del tejido y disminuyendo el riesgo de toxicidad. Los enlaces internucleosídicos entre los nucleótidos de la región C pueden ser distintos de fosfodiéster, tales como fosforotioato.

Grupo de direccionamiento (también denominado resto de direccionamiento)

Un resto de direccionamiento es un grupo cuya presencia en el compuesto oligomérico provoca un patrón diferencial de biodistribución y/o captación celular del compuesto oligomérico. Los grupos de direccionamiento pueden ser, por ejemplo, ligandos de receptores, anticuerpos, hormonas o análogos de hormonas, aptámeros, etc. Los ejemplos muestran el uso del colesterol como grupo de direccionamiento: el colesterol es reconocido por el receptor de LDL en la superficie de los hepatocitos, lo que da como resultado la captación preferente de oligonucleótidos conjugados con colesterol en el hígado. Los ejemplos también ilustran el uso de GalNac, tocoferol y ácido fólico como grupos de direccionamiento.

Conjugados bioescindibles unidos a oligómeros

El compuesto oligomérico puede comprender opcionalmente una segunda región (región B) que se sitúa entre el oligómero (denominado región A) y el conjugado (denominado región C). La región B puede ser un conector, tal como un conector escindible (también denominado enlace fisiológicamente lábil).

En algunos casos, el compuesto descrito en el presente documento comprende un conector bioescindible (también conocido como conector fisiológicamente lábil, enlaces lábiles fisiológicos susceptibles a la nucleasa, o conector susceptible a la nucleasa), por ejemplo, el conector de nucleótidos fosfato (tal como la región B) o un conector peptídico, que une el oligómero (o secuencia de nucleótidos contiguos o región A) a un resto de conjugado (o región C).

Los conectores bioescindibles como se describen en el presente documento se refieren a conectores que son susceptibles de escisión en un tejido diana (es decir, fisiológicamente lábil), por ejemplo, el hígado y/o el riñón. Es preferente que la tasa de escisión observada en el tejido diana sea mayor que la encontrada en el suero sanguíneo. Los procedimientos adecuados para determinar el nivel (%) de escisión en el tejido (por ejemplo, el hígado o el riñón) y en el suero se encuentran en el ejemplo 6. En algunos modos de realización, el conector bioescindible (también denominado conector fisiológicamente lábil, o conector susceptible a la nucleasa), tal como la región B, en un compuesto de la invención, está al menos aproximadamente un 20 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 30 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 40 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 50 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 60 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 70 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 75 % escindido, en el ensayo de homogeneizado de hígado o riñón del ejemplo 6. En algunos modos de realización, la escisión (%) en suero, como se usa en el ensayo del ejemplo 6, es menos de aproximadamente un 20 %, tal como menos de aproximadamente un 10 %, tal como menos de un 5 %, tal como menos de aproximadamente un 1 %.

Los conectores bioescindibles como se describen en el presente documento se refieren a conectores que son susceptibles de escisión en un tejido diana (es decir, fisiológicamente lábil), por ejemplo, el hígado y/o el riñón. Es preferente que la tasa de escisión observada en el tejido diana sea mayor que la encontrada en el suero sanguíneo. Los procedimientos adecuados para determinar el nivel (%) de escisión en el tejido (por ejemplo, el hígado o el riñón) y en el suero se encuentran en el ejemplo 6. En algunos modos de realización, el conector bioescindible (también denominado conector fisiológicamente lábil, o conector susceptible a la nucleasa), tal como la región B, en un compuesto de la invención, está al menos aproximadamente un 20 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 30 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 40 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 50 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 60 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 70 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 75 % escindido, en el ensayo de homogeneizado de hígado o riñón del ejemplo 6. En algunos modos de realización, la escisión (%) en suero, como se usa en el ensayo del ejemplo 6, es menos de aproximadamente un 30 %, menos de aproximadamente un 20 %, tal como menos de aproximadamente un 10 %, tal como menos de un 5 %, tal como menos de aproximadamente un 1 %.

El conector bioescindible (también denominado conector fisiológicamente lábil, o conector susceptible a la nucleasa), tal como la región B, en un compuesto de la invención, es susceptible a la escisión de la nucleasa S1. La susceptibilidad a la escisión de S1 se puede evaluar usando el ensayo de nucleasa S1 mostrado en el ejemplo 6. En algunos modos de realización, el conector bioescindible (también conocido como conector fisiológicamente lábil, o conector susceptible a la nucleasa), tal como la región B, en un compuesto de la invención, está al menos aproximadamente un 30 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 40 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 50 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 60 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 70 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 80 % escindido, tal como al menos aproximadamente un 90 % escindido, tal como en al menos un 95 % escindido después de 120 minutos de incubación con nucleasa S1 de acuerdo con el ensayo usado en el ejemplo 6.

Enlaces lábiles fisiológicos susceptibles a la nucleasa: En algunos casos, el oligómero (también denominado compuesto o conjugado oligomérico) comprende tres regiones:

- i) una primera región (región A), que comprende 10-18 nucleótidos contiguos;
- ii) una segunda región (región B) que comprende un conector bioescindible
- iii) una tercera región (C) que comprende un resto de conjugado, un resto de direccionamiento, un resto de activación, en el que la tercera región se une covalentemente a la segunda región.

En algunos modos de realización, la región B puede ser un conector de nucleótidos fosfato. Por ejemplo, dichos conectores se pueden usar cuando el conjugado es un conjugado lipófilo, tal como un lípido, un ácido graso, un esteroles, tal como colesterol o tocoferol. Los conectores de nucleótidos fosfato también se pueden usar para otros conjugados, por ejemplo, conjugados con hidratos de carbono, tales como GalNac.

Péptido y otros conectores

En algunos modos de realización, el conector bioescindible (región B) es un péptido, tal como un conector peptídico de trilisina que se puede usar en un conjugado con polyGalNac, tal como un conjugado con triGalNac. Otros conectores conocidos en la técnica que se pueden usar, incluyendo conectores disulfuro (también denominados ditio o disulfuro en el presente documento). Otros conectores peptídicos incluyen, por ejemplo, un tripéptido Tyr-Asp(Asp) o un dipéptido Asp(Asp).

Conectores de nucleótidos de fosfato

En algunos modos de realización, la región B comprende entre 2 y 6 nucleótidos, que se unen covalentemente al nucleótido 5' o 3' de la primera región por medio de un grupo de enlace internucleosídico fosfodiéster, en la que

- a. el enlace internucleosídico entre la primera y la segunda región es un enlace fosfodiéster y el nucleósido de la segunda región [tal como inmediatamente] adyacente a la primera región es un nucleósido de ADN o ARN unido a fosfodiéster;

En algunos modos de realización, la región A y la región B forman una única secuencia de nucleótidos contiguos de 10-22, tal como 12-20 nucleótidos de longitud.

En algunos aspectos, el enlace internucleosídico entre la primera y segunda región se puede considerar parte de la segunda región.

Conectores

Un enlace o conector es una conexión entre dos átomos que une un grupo químico o segmento de interés a otro grupo químico o segmento de interés por medio de uno o más enlaces covalentes. Los restos de conjugado (o los restos de direccionamiento o bloqueo) se pueden unir al compuesto oligomérico directamente o a través de un resto de enlace (conector o atadura), un conector. Los conectores son restos bifuncionales que sirven para conectar covalentemente una tercera región, por ejemplo, un resto de conjugado, a un compuesto oligomérico (tal como a la región B). En algunos modos de realización, el conector comprende una estructura de cadena o un oligómero de unidades de repetición tales como unidades de etilenglicol o aminoácidos. El conector puede tener al menos dos funcionalidades, una para unirse al compuesto oligomérico y la otra para unirse al resto de conjugado. Las funcionalidades de conectores de ejemplo pueden ser electrófilas para reaccionar con grupos nucleófilos en el oligómero o resto de conjugado, o nucleófilas para reaccionar con grupos electrófilos. En algunos modos de realización, las funcionalidades del conector incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, fosforamido, fosfato, fosfito, insaturaciones (por ejemplo, enlaces dobles o triples) y similares. Algunos conectores de ejemplo incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), ácido 6-amiohexanoico (AHX o AHA), 6-amiohexiloxi, ácido 4-aminobutírico, ácido 4-aminociclohexilcarboxílico, 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxi-(6-amido-caproato) de succinimidilo (LCSMCC), *m*-maleimido-benzoilato de succinimidilo (MBS), *N*-*e*-maleimido-caproilato de succinimidilo (EMCS), 6-(beta-maleimido-propionamido)hexanoato de succinimidilo (SMPH), *N*-(α -maleimido acetato) de succinimidilo (AMAS), 4-(*p*-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), beta-alanina (beta-ALA), fenilglicina (PHG), ácido 4-aminociclohexanoico (ACHC), beta-(ciclopropil)alanina (beta-CYPR), ácido amino dodecanoico (ADC), dioles de alileno, polietilenglicoles, aminoácidos y similares.

Son conocidos en la técnica una amplia variedad de otros grupos conectores que pueden ser útiles en la unión de restos de conjugados a compuestos oligoméricos. Se puede encontrar una revisión de muchos de los grupos conectores útiles en, por ejemplo, Antisense Research and Applications, S. T. Crooke y B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350. Se ha usado un enlace disulfuro para unir el extremo 3' de un oligonucleótido a un péptido (Corey, *et al.*, Science 1987, 238, 1401; Zuckermann, *et al.*, J Am. Chem. Soc. 1988, 110, 1614; y Corey, *et al.*, J Am. Chem. Soc. 1989, 111,8524). Nelson, *et al.*, Nuc. Acidos Res. 1989, 17, 7187 describen un reactivo de enlace para unir biotina al extremo 3' de un oligonucleótido. Este reactivo, N-Fmoc-O-DMT-3-amino-1,2-propanodiol, está disponible comercialmente en Clontech Laboratories (Palo Alto, California) con el nombre de 3'-Amina. También está disponible comercialmente con el nombre de reactivo 3'-Amino-Modifier de Glen Research Corporation (Sterling, Virginia). Este reactivo también se utilizó para unir un péptido a un oligonucleótido como informa Judy, *et al.*, Tetrahedron Letters 1991, 32, 879. Un reactivo comercial similar para unión al extremo 5' de un oligonucleótido es 5'-Amino-Modifier C6. Estos reactivos están disponibles en Glen Research Corporation (Sterling, VA). Krieg, *et al.*, Antisense Research and Development 1991, 1, 161 utilizaron estos compuestos o similares para unir fluoresceína al extremo 5' de un oligonucleótido. Otros compuestos, tal como la acridina, se han unido al grupo fosfato 3' terminal de un oligonucleótido por medio de un enlace de polimetileno (Asseline, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81,3297). Cualquiera de los grupos anteriores se puede usar como un único conector o en combinación con uno o más conectores adicionales.

Los conectores y su uso en la preparación de conjugados de compuestos oligoméricos se proporcionan a lo largo de la técnica tal como en los documentos WO 96/11205 y WO 98/52614 y las patentes de EE. UU. n.º 4.948.882; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.580.731; 5.486.603; 5.608.046; 4.587.044; 4.667.025; 5.254.469; 5.245.022; 5.112.963; 5.391.723; 5.510.475; 5.512.667; 5.574.142; 5.684.142; 5.770.716; 6.096.875; 6.335.432; y 6.335.437.

Como se usa en el presente documento, un enlace fisiológicamente lábil es un enlace lábil que se puede escindir en condiciones que normalmente se encuentran o son análogas a las que se encuentran dentro de un cuerpo de mamífero (también denominado conector escindible). Los grupos de enlace fisiológicamente lábiles se seleccionan de modo que experimentan una transformación química (por ejemplo, escisión) cuando están presentes en determinadas condiciones fisiológicas. Las condiciones intracelulares de los mamíferos incluyen condiciones químicas tales como pH, temperatura, condiciones o agentes oxidativos o reductores, y concentración de sales encontradas o análogas a las encontradas en células de mamífero. Las condiciones intracelulares de los mamíferos también incluyen la presencia de actividad enzimática normalmente presente en una célula de mamífero tal como de enzimas proteolíticas o hidrolíticas. En algunos modos de realización, el conector escindible es susceptible a la(s) nucleasa(s) que se puede(n) expresar, por ejemplo, en la célula diana, y como tal, como se detalla en el presente documento, el conector puede ser una región corta (por ejemplo, 1-10) nucleósidos unidos a fosfodiéster, tales como los nucleósidos de ADN,

La transformación química (escisión del enlace lábil) se puede iniciar mediante la adición de un agente farmacéuticamente aceptable a la célula o se puede producir espontáneamente cuando una molécula que contiene el enlace lábil alcanza un ambiente intracelular y/o extracelular apropiado. Por ejemplo, un enlace lábil al pH se puede escindir cuando la molécula entra en un endosoma acidificado. Por tanto, un enlace lábil al pH se puede considerar un enlace escindible endosomal. Los enlaces escindibles de la enzima se pueden escindir cuando se exponen a enzimas como las presentes en un endosoma o lisosoma o en el citoplasma. Un enlace disulfuro se puede dividir cuando la molécula entra en el ambiente más reductor del citoplasma celular. Por tanto, un disulfuro se puede considerar un enlace escindible citoplásmico. Como se usa en el presente documento, un enlace lábil al pH es un

enlace lábil que se rompe selectivamente en condiciones ácidas (pH <7). Dichos enlaces también se pueden denominar enlaces lábiles en endosoma, ya que los endosomas y lisosomas celulares tienen un pH inferior a 7.

Oligómeros activados

En el presente documento también se describen oligómeros activados, es decir, un intermedio usado en la síntesis del oligómero de la invención, por ejemplo, el oligómero conjugado. A este respecto, el oligómero de la invención puede, en algunos modos de realización, comprender la región A y la región B como se describe en el presente documento, y la región B se une covalentemente a un grupo de activación (o reactivo), adecuado para su uso en la conjugación del oligómero.

El término "oligómero activado", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligómero que está unido covalentemente (es decir, funcionalizado) a al menos un resto funcional que permite el enlace covalente del oligómero a uno o más restos conjugados, es decir, restos que no son ellos mismos ácidos nucleicos o monómeros, para formar los conjugados descritos en el presente documento. Típicamente, un resto funcional comprenderá un grupo químico que se puede unir covalentemente al oligómero por medio de, por ejemplo, un grupo 3'-hidroxilo o el grupo NH₂ exocíclico de la base de adenina, un espaciador que es preferentemente hidrófilo y un grupo terminal que se puede unir a un resto de conjugado (por ejemplo, un grupo amino, sulfhidrilo o hidroxilo). En algunos modos de realización, este grupo terminal no está protegido, por ejemplo, es un grupo NH₂. En otros modos de realización, el grupo terminal está protegido, por ejemplo, por cualquier grupo protector adecuado, tal como los descritos en "Protective Groups in Organic Synthesis" de Theodora W Greene y Peter G M Wuts, 3.^a edición (John Wiley & Sons, 1999). Los ejemplos de grupos protectores hidroxilo adecuados incluyen ésteres tales como éster de acetato, grupos aralquilo tales como bencilo, difenilmetilo o trifenilmetilo, y tetrahidropirano. Los ejemplos de grupos protectores amino adecuados incluyen grupos bencilo, alfa-metilbencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, benciloxicarbonilo, *tert*-butoxicarbonilo y acilo, tales como tricloroacetilo o trifluoroacetilo. En algunos modos de realización, el resto funcional es autoescindible. En otros modos de realización, el resto funcional es biodegradable. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.087.229.

Los oligómeros descritos en el presente documento se pueden funcionalizar en el extremo 5' para permitir la unión covalente del resto de conjugado al extremo 5' del oligómero. En otros modos de realización, los oligómeros de la invención se pueden funcionalizar en el extremo 3'. Todavía en otros modos de realización, los oligómeros de la invención se pueden funcionalizar a lo largo de la cadena principal o en el resto de base heterocíclica. Aún en otros modos de realización, los oligómeros de la invención se pueden funcionalizar en más de una posición seleccionada independientemente del extremo 5', el extremo 3', la cadena principal y la base.

Los oligómeros activados como se describen en el presente documento se pueden sintetizar incorporando durante la síntesis uno o más monómeros que se unen covalentemente a un resto funcional. En otros modos de realización, los oligómeros activados de la invención se sintetizan con monómeros que no se han funcionalizado, y el oligómero se funcionaliza al completar la síntesis. En algunos modos de realización, los oligómeros se funcionalizan con un éster impedido que contiene un conector de aminoalquilo, en el que la parte de alquilo tiene la fórmula (CH₂)_w, en la que w es un número entero que varía de 1 a 10, preferentemente aproximadamente 6, en el que la parte de alquilo del grupo alquilamino puede ser de cadena lineal o ramificada, y en el que el grupo funcional se une al oligómero por medio de un grupo éster (-O-C(O)-(CH₂)_wNH).

Los oligómeros se pueden funcionalizar con un éster con impedimento estérico que contiene un conector (CH₂)_w-sulfhidrilo (SH), en el que w es un número entero que varía de 1 a 10, preferentemente aproximadamente 6, en el que la parte de alquilo del grupo alquilamino puede ser de cadena lineal o cadena ramificada, y en el que el grupo funcional se une al oligómero por medio de un grupo éster (-O-C(O)-(CH₂)_wSH).

Los oligonucleótidos activados con sulfhidrilo se pueden conjugar con restos poliméricos tales como polietilenglicol o péptidos (por medio de la formación de un enlace disulfuro).

Los oligómeros activados que contienen ésteres impedidos como se describe anteriormente se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica y, en particular, mediante los procedimientos divulgados en la publicación PCT n.º WO 2008/034122 y los ejemplos en la misma.

Los oligómeros como se describen en el presente documento se pueden funcionalizar mediante la introducción de grupos sulfhidrilo, amino o hidroxilo en el oligómero por medio de un reactivo de funcionalización sustancialmente como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 4.962.029 y 4.914.210, es decir, un reactivo sustancialmente lineal que tiene una fosforamida en un extremo unida a través de una cadena espaciadora hidrófila al extremo opuesto que comprende un grupo sulfhidrilo, amino o hidroxilo protegido o no protegido. Dichos reactivos reaccionan principalmente con grupos hidroxilo del oligómero. En algunos modos de realización, dichos oligómeros activados tienen un reactivo de funcionalización acoplado a un grupo 5'-hidroxilo del oligómero. En otros modos de realización, los oligómeros activados tienen un reactivo de funcionalización acoplado a un grupo 3'-hidroxilo. Los oligómeros activados como se describen en el presente documento pueden tener un reactivo de funcionalización acoplado a un grupo hidroxilo en la cadena principal del oligómero. Aún en otros modos de realización, el oligómero de la invención se funcionaliza con

más de uno de los reactivos de funcionalización como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 4.962.029 y 4.914.210. Los procedimientos para sintetizar dichos reactivos de funcionalización e incorporarlos en monómeros u oligómeros se describen en las patentes de EE. UU. n.º 4.962.029 y 4.914.210.

5 El extremo 5' de un oligómero unido en fase sólida se puede funcionalizar con un derivado de dienil fosforamidita, seguido de la conjugación del oligómero desprotegido con, por ejemplo, un aminoácido o péptido por medio de una reacción de cicloadición de Diels-Alder.

10 La incorporación de monómeros que contienen modificaciones glucídicas en 2', tales como un glúcido sustituido con 2'-carbamato o un glúcido 2'-(O-pentil-*N*-ftalimido)-desoxirribosa en el oligómero facilita la unión covalente de los restos conjugados a los glúcidos del oligómero. En otros modos de realización, se prepara un oligómero con un conector que contiene amino en la posición 2' de uno o más monómeros usando un reactivo tal como, por ejemplo, 5'-dimetoxitritil-2'-O-(*e*-ftalimidilaminopentilo)-2'-desoxiadenosina-3'-*N,N*-diisopropil-cianoetoxi-fosforamidita. Véase, por ejemplo, Manoharan, *et al.*, Tetrahedron Letters, 1991, 34, 7171.

15 Los oligómeros como se describen en el presente documento pueden tener restos funcionales que contienen aminas en la nucleobase, incluyendo en los grupos N6 aminopurínicos, en la N2 exocíclico de guanina, o en las posiciones N4 o 5 de citosina. En diversos modos de realización, dicha funcionalización se puede lograr usando un reactivo comercial que ya está funcionalizado en la síntesis de oligómeros.

20 Algunos restos funcionales están disponibles comercialmente, por ejemplo, los restos de enlace heterobifuncionales y homobifuncionales están disponibles en Pierce Co. (Rockford, Ill). Otros grupos de enlace disponibles comercialmente son los reactivos 5'-Amino-Modifier C6 y 3'-Amino-Modifier, ambos disponibles de Glen Research Corporation (Sterling, VA). 5'-Amino-Modifier C6 también está disponible de ABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, California) como Aminolink-2, y 3'-Amino-Modifier también está disponible de Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, Calif.).

Procedimientos de síntesis y fabricación

30 La invención también proporciona procedimientos de síntesis o fabricación del oligómero de la invención. El oligómero se puede preparar usando la síntesis de oligonucleótidos estándar, que se realiza típicamente en un soporte sólido, tal como un soporte universal. Como se ilustra en las figuras 5-10, el oligómero de la invención se puede sintetizar, por ejemplo, mediante la síntesis secuencial de la primera región y la segunda región, seguida de la adición (por ejemplo, conjugación) de la tercera región (X) opcionalmente por medio de un conector (Y). La región Y, cuando está presente, se puede unir a la región B, y la región X posteriormente se añade a la región Y, o la región Y y X se pueden añadir a la región B en una sola etapa de reacción.

40 De forma alternativa, la síntesis de oligómeros se puede producir por medio del acoplamiento inicial de la región X, o región X e Y a la columna de soporte de oligonucleótidos, seguida de la síntesis de oligonucleótidos secuencial de la región B y, a continuación, de la región A.

45 De forma alternativa, el uso de un grupo bidireccional escindible unido al soporte de síntesis de oligonucleótidos (en una etapa inicial o previa) permite un procedimiento donde las regiones de oligonucleótidos B y A se sintetizan en un grupo reactivo del grupo bifuncional y la región X o las regiones X e Y se sintetizan en un segundo grupo reactivo del grupo bifuncional, en el que la síntesis de oligonucleótidos o la adición de X (o X e Y) al soporte se puede producir en cualquier orden o incluso conjuntamente. La escisión del grupo bifuncional del soporte produce, a continuación, el oligómero de la invención. El grupo bifuncional puede ser, por ejemplo, un nucleósido, donde una entidad (por ejemplo, la región B o X o X-Y-) se une a un grupo que contiene fosfato en el nucleósido (por ejemplo, un grupo 5' o 3'), y el otro (por ejemplo, la región B o X o X-Y-) se une, por ejemplo, a un grupo reactivo presente en la nucleobase.

50 De forma alternativa, la región X o X-Y se puede unir al oligómero (región B) después de la síntesis de oligonucleótidos, tal como después de la etapa de escisión. Por lo tanto, la invención también se refiere al oligómero intermedio, que comprende las regiones A y B, y un grupo reactivo o de activación unido a la región B, que se usa posteriormente para unir la región X o las regiones X e Y a la región B.

55 La región Y o la región X se puede unir a la región B como una fosforamidita, por ejemplo, permitiendo la formación del oligómero en una única síntesis de oligonucleótidos, seguido de la escisión del oligómero del soporte de síntesis de oligonucleótidos (US). A este respecto, en algunos modos de realización, el grupo de enlace entre la región B y la región X o Y puede ser un grupo que contiene fosfato, tal como un enlace nucleosídico, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato, metilfosfonato u otros, tales como a los que se hace referencia en el presente documento. De forma alternativa, se pueden usar otros enlaces químicos tales como un grupo triazol.

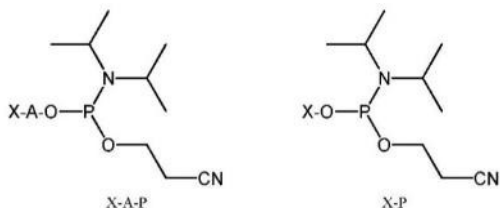
60 En algunos modos de realización, la tercera región (X) o X-Y- se puede unir a la región B por medio de un grupo distinto de un fosfato 5' o 3', por ejemplo, por medio de un grupo reactivo en otra posición, por ejemplo, un grupo reactivo, tal como una amina en la base de un nucleósido en la región B.

65

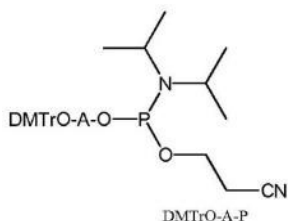
La síntesis de oligonucleótidos se puede producir en la dirección 5'-3' o, como es típico de la síntesis de la mayoría de oligonucleótidos, en la dirección 3' 5'.

5 En algunos ejemplos no limitantes, la construcción de oligonucleótido-conjugado se puede ensamblar de diferentes maneras, por ejemplo.

10 A) La parte B-A de la construcción se puede hacer en una máquina de síntesis de oligonucleótidos que pueda sintetizar los enlaces fosforioato y fosfordiéster. B-A se puede elongar a continuación opcionalmente mediante la química estándar de la fosforamidita usando una unidad estructural X-A-P (resto de conjugado con conector unido) para crear X-A-B-A o con la unidad estructural X-P (resto de conjugado sin conector) para crear X-B-A.



15 B) La parte B-A de la construcción se puede hacer en una máquina de síntesis de oligonucleótidos que pueda sintetizar enlaces tanto fosforioato como fosfordiéster. A continuación, opcionalmente, B-A se puede elongar secuencialmente mediante la química estándar de la fosforamidita usando una unidad estructural DMTrO-A-P seguido de la unidad estructural X-P para crear X-A-B-A con un enlace PO o PS entre la parte X y A.



20 La parte B-A de la construcción se puede hacer en una máquina de síntesis de oligonucleótidos que pueda sintetizar enlaces tanto fosforioato como fosfordiéster. A continuación, opcionalmente, B-A se puede elongar secuencialmente mediante la química estándar de la fosforamidita usando una unidad estructural PGN-A-P para crear H₂N-A-B-A. Después de la escisión y desprotección del oligonucleótido, la amina libre del oligonucleótido se puede conjugar con el resto X en el que se ha activado un grupo funcional de X para reaccionar con la amina primaria terminal del oligonucleótido.

Composiciones

30 El oligómero de la invención se puede usar en formulaciones y composiciones farmacéuticas. Adecuadamente, dichas composiciones comprenden un diluyente, vehículo, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable. El documento WO2007/031091 proporciona un diluyente, vehículo y adyuvantes farmacéuticamente aceptables adecuados y preferentes. Las dosis, formulaciones, rutas de administración, composiciones, formas farmacéuticas, combinaciones con otros agentes terapéuticos, formulaciones de profármacos adecuadas también se proporcionan en el documento

35 WO2007/031091.

40 Los oligonucleótidos de antisentido se pueden mezclar con sustancias activas o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los procedimientos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de varios criterios, incluyendo, pero no limitados, la ruta de administración, el alcance de la enfermedad o la dosis que se va a administrar.

45 Un compuesto de antisentido se puede utilizar en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto de antisentido con un diluyente o vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). El PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones que se van a administrar por vía parenteral.

50 Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de antisentido engloban cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, pueda proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio y

potasio. Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto de antisentido que se escinden por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto de antisentido activo. A este respecto, el profármaco puede comprender la región B y un conjugado, resto de direccionamiento o de bloqueo de acuerdo con la presente invención. En algunos modos de realización, el oligómero de la invención es un profármaco.

El uso de conjugados lipófilos de acuerdo con la invención permite la incorporación del oligómero de la invención en lipidoideos o liposomas, por ejemplo, liposomas catiónicos (por ejemplo, SNALP (partícula lipídica de ácido nucleico estable) de liposomas catiónicos), que son útiles en particular para la administración de oligómeros, por ejemplo, al hígado, por ejemplo, ARNip.

Aplicaciones

Los oligómeros de la invención se pueden utilizar como reactivos de investigación para, por ejemplo, diagnósticos, tratamientos y profilaxis.

En investigación, en algunos modos de realización dichos oligómero se pueden usar para inhibir específicamente la síntesis de proteínas (típicamente mediante degradación o inhibición del ARNm y, de este modo, evitando la formación de proteínas) en células y animales de laboratorio, facilitando de este modo el análisis funcional de la diana o una valoración de su utilidad como diana para intervención terapéutica.

Para los tratamientos, un animal o un ser humano que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que se puede tratar modulando la expresión de la diana se somete a tratamiento administrando compuestos oligoméricos de acuerdo con la presente invención. Además, se proporcionan procedimientos para tratar a un mamífero, tal como para tratar a un ser humano que se sospecha que tiene o es propenso a tener una enfermedad o afección asociada a la expresión de la diana, administrando una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los oligómeros o composiciones de la invención El oligómero, un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra típicamente en una cantidad eficaz.

La invención también proporciona el uso del compuesto o conjugado de la invención como se describe para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno al que se hace referencia en el presente documento, o para un procedimiento del tratamiento de un trastorno al que se hace referencia en el presente documento.

La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar un trastorno al que se hace referencia en el presente documento, comprendiendo dicho procedimiento administrar un compuesto de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento, y/o un conjugado de acuerdo con la invención, y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite.

Indicaciones médicas

En algunos modos de realización, la enfermedad es cáncer. En algunos modos de realización, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria. En algunos modos de realización, la enfermedad es una cardiovascularopatía, tal como

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es un infarto de miocardio (IM).

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es, o da como resultado, o está asociada con fibrosis, tal como fibrosis hepática, fibrosis cardíaca o fibrosis local.

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es un trastorno de la coagulación de la sangre.

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es o comprende (da como resultado o está asociado con) la disminución de la masa ósea.

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno hepático.

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es un trastorno metabólico, que puede ser, por ejemplo, una enfermedad o trastorno hepático, y/o en algunos aspectos, una enfermedad o trastorno cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares/metabólicas incluyen, por ejemplo, síndrome metabólico, obesidad, hiperlipidemia, desequilibrio del colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar combinada (HFC), hiperlipidemia adquirida, resistente a las estatinas, hipercolesterolemia, arteriopatía coronaria (AC) y cardiopatía coronaria (CC), aterosclerosis, cardiopatía, diabetes (I y/o II), ENA, síndrome coronario agudo (SCA), ENA, insuficiencia cardíaca crónica, cardiovascularopatía, enfermedad cardiometabólica, hiperlipidemia y trastornos relacionados, síndrome metabólico, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca crónica, vasculopatía, arteriopatía periférica, cardiopatía, isquemia, diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1,

5 En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en síndrome metabólico, obesidad, hiperlipidemia, aterosclerosis, desequilibrio del colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar combinada (HFC), hiperlipidemia adquirida, resistente a las estatinas, hipercolesterolemia, arteriopatía coronaria (AC) y cardiopatía coronaria (CC).

10 En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca crónica, cardiovascularopatía, enfermedad cardiometabólica, insuficiencia cardíaca crónica, vasculopatía, arteriopatía periférica, cardiopatía, isquemia, síndrome coronario agudo (SCA).

15 En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1,

15 En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es una enfermedad vírica, tal como policitemia, hepatitis C, hepatitis B, VBK, VIH.

15 En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es una enfermedad (o trastorno genético) grave e infrecuente.

20 La invención proporciona además el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, tal como aquellos a los que se hace referencia en el presente documento.

25 En términos generales, algunos aspectos de la divulgación se refieren a un procedimiento para tratar a un mamífero que padece o es susceptible a afecciones asociadas con niveles anómalos de la diana, que comprende administrar al mamífero y una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero dirigido a la diana que comprende una o más unidades de LNA. El oligómero, un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra típicamente en una cantidad eficaz.

30 Un aspecto interesante de la invención se refiere al uso del compuesto como se define en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección al que se hace referencia en el presente documento.

35 Además, la divulgación se refiere a un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una enfermedad o afección tal como a los que se hace referencia en el presente documento.

35 Un paciente que necesita tratamiento es un paciente que padece o es probable que padezca la enfermedad o trastorno.

40 En algunos modos de realización, el término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere tanto al tratamiento de una enfermedad existente (por ejemplo, una enfermedad o trastorno al que se hace referencia en el presente documento, como a la prevención de una enfermedad, es decir, la profilaxis. Por lo tanto, se reconocerá que el tratamiento como se hace referencia en el presente documento puede, en algunos modos de realización, ser profiláctico.

45 **Ejemplos**

Lista de oligonucleótidos

50 En la siguiente lista, las letras mayúsculas representan los nucleósidos de LNA, tal como LNA beta-D-oxi, las letras minúsculas representan los nucleósidos de ADN. La L mayúscula es un LNA, como beta-D-oxi, y la d minúscula es un nucleósido de ADN. Las citosinas de LNA son opcionalmente 5' metilcitosina. Los internucleósidos dentro de la región A son fosforotioato, y, dentro de la región B, son fosfodiéster (como se muestra). El enlace internucleosídico entre la región A y B es fosfodiéster, pero cuando la región B es de >1 nucleótido de ADN, puede ser opcionalmente distinto de fosfodiéster (por ejemplo, puede ser fosforotioato). Existe, opcionalmente, otro conector (Y), entre la región B y la región C, tal como un conector C6. N.º se refiere a SEQ ID NO

Compuestos dirigidos a ApoB

N.º	Seq (5'-3') (región A)	Conector escindible (región B)	Región C - conjugado
1	GCattggtatTCA	no	no
2	GCattggtatTCA	no	Colesterol
3	GCattggtatTCA	SS	Colesterol
4	GCattggtatTCA	3PO-ADN (5'tca3')	Colesterol
5	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol

6	GCattggtatTCA	1PO-ADN (5'a3')	Colesterol
---	---------------	-----------------	------------

PCSK9 - Compuestos específicos de ratón

N.º	Sec. (5'-3') (A)	Conector escindible (B)	Conjugado (C)
7	GTctgtggaaGCG	no	no
8	GTctgtggaaGCG	no	Colesterol
9	GTctgtggaaGCG	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
10	GTctgtggaaGCG	2PO-ADN (5'ct3')	Colesterol

5 **FVII (FVII de ratón)**

N.º	Sec. (5'-3')	Conector escindible (B)	Conjugado (C)
11	LLdddddddddLLL	no	no
12	LLdddddddddLLL		Complejo con GalNAc
13	LLdddddddddLLL	2PO (ca)	Complejo con GalNAc
14	LLdddddddddLLL	SS	Colesterol
15	LLdddddddddLLL	2PO (ca)	Colesterol

Compuestos dirigidos a ApoB con conjugados con marcador FAM

N.º	Sec. (5'-3')	Conector escindible (B)	Conjugado (C)
16	GCattggtatTCA	3PO-ADN (5'tca3')	FAM
17	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	FAM
18	GCattggtatTCA	1PO-ADN (5'a3')	FAM
19	GCattggtatTCA	3PO-ADN (5'gac3')	FAM
20	GCattggtatTCA	no	FAM

10

Compuestos de la diana X (una diana terapéutica humana)

N.º	Sec. (5'-3')	Conector escindible (B)	Región C (en el extremo 3')
21	LLLdddddddddLLL	3PO-ADN (5'tgc3')	5'-dddddddLLL-3'
22	LLLdddddddddLLL		5'-dddddddLLL-3'
23	LLLdddddddddLLL	3PO-ADN (5'tgc3')	5'-dddddddLLL-3'
24	LLLdddddddddLLL		5'-dddddddLLL-3'

15 En los compuestos anteriores, la región C comprende el complemento de la Seq (región A) de modo que el nucleótido 3' de la región C se alinea (forma un par de bases) con el 8.º nucleótido de la región A del extremo 5'. Por lo tanto, la región C retrocede en bucle y forma una hibridación de 8 bases con la región A a lo largo del ala 3' del gámpero y 5 bases de la región de interrupción del ADN, creando de este modo un "profármaco" que está inactivo hasta que se escinde la región del conector (B).

20 **Compuestos dirigidos a ApoB**

N.º	Sec. (5'-3')	Conector escindible (B)	Conjugado
25	GCattggtatTCA	no	Ácido fólico
26	GCattggtatTCA	SS	Ácido fólico
27	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	Ácido fólico
28	GCattggtatTCA	no	monoGalNAc
29	GCattggtatTCA	SS	monoGalNAc
30	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	monoGalNAc
31	GCattggtatTCA	no	FAM
32	GCattggtatTCA	SS	FAM
33	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	FAM
34	GCattggtatTCA	no	Tocoferol
35	GCattggtatTCA	SS	Tocoferol

36	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	Tocoferol
----	---------------	------------------	-----------

Compuestos PC3SK9

N.º	Sec. (5'-3')	conector	Conjugado
37	TGctacaaaacCCA	no	
38	AATgctacaaaacCCA	no	
39	AATgctacaaaacCCA	no	
40	GCgtgtgagcttGG	no	
41	TGctgtgtgagctTGG	no	
42	TGctgtgtgagctTGG	no	
43	TCCtggctgtgtTCC	no	
44	TCCtggctgtgttCC	no	
45	TGctacaaaacCCA	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
46	AATgctacaaaacCCA	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
47	AATgctacaaaacCCA	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
48	GCgtgtgagcttGG	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
49	TGctgtgtgagctTGG	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
50	TGctgtgtgagctTGG	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
51	TCCtggctgtgtTCC	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
52	TCCtggctgtgttCC	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol

5 Compuestos ApoB de estudio en monos

53	GTtgacactgTC	No	no
5	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
54	GTtgacactgTC	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
46	AATgctacaaaacCCA	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
49	TGctgtgtgagctTGG	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol

La SEQ ID NO 53 se proporciona como compuesto original de SEQ ID NO 54.

- 10 Experimentos en ratones: A menos que se especifique de otro modo, los experimentos en ratones se pueden realizar de la siguiente manera:

Administración de dosis y toma de muestras:

- 15 Se usaron ratones C57Bl6-N de 7-10 semanas de edad, los animales se emparejaron por edad y sexo (hembras para los estudios 1, 2 y 4; machos en el estudio 3). Se inyectaron los compuestos por vía i.v. en la vena de la cola. Para el muestreo de suero intermedio, se recogieron 2-3 gotas de sangre mediante punción de la vena facial, y se recogió la sangre final de la vena cava inferior. Se recogió suero en tubos de separación de suero que contenían gel (Greiner) y se mantuvo congelado hasta el análisis.

- 20 A los ratones C57Bl6 se les administró i.v. una dosis única de 1 mg/kg de ASO (o la cantidad mostrada) formulado en solución salina o solución salina sola de acuerdo con la información mostrada. Los animales se sacrificaron, por ejemplo, el día 4 o 7 (o el tiempo mostrado) después de la dosificación y se tomaron muestras del hígado y el riñón. Aislamiento del ARN y análisis del ARNm: el análisis de ARNm de tejido se realizó usando el kit de cuantificación de ARNm de Qantigene ("ensayo de ADNr", Panomics/Affimetrix), siguiendo el protocolo del fabricante. Para los lisados tisulares, se lisaron 50-80 mg de tejido por sonicación en 1 ml de tampón de lisis que contenía proteinasa K. Los lisados se usaron directamente para el ensayo de ADNr sin extracción del ARN. Los conjuntos de sondas para la diana y GAPDH se obtuvieron diseñados a medida de Panomics. Para el análisis, las unidades de luminiscencia obtenidas para los genes diana se normalizaron para la GAPDH constitutiva.

- 30 El análisis del suero para ALT, AST y colesterol se realizó en la plataforma de bioquímica clínica "Cobas INTEGRA 400 plus" (Roche Diagnostics), utilizando 10 µl de suero.

Para la cuantificación de los niveles séricos de factor VII, se usó el kit de actividad enzimática BIOFEN FVII (n.º 221304, Hyphen BioMed) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 Para la cuantificación de oligonucleótidos, una sonda de PNA marcada con fluorescencia se hibrida al oligo de interés en el lisado tisular. Se usan los mismos lisados que para los ensayos de ADNr, solo con cantidades de tejido exactamente ponderadas. La doble hebra heterogénea se cuantifica usando AEX-HPLC y detección fluorescente.

Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5

10 Se sintetizaron los oligonucleótidos en soportes universales de uridina usando el enfoque de fosforamidita en un sintetizador Expedite 8900/MOSS (Multiple Oligonucleotide Synthesis System) o equivalente a una escala de 4 µmol. Al final de la síntesis, los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido usando amoníaco acuoso durante 1-2 horas a temperatura ambiente, y además se desprotegeron durante 16 horas a 65 °C. Los oligonucleótidos se purificaron por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) y se caracterizaron por UPLC, y la masa molecular se confirmó además por ESI-MS. Véase a continuación para más detalles.

Elongación del oligonucleótido.

20 El acoplamiento de β-cianoetil-fosforamiditas (ADN-A(Bz), ADN-G(ibu), ADN-C(Bz), ADN-T, LNA-5-metil-C(Bz), LNA-A (Bz), LNA-G(dmf), LNA-T o conector C6-SS) se realiza usando de una solución de 0,1 M de la amidita protegida con 5'-O-DMT en acetonitrilo y DCI (4,5-dicianoimidazol) en acetonitrilo (0,25 M) como activador. Para el ciclo final se usó una fosforamidita de colesterol unida a C6 disponible comercialmente a 0,1 M en DCM. Se lleva a cabo tiolación para la introducción de enlaces de fosforioato usando hidruro de xantano (0,01 M en acetonitrilo/piridina 9:1). Se introducen enlaces de fosfordiéster usando yodo 0,02 M en THF/piridina/agua 7:2:1. El resto de los reactivos son los usados típicamente para la síntesis de oligonucleótidos.

Purificación por RP-HPLC:

30 Los compuestos en bruto se purificaron mediante RP-HPLC preparativa en una columna Phenomenex Jupiter C1 8 10 µ 150 × 10 mm. Se usó acetato de amonio 0,1 M, pH 8 y acetonitrilo como tampones a un caudal de 5 ml/min. Las fracciones recogidas se liofilizaron para dar el compuesto purificado típicamente como un sólido blanco.

Abreviaturas:

- DCI: 4,5-dicianoimidazol
- DCM: Diclorometano
- DMF: Dimetilformamida
- DMT: 4,4'-Dimetoxitritilo
- THF: Tetrahidrofurano
- Bz: Benzóilo
- Ibu: Isobutirilo
- RP-HPLC: Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa

Ejemplo 2: Diseño de oligonucleótidos de antisentido de LNA

Oligómeros usados en los ejemplos y figuras. El n.º de sec. es un identificador usado en todos los ejemplos y figuras

40 **Tabla 2 -**

SEQ ID NO	Secuencia del compuesto	Comentario
N.º 1	5'- G _s ^o m ^o C _s ^o a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Compuesto original sin colesterol conjugado
N.º 2	5'- CHOL ^{CHOL} G _s ^o m ^o C _s ^o a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Chol-3833
N.º 3	5'- Chol_C6 C6SSC6 G _s ^o m ^o C _s ^o a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Chol-SS-3833
N.º 4	5'- Chol_C6 t c a G _s ^o m ^o C _s ^o a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Chol-3PO-3833
N.º 5	5'- Chol_C6 c a G _s ^o m ^o C _s ^o a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Chol-2PO-3833
N.º 6	5'- Chol_C6 a G _s ^o m ^o C _s ^o a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Chol-IPO-3833
N.º 7	5'- G _s ^o T _s ^o c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s a _s G _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Compuesto original sin conjugado
N.º 8	5'- Chol_C6 G _s ^o T _s ^o c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s a _s G _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Chol-4061
N.º 9	5'- Chol_C6 c a G _s ^o T _s ^o c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s a _s G _s ^o m ^o C _s ^o A ^o -3'	Chol-2PO(ca)-4061

N.º 10	5'- Chol_C6 c t G ₂ ' T ₂ ' c ₂ t ₂ g ₂ t ₂ g ₂ a ₂ a ₂ G ₂ ' mC ₂ ' G ₂ ' _3'	Chol-2PO(ct)-4061
--------	--	-------------------

Ejemplo 3. Atenuación del ARNm de ApoB con conjugados con colesterol *in vivo*.

5 Se inyectó a ratones C57BL6/J una dosis única de 1 mg/kg de oligonucleótido de antisentido de LNA no conjugado (n.º 1) o cantidades equimolares de oligonucleótidos de antisentido de LNA conjugados con colesterol con diferentes conectores y se sacrificaron en los días 1-10 de acuerdo con la Tab. 3.

10 El ARN se aisló del hígado y el riñón y se sometió a qPCR con cebadores específicos de ApoB y una sonda para analizar la atenuación del ARNm de ApoB.

15 **Conclusiones:** El colesterol conjugado con un oligonucleótido de antisentido de LNA de ApoB con un conector compuesto de 2 o 3 ADN con cadena principal de fosfodiéster (sec. n.º 4 y 5) mostró una preferencia por la atenuación específica para el hígado de ApoB (Fig. 11). Esto significa que aumenta la eficiencia y la duración de la atenuación del ARNm de ApoB en el tejido hepático en comparación con el compuesto no conjugado (sec. n.º 1), así como en comparación con los conjugados con colesterol con conector estable (sec. n.º 2) y con conector disulfuro (sec. n.º 3) y concomitantemente menos actividad de atenuación de sec. n.º 4 y n.º 5 en el tejido renal.

Materiales y procedimientos:

20 Diseño experimental:

Tabla 3:

	Gr. n.º	N.º de identificación del animal	N.º de animales	Raza/sexo/alimentación del animal	Nivel de dosis del compuesto al día	Conc., a vol. dosis 10 ml/kg	Peso corporal	Sacrificio
A	1	1-4	4	C57BL/6J-♀- Chow	NaCl al 0,9 %	-	Día -1, 7 y 10	Día 10
	2	5-8	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	Día -1, 7 y 10	Día 10
	3	9-12	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2 mg/kg	0,12 mg/ml	Día -1, 7 y 10	Día 10
	4	12-16	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2 mg/kg	0,12 mg/ml	Día -1, 7 y 10	Día 10
	5	17-20	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3 mg/kg	0,13 mg/ml	Día -1, 7 y 10	Día 10
	6	21-24	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3 mg/kg	0,13 mg/ml	Día -1, 7 y 10	Día 10
B	7	25-28	4	C57BL/6J-♀- Chow	NaCl al 0,9 %	-	Día -1, 7	Día 7
	8	29-32	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	Día -1, 7	Día 7
	9	33-36	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2 mg/kg	0,12 mg/ml	Día -1, 7	Día 7
	10	37-40	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2 mg/kg	0,12 mg/ml	Día -1, 7	Día 7
	11	41-44	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3 mg/kg	0,13 mg/ml	Día -1, 7	Día 7
	12	45-48	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3 mg/kg	0,13 mg/ml	Día -1, 7	Día 7
C	13	49-52	4	C57BL/6J-♀- Chow	NaCl al 0,9 %	-	Día 0, 3	Día 3
	14	53-56	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	Día 0, 3	Día 3
	15	57-60	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2 mg/kg	0,12 mg/ml	Día 0, 3	Día 3
	16	61-64	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2 mg/kg	0,12 mg/ml	Día 0, 3	Día 3
	17	65-68	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3 mg/kg	0,13 mg/ml	Día 0, 3	Día 3
	18	69-72	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3 mg/kg	0,13 mg/ml	Día 0, 3	Día 3
D	19	73-76	4	C57BL/6J-♀- Chow	NaCl al 0,9 %	-	Día -1, 1	Día 1
	20	77-80	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	Día -1, 1	Día 1

	Gr. n.º	N.º de identificación del animal	N.º de animales	Raza/sexo/alimentación del animal	Nivel de dosis del compuesto al día	Conc., a vol. dosis 10 ml/kg	Peso corporal	Sacrificio
	21	81-84	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2 mg/kg	0,12 mg/ml	Día -1, 1	Día 1
	22	85-88	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2 mg/kg	0,12 mg/ml	Día -1, 1	Día 1
	23	89-92	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3 mg/kg	0,13 mg/ml	Día -1, 1	Día 1
	24	93-96	4	C57BL/6J-♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3 mg/kg	0,13 mg/ml	Día -1, 1	Día 1

Administración de dosis. A animales hembra C57BL/6JBom, de aproximadamente 20 g a su llegada, se les administró 10 ml por kg de peso corporal (de acuerdo con el peso corporal del día 0) por vía i.v. del compuesto formulado en solución salina o solución salina sola de acuerdo con la tabla 3.

5 *Obtención de muestras de tejido hepático y renal.* Se anestesió a los animales con un 70 % de CO₂-30 % de O₂ y se sacrificaron por luxación cervical de acuerdo con la Tabla 3. Una mitad del lóbulo hepático grande y un riñón se picaron y se sumergieron en RNAlater.

10 Aislamiento de ARN total y síntesis de la primera hebra. El ARN total se extrajo de un máximo de 30 mg de tejido homogeneizado mediante molienda con bolas en presencia de tampón de lisis RLT usando el kit Qiagen RNeasy (Qiagen n.º de cat. 74106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 La síntesis de la primera hebra se realizó usando reactivos de retrotranscriptasa de Ambion de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Para cada muestra se ajustó 0,5 g de ARN total a (10,8 l) con H₂O libre de RNasa y se mezcló con 2 µl de decámeros aleatorios (50 µm) y 4 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM para cada dNTP) y se calentó a 70 °C durante 3 min, después de lo cual las muestras se enfriaron rápidamente en hielo. Se añadieron 2 µl de tampón 10x a t.a., 1 µl de retrotranscriptasa del MMLV (100 U/µl) y 0,25 µl de inhibidor de RNasa (10 U/µl) a cada muestra, seguido de incubación a 42 °C durante 60 min, inactivación por calor de la enzima a 95 °C durante 10 min y, a continuación, la muestra se enfrió a 4 °C. Las muestras de ADNr se diluyeron 1:5 y se sometieron a RT-QPCR usando la mezcla maestra Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems n.º de cat. 4364103) y el ensayo de expresión génica de Taqman (mApoB, Mn01545150_m1 y mGAPDH n.º 4352339E) siguiendo el protocolo del fabricante y procesado en el instrumento de RT-qPCR de Applied Biosystems (7500/7900 o ViiA7) en modo rápido.

Ejemplo 4. Atenuación del ARNm de ApoB con los conjugados con colesterol *in vivo* y distribución de LNA en el hígado y el riñón.

30 Se inyectó a ratones C57BL6/J una dosis única de 1 mg/kg de oligonucleótido de antisentido de LNA no conjugado (n.º 1) o cantidades equimolares de oligonucleótidos de antisentido de LNA conjugados con colesterol con diferentes conectores y se sacrificaron en los días 1-16 de acuerdo con la Tab. 4. El ARN se aisló del hígado y el riñón y se sometió a qPCR con cebadores específicos de ApoB y una sonda para analizar la atenuación del ARNm de ApoB.

35 El contenido de oligonucleótidos de LNA se midió en el hígado y el riñón usando el procedimiento ELISA de tipo sándwich basado en LNA.

40 **Conclusiones:** El colesterol conjugado con un oligonucleótido de antisentido de LNA de ApoB con un conector compuesto de 1, 2 o 3 ADN con cadena principal de fosfodiéster (sec. n.º 5 y n.º 6) mostró una preferencia por la atenuación específica para el hígado de ApoB (Fig. 14). Esto significa una mayor eficacia y duración de la eliminación del ARNm de ApoB en el tejido hepático en comparación con el compuesto no conjugado (sec. n.º 1), y menos actividad de atenuación concomitante de sec. n.º 4, n.º 5 y n.º 6 en el tejido renal. Los oligonucleótidos de antisentido de LNA conjugados con colesterol tienen una captación mucho mayor en el hígado y una captación mucho menor en el riñón en comparación con el oligonucleótido de LNA no conjugado (Fig. 15).

45 **Materiales y procedimientos:**

Diseño experimental:

50

ES 2 724 853 T3

Tabla 4:

Parte 1	Grupo n.º	N.º de identificación del animal	N.º de animales	Raza/sexo/alimentación del animal	Nivel de dosis del compuesto al día	Conc. a vol. dosis 10 ml/kg	Ruta de adm.	Día de dosificación	% de cambio de peso corporal	Día del sacrificio
A	1	1-3	3	C57BL/6J/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0, 1	1
	2	4-6	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	i.v.	0	0, 1	1
	3	7-9	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 equimolar 1,35 mg/kg	0,135 mg/ml	i.v.	0	0, 1	1
	4	10-12	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 equimolar 1,28 mg/kg	0,128 mg/ml	i.v.	0	0, 1	1
	5	13-15	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 equimolar 1,21 mg/kg	0,121 mg/ml	i.v.	0	0, 1	1
B	6	16-18	3	C57BL/6J/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0, 3	3
	7	19-21	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	i.v.	0	0, 3	3
	8	22-24	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 equimolar 1,35 mg/kg	0,135 mg/ml	i.v.	0	0, 3	3
	9	25-27	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 equimolar 1,28 mg/kg	0,128 mg/ml	i.v.	0	0, 3	3
	10	28-30	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 equimolar 1,21 mg/kg	0,121 mg/ml	i.v.	0	0, 3	3
C	11	31-33	3	C57BL/6J/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0, 3	3
	12	34-36	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	i.v.	0	0, 7	7
	13	37-39	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 equimolar 1,35 mg/kg	0,135 mg/ml	i.v.	0	0, 7	7
	14	40-42	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 equimolar 1,28 mg/kg	0,128 mg/ml	i.v.	0	0, 7	7
	15	43-45	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 equimolar 1,21 mg/kg	0,121 mg/ml	i.v.	0	0, 7	7
D	16	46-48	3	C57BL/6J/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0,7,10	10
	17	9-51	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	i.v.	0	0,7,10	10
	18	51-54	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 equimolar 1,35 mg/kg	0,135 mg/ml	i.v.	0	0,7,10	10

Parte 1	Grupo n.º	N.º de identificación del animal	N.º de animales	Raza/sexo/alimentación del animal	Nivel de dosis del compuesto al día	Conc. a vol. dosis 10 ml/kg	Ruta de adm.	Día de dosificación	% de cambio de peso corporal	Día del sacrificio
	19	55-57	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 equimolar 1,28 mg/kg	0,128 mg/ml	i.v.	0	0,7,10	10
	20	58-60	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 equimolar 1,21 mg/kg	0,121 mg/ml	i.v.	0	0,7,10	10
E	21	61-63	3	C57BL/6J/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0,7,13	13
	22	64-66	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	i.v.	0	0,7,13	13
	23	67-69	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 equimolar 1,35 mg/kg	0,135 mg/ml	i.v.	0	0,7,13	13
	24	70-72	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 equimolar 1,28 mg/kg	0,128 mg/ml	i.v.	0	0,7,13	13
	25	73-75	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 equimolar 1,21 mg/kg	0,121 mg/ml	i.v.	0	0,7,13	13
F	26	76-78	3	C57BL/6J/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0,7,14,16	16
	27	79-81	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0,1 mg/ml	i.v.	0	0,7,14,16	16
	28	82-84	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 equimolar 1,35 mg/kg	0,135 mg/ml	i.v.	0	0,7,14,16	16
	29	85-87	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 equimolar 1,28 mg/kg	0,128 mg/ml	i.v.	0	0,7,14,16	16
	30	88-90	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 equimolar 1,21 mg/kg	0,121 mg/ml	i.v.	0	0,7,14,16	16

Administración de dosis. A animales hembra C57BL/6JBom, de aproximadamente 20 g a su llegada, se les administró 10 ml por kg de peso corporal (de acuerdo con el peso corporal del día 0) por vía i.v. del compuesto formulado en solución salina o solución salina sola de acuerdo con la Tabla 4.

5 *Obtención de muestras de tejido hepático y renal.* Se anestesió a los animales con un 70 % de CO₂-30 % de O₂ y se sacrificaron por luxación cervical de acuerdo con la Tabla 4. Una mitad del lóbulo hepático grande y un riñón se picaron y se sumergieron en RNAlater.

10 *Aislamiento de ARN total y síntesis de la primera hebra.* El ARN total se extrajo de un máximo de 30 mg de tejido homogeneizado mediante molienda con bolas en presencia de tampón de lisis RLT usando el kit Qiagen RNeasy (Qiagen n.º de cat. 74106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 La síntesis de la primera hebra se realizó usando reactivos de retrotranscriptasa de Ambion de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Para cada muestra se ajustó 0,5 g de ARN total a (10,8 l) con H₂O libre de RNasa y se mezcló con 2 µl de decámeros aleatorios (50 µm) y 4 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM para cada dNTP) y se calentó a 70 °C durante 3 min, después de lo cual las muestras se enfriaron rápidamente en hielo. Se añadieron 2 µl de tampón 10x a t.a., 1 µl de retrotranscriptasa del MMLV (100 U/µl) y 0,25 µl de inhibidor de RNasa (10 U/µl) a cada muestra, seguido de

incubación a 42 °C durante 60 min, inactivación por calor de la enzima a 95 °C durante 10 min y, a continuación, la muestra se enfrió a 4 °C. Las muestras de ADN_r se diluyeron 1:5 y se sometieron a RT-QPCR usando la mezcla maestra Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems n.º de cat. 4364103) y el ensayo de expresión génica de Taqman (mApoB, Mn01545150_m1 y mGAPDH n.º 4352339E) siguiendo el protocolo del fabricante y procesado en el instrumento de RT-qPCR de Applied Biosystems (7500/7900 o ViiA7) en modo rápido.

ELISA en sándwich para el contenido de oligo: Se recogieron muestras de hígado y riñón (100 mg) en tubos en diferentes momentos después de la administración. A las muestras se añadieron tampón (pH 8,0 NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, Tris 0,25 mM), proteasa k (1 %, Sigma P4850-5) y 2 microesferas de carburo de wolframio (3 mm) (Qiagen), y se homogeneizaron durante 8 min (Retsch MM300, 25 Hz [l/s]) e incubó el homogeneizado a 37 °C durante la noche. Las muestras se centrifugaron a 14 000 g durante 15 minutos antes de su uso.

Se prepararon patrones de 1-100 µg/g de oligonucleótidos de LNA en riñón e hígado y trataron como se indica anteriormente. Los patrones y las muestras se diluyeron a (100-5000 ng/l) en 150 µl de una solución 35 nM de una sonda de captura y detección biotinilada y modificada con digoxigenina (5 × tampón SSCT [(NaCl 750 mM y citrato de sodio 75 mM, que contenía Tween-20 al 0,05 % (v/v) pH 7,0)], y se mezclaron durante una hora. Las placas recubiertas con estreptavidina (placa de módulo F96 CLEAR, con inmovilizador estreptavidina de Nunc, n.º de cat. 436014) se lavaron tres veces (5 × tampón SSCT, 300 µl). Las muestras de 100 µl se transfirieron a las placas recubiertas de estreptavidina y se incubaron durante una hora con agitación suave. Los pocillos se aspiraron y se lavaron tres veces con 300 µl de 2 × de tampón SSCT (NaCl 300 mM + citrato de sodio 30 mM que contenía Tween-20 al 0,05 % (v/v), pH 7,0). Se añadieron a los pocillos cien microlitros de fragmentos Fab anti-Dig-AP (Roche Applied Science, n.º de cat. 11 093 274 910) diluidos 1:4000 en PBST (solución salina tamponada con fosfato, pH 7.2) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Los pocillos se aspiraron y se lavaron tres veces con 300 µl de 2 × tampón SSCT. Se añadieron cien microlitros de solución de sustrato (sistema de sustrato de fosfatasa KPL BluePhos Microwell 50-88-00) a cada pocillo. La intensidad del desarrollo del color se midió espectrofotométricamente a 615 nm cada 5 minutos después de la agitación. Las muestras problema se referenciaron frente las muestras del patrón.

Ejemplo 5: Atenuación del ARNm de PCSK9 con conjugados con colesterol *in vivo*

Se inyectó a ratones NMRI una dosis única de 10 mg/kg de oligonucleótido de antisentido de LNA no conjugado (SEQ ID 7) o cantidades equimolares de oligonucleótidos de antisentido de LNA conjugados con colesterol con diferentes conectores y se sacrificaron en los días 1-10 de acuerdo con la Tab. 5.

El ARN se aisló del hígado y el riñón y se sometió a qPCR con cebadores específicos de PCSK9 y una sonda para analizar la atenuación del ARNm de PCSK9.

Conclusiones: El colesterol conjugado a un oligonucleótido de antisentido de LNA de PCSK9 con un conector compuesto de 2 ADN con cadena principal de fosfodiéster (sec. n.º 9 y n.º 10) mostró una atenuación potenciada de PCSK9 (Fig. 16) en comparación con el compuesto no conjugado (sec. n.º 7), así como en comparación con conjugados con colesterol con conector estable (sec. n.º 8).

Materiales y procedimientos:

Diseño experimental:

Tabla 5:

Parte 1	Grupo n.º	N.º de identificación del animal	N.º de animales	Raza/sexo/alimentación del animal	Nivel de dosis del compuesto al día	Con. a vol. dosis 10 ml/kg	Ruta de adm.	Día de dosificación	% de cambio de peso corporal	Día del sacrificio
A	1	1-3	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0, 1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10 mg/kg	1 mg/ml	i.v.	0	0, 1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 equimolar 11,3 mg/kg	1,13 mg/ml	i.v.	0	0, 1	1
	5	13-15	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 equimolar 12,7 mg/kg	1,27 mg/ml	i.v.	0	0, 1	1
	6	16-18	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 equimolar 12,7 mg/kg	1,27 mg/ml	i.v.	0	0, 1	1

Parte 1	Grupo n.º	N.º de identificación del animal	N.º de animales	Raza/sexo/alimentación del animal	Nivel de dosis del compuesto al día	Con. a vol. dosis 10 ml/kg	Ruta de adm.	Día de dosificación	% de cambio de peso corporal	Día del sacrificio
B	7	19-21	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0,3	3
	8	22-24	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10 mg/kg	1 mg/ml	i.v.	0	0,3	3
	9	25-27	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 equimolar 11,3 mg/kg	1,13 mg/ml	i.v.	0	0,3	3
	11	31-33	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 equimolar 12,7 mg/kg	1,27 mg/ml	i.v.	0	0,3	3
	12	34-36	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 equimolar 12,7 mg/kg	1,27 mg/ml	i.v.	0	0,3	3
C	13	37-39	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0,7	7
	14	40-42	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10 mg/kg	1 mg/ml	i.v.	0	0,7	7
	15	43-45	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 equimolar 11,3 mg/kg	1,13 mg/ml	i.v.	0	0,7	7
	17	49-51	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 equimolar 12,7 mg/kg	1,27 mg/ml	i.v.	0	0,7	7
	18	52-54	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 equimolar 12,7 mg/kg	1,27 mg/ml	i.v.	0	0,7	7
D	19	55-57	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0,7, 10	10
	20	58-60	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10 mg/kg	1 mg/ml	i.v.	0	0,7, 10	10
	21	61-63	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 equimolar 11,3 mg/kg	1,13 mg/ml	i.v.	0	0,7, 10	10
	24	70-72	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 equimolar 12,7 mg/kg	1,27 mg/ml	i.v.	0	0,7, 10	10
A	25	73-75	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	i.v.	0	0,1	1

Administración de dosis. A animales hembra NMRI, de aproximadamente 20 g a su llegada, se les administró 10 ml por kg de peso corporal (de acuerdo con el peso corporal del día 0) por vía i.v. del compuesto formulado en solución salina o solución salina sola de acuerdo con la Tabla 5.

5 **Obtención de muestras de tejido hepático y renal.** Se anestesió a los animales con un 70 % de CO₂-30 % de O₂ y se sacrificaron por luxación cervical de acuerdo con la Tabla 4. Una mitad del lóbulo hepático grande y un riñón se picaron y se sumergieron en RNAlater.

10 El ARN total se extrajo de un máximo de 10 mg de tejido homogeneizado mediante molienda con bolas en presencia del tampón MagNA Pure LC RNA Isolation Tissue (Roche n.º cat. 03 604 721 001) usando el kit MagNa Pure 96 Cellular RNA Large Volume (Roche n.º de cat. 5467535001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis de la primera hebra se realizó usando reactivos de retrotranscriptasa de Ambion de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada muestra se ajustó 0,5 g de ARN total a (10,8 l) con H₂O libre de RNasa y se mezcló con 2 µl de decámeros aleatorios (50 µm) y 4 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM para cada dNTP) y se calentó a 70 °C durante 3 min, después de lo cual las muestras se enfriaron rápidamente en hielo. Se añadieron 2 µl de tampón 10x a t.a., 1 µl de retrotranscriptasa del MMLV (100 U/µl) y 0,25 µl de inhibidor de RNasa (10 U/µl) a cada muestra, seguido de incubación a 42 °C durante 60 min, inactivación por calor de la enzima a 95 °C durante 10 min y, a continuación, la muestra se enfrió a 4 °C. Las muestras de ADN se diluyeron 1:5 y se sometieron a RT-QPCR usando la mezcla maestra Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems n.º de cat. 4364103) y el ensayo de expresión génica de Taqman (mPCSK9, Mn00463738_m1 y mActin n.º 4352341E) siguiendo el protocolo del fabricante y procesado en el instrumento de RT-qPCR de Applied Biosystems (7500/7900 o ViiA7) en modo rápido.

15

20

Ejemplo 6. Escisión *in vitro* de diferentes conectores de ADN/PO

Se sometieron ASO marcadas con FAM con diferentes conectores de ADN/PC (conectores de PC) a escisión *in vitro* ya fuera en extracto de nucleasa S1 (Fig. 6A), homogeneizados de hígado o riñón o suero. ASC marcadas con FAM 100 pM con diferentes conectores de ADN/PC se sometieron a escisión *in vitro* por nucleasa S1 en tampón de nucleasa (60 U p. 100 pl) durante 20 y 120 minutos (A). La actividad enzimática se detuvo añadiendo EDTA a la solución tampón. A continuación, las soluciones se sometieron a análisis por AIE HPLC en un Dionex Ultimate 3000 usando una columna Dionex DNApac p-100 y un gradiente que variaba entre 10 mM-1 M de perclorato de sodio a pH 7,5. El contenido de oligonucleótido escindido y no escindido se determinó frente a un patrón utilizando un detector fluorescente a 615 nm y un detector UV a 260 nm.

SEQ ID NO	Secuencia del conector	% escindido después de 20 min S1	% escindido después de 120 min S1
20	--	2	5
18	a	29,1	100
17	ca	40,8	100
16	tea	74,2	100
19	gac	22,9	n.d.

Conclusión Los conectores de PO (o región B como se hace referencia en el presente documento) dan como resultado que el conjugado (o grupo C) se escinda, y tanto la longitud como la composición de la secuencia del conector se pueden usar para modular la susceptibilidad a la escisión nucleolítica de la región B. La secuencia de los conectores de ADN/PO puede modular la tasa de escisión como se observa después de 20 min en el extracto de Nucleasa S1. Por lo tanto, la selección de la secuencia para la región B (por ejemplo, para el conector de ADN/PO) también se puede usar para modular el nivel de escisión en suero y en las células de los tejidos diana.

El hígado, el riñón y el suero (B) se enriquecieron con oligonucleótido de SEQ ID NO 16 a concentraciones de 200 µg/g de tejido. Las muestras de hígado y riñón recogidas de ratones NMRI se homogeneizaron en un tampón de homogeneización (Igepal CA-630 al 0,5 %, Tris 25 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, pH 8,0 (ajustado con NaOH 1 N). Los homogeneizados se incubaron durante 24 horas a 37° y, después de esto, los homogeneizados se extrajeron con fenol-cloroformo. El contenido de oligonucleótido escindido y no escindido en el extracto de hígado y riñón y del suero se determinó frente a un patrón usando el procedimiento de HPLC anterior.

SEQ ID	Secuencia del conector	% de escisión después de 24 h del homogeneizado de hígado	% de escisión después de 24 h del homogeneizado de riñón	% de escisión después de 24 horas en suero
16	tca	83	95	0

Conclusión Los conectores de PO (o región B como se hace referencia en el presente documento) dan como resultado la escisión del conjugado (o grupo C) del oligonucleótido, en homogeneizado de hígado o riñón, pero no en suero.

Nota: La escisión en los ensayos anteriores se refiere a la escisión del conector escindible, el oligómero o región A debe permanecer funcionalmente intacto. La susceptibilidad a la escisión en los ensayos anteriores se puede usar para determinar si un conector es bioescindible o fisiológicamente lábil.

Ejemplo 7a: Inhibición *in vivo* del FVII (1 mg/kg)

Se preparó un estudio de ratones *in vivo* usando un total de 6 grupos de ratones ($n = 3$). A cada ratón se le administró una dosis i.v. única de compuesto de LNA dirigido al ARNm del FVII, a 1 mg/kg o equimolar en comparación con SEQ ID NO 12. Se incluyó un grupo de control con solución salina. Se extrajo sangre de los ratones previamente el 1 día antes de la administración, y se extrajo sangre posteriormente el día 1 y 2 después de la administración. Los ratones se sacrificaron el día 4, se obtuvieron muestras de hígado, riñón y sangre. Véase la tabla 7 para la configuración del estudio.

Los niveles séricos de factor VII, los niveles de ARNm y el contenido de oligonucleótidos en tejido se midieron usando técnicas de ensayo estándar.

Conclusiones: El conector de ADN/PO (PO) mejora la regulación por disminución de la proteína FVII en el suero (Figura 18) para oligonucleótidos de LNA dirigidos al ARNm del FVII con conjugados de colesterol cuando se compara con el conector ditio (disulfuro) ampliamente usado (conector de PO SEQ ID NO 15 en comparación con conector SS SEQ ID NO 14). Al usar GalNAc como conjugado, es evidente que el conector PO mejora la regulación por disminución de la proteína FVII cuando se compara con el oligonucleótido de LNA conjugado con enlace amino (el conector de PO SEQ ID NO 13 se compara con SEQ ID NO 12 con enlace amino). Se conoce que el conjugado con GalNAc es bioescindible (posiblemente debido al conector peptídico) y, como tal, parece que el conector de PO potencia además

la liberación de compuesto activo y potente en la célula diana. Estos datos corresponden a los datos de expresión de ARNm (Figura 19). El contenido en tejido del oligonucleótido en el riñón y el hígado muestra cómo los conjugados cambian la distribución (Figura 20). Se observa que los dos compuestos conjugados con colesterol dan una distribución similar (compárese SEQ ID NO 14 y NO 15), por lo que con el ARNm potenciado y la regulación descendente por la proteína FVII del conector de PO (SEQ ID NO 15) se observa cómo el conector de PO potencia la actividad del oligonucleótido de LNA dirigido a FVII cuando se compara con SEQ ID NO 14.

Materiales y procedimientos:

10 Diseño experimental:

Tabla 7:

grupo	compuesto	momento del sacrificio después de la dosis	tamaño del grupo	dosis (d0) mg/kg
1	solución salina	d4	3	ninguno
2	SEQ ID NO 11	d4	3	1
3	SEQ ID NO 12	d4	3	1
4	SEQ ID NO 13	d4	3	1
5	SEQ ID NO 14	d4	3	1
6	SEQ ID NO 15	d4	3	1

15 A ratones hembra se les administró por vía i.v. y se obtuvieron muestras de hígado, riñón y sangre en el momento del sacrificio el día 4. Se realizaron extracciones de sangre adicionales antes de la administración y también en los días 1 y 2 después de la administración.

Ejemplo 7b: Inhibición *in vivo* de FVII (0,1 y 0,25 mg/kg)

20 Se preparó un estudio de ratones *in vivo* usando un total de 7 grupos de ratones ($n = 3$). A cada ratón se le administró una dosis i.v. única de compuesto de LNA dirigido al ARNm del FVII, a 0,1 mg/kg o 0,25 mg/kg en cantidad equimolar en comparación con SEQ ID NO 12. Se incluyó un grupo de control con solución salina. Se extrajo sangre de los ratones previamente el 1 día antes de la administración, y se extrajo sangre posteriormente los días 4, 7, 11, 14 y 18 después de la administración. Los ratones se sacrificaron el día 24, se obtuvieron muestras de hígado, riñón y sangre. Véase la tabla 8 para la configuración del estudio. Los niveles séricos de factor VII, los niveles de ARNm y el contenido de oligonucleótidos en tejido se midieron usando técnicas de ensayo estándar.

30 **Conclusiones:** El conector de ADN/PO (PO) mejora la regulación por disminución de la proteína FVII (Figura 21) para oligonucleótidos de LNA dirigidos al ARNm del FVII con conjugados de colesterol cuando se compara con el conector ditio ampliamente usado (conector de PO SEQ ID NO 15 en comparación con conector SS SEQ ID NO 14) tanto a 0,1 mg/kg como a 0,25 mg/kg. Al usar GalNAc como conjugado, los datos del ARNm (Figura 22) sugieren que el conector de PO mejora la regulación por disminución cuando se compara con el oligonucleótido de LNA conjugado con enlace amino (el conector de PO SEQ ID NO 13 se compara con SEQ ID NO 12 con enlace amino). Los datos de expresión del ARNm (Figura 22) respaldan la actividad mejorada del compuesto conector de PO (SEQ ID NO 15) en comparación con el conjugado unido a ditio (SEQ ID NO 14). El contenido en tejido del oligonucleótido en el riñón y el hígado muestra cómo los conjugados cambian la distribución (Figura 23). Los datos sugieren que el conector de PO aumenta la captación tanto en el hígado como en el riñón en estos intervalos de dosis tanto para el conjugado con colesterol como para el conjugado con GalNAc (compárese SEQ ID NO 14 y 15 y compárese SEQ ID NO 13 y 12)

40 Materiales y procedimientos:

Diseño experimental:

45 **Tabla 8:**

grupo	compuesto	momento del sacrificio después de la dosis	tamaño del grupo	dosis (d0) mg/kg
1	Solución salina	d24	3	ninguno
2	SEQ ID NO 12	d24	3	0,1
3	SEQ ID NO 13	d24	3	0,1
4	SEQ ID NO 14	d24	3	0,1
5	SEQ ID NO 14	d24	3	0,25
6	SEQ ID NO 15	d24	3	0,1
7	SEQ ID NO 15	d24	3	0,25

A ratones macho se les administró por vía i.v. y se obtuvieron muestras de hígado, riñón y sangre en el momento del sacrificio el día 24. Se realizaron extracciones de sangre adicionales antes de la administración y también en los días 4, 7, 11, 14 y 18 después de la administración.

5 Ejemplo 8. Silenciamiento *in vivo* de ARNm de ApoB con diferentes conjugados y conector de PO.

Para explorar el impacto del conector de ADN/PO bioescindible en conjugados adicionales, se trataron i.v. ratones C57BL6l con control de solución salina o con una dosis única de 1 mg/kg de kg del compuesto original n.º 1 o equimolarmente de ASO conjugado con monoGalNAc, ácido fólico, Fam o tocoferol, sin conector bioescindible, con conector ditio (SS) o con conector de ADN/PO (PO). Después de 7 días, los animales se sacrificaron y se aisló el ARN de las muestras de hígado y riñón, y se analizó para determinar la expresión del ARNm de ApoB (Fig. 24)

Conclusiones:

Para los 4 conjugados, el conector de ADN/PO mejora la atenuación de ApoB en el hígado en comparación con el conector ditio ampliamente usado (compárese n.º 27 con n.º 26, n.º 30 con n.º 29, n.º 33 con n.º 32 y n.º 36 con n.º 35). Para monoGalNAc y tocoferol, el conector de ADN/PO mejora la atenuación de ApoB en el hígado, incluso en comparación con el compuesto no conjugado (compárese n.º 30 y n.º 36 con n.º 1). El tocoferol combinado con un conector de ADN/PO muestra la capacidad de redireccionar un compuesto del riñón al hígado (compárese A y B, n.º 36 con n.º 1)

Materiales y procedimientos:

Diseño experimental:

Tabla 9:

Gr. n.º	N.º de identificación del animal	Raza/sexo/alimentación del animal	SEQ ID compuesto, dosis 1 mg/kg	Ruta de adm.	Día de administración	Día del sacrificio
1	1-5	NMRI ♀-Chow	1	i.v.	0	7
2	5-10	NMRI ♀-Chow	28	i.v.	0	7
3	11-15	NMRI ♀-Chow	29	i.v.	0	7
4	16-20	NMRI ♀-Chow	30	i.v.	0	7
5	21-25	NMRI ♀-Chow	25	i.v.	0	7
6	26-30	NMRI ♀-Chow	26	i.v.	0	7
7	31-35	NMRI ♀-Chow	27	i.v.	0	7
8	36-40	NMRI ♀-Chow	NaCl al 0,9 %	i.v.	0	7

Gr. n.º	N.º de identificación del animal	Raza/sexo/alimentación del animal	SEQ ID compuesto, dosis 1 mg/kg	Ruta de adm.	Día de administración	Día del sacrificio
1	1-5	NMRI ♀-Chow	1	i.v.	0	7
2	5-10	NMRI ♀-Chow	31	i.v.	0	7
3	11-15	NMRI ♀-Chow	32	i.v.	0	7
4	16-20	NMRI ♀-Chow	33	i.v.	0	7
5	21-25	NMRI ♀-Chow	34	i.v.	0	7
6	26-30	NMRI ♀-Chow	35	i.v.	0	7
7	31-35	NMRI ♀-Chow	36	i.v.	0	7
8	36-40	NMRI ♀-Chow	NaCl al 0,9 %	i.v.	0	7

Administración de dosis y toma de muestras. A los ratones C57BL6 se les administró i.v. una dosis única de 1 mg/kg de ASO formulado en solución salina o solución salina sola de acuerdo con la tabla anterior. Los animales se sacrificaron el día 7 después de la dosificación y se tomaron muestras del hígado y el riñón.

Aislamiento de ARN y análisis del ARNm. El ARN total se extrajo de muestras de hígado y riñón y los niveles de ARNm de ApoB se analizaron usando un ensayo de ADN ramificado.

Ejemplo 9. Silenciamiento *in vitro* del ARNm de la Diana X con ASO de LNA en bucle con un conector de PO

Los grupos de bloqueo pueden ser beneficiosos con respecto a la tolerabilidad, la especificidad o la reducción del efecto inespecífico de ASO, pero pueden ser un desafío en términos de conservar la actividad de ASO original, desbloqueada. Como ejemplo de un grupo de bloqueo, utilizamos una secuencia complementaria que está conectada al oligonucleótido por un tramo de nucleótidos no complementario que genera un bucle en forma de horquilla. Las bases no emparejadas en el bucle son 3 nucleótidos de ADN con cadena principal de fofodiéster (conector de PO) o

los mismos nucleótidos de ADN con cadena principal de fosforotioato. Para someter a prueba la actividad de LNA-ASO en bucle, se trataron células Neuro 2a con ASO 1 μM en un ensayo de gimnosis y se extrajo el ARN y se sometió a RT-QPCR para analizar la atenuación del ARNm de la diana X (Fig. 25).

- 5 **Conclusión** ASO en bucle con el conector de PO (SEQ ID NO 21 y 23) mostraron una atenuación mejorada del ARNm de la diana X en comparación con la misma secuencia de ASO sin el conector de PO (SEQ ID NO 22 y 24).

Materiales y procedimientos:

10 Ensayo de gimnosis en células N2a:

Se sembraron células Neuro 2a (neuroblastoma de ratón) en placas de 24 pocillos con $1,8 \times 10^4$ células/pocillo y se trataron con ASO de LNA en bucle 1 μM con y sin conector de PO, respectivamente, en DMEM + Glutamax (gibco-life, n.º 61965-026), glutamina 2 mM, FBS al 10 %, piruvato sódico 1 mM, gentamicina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

- 15 Aislamiento de RNA total y síntesis de la primera hebra. El ARN total se extrajo después de 6 días de gimnosis con el kit Qiagen RNeasy (Qiagen n.º de cat. 74106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis de la primera hebra se realizó usando reactivos de retrotranscriptasa de Ambion de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 20 Para cada muestra se mezclaron 0,5 μg de ARN total con 2 μl de decámeros aleatorios (50 μM) y 4 μl de mezcla de dNTP (2,5 mM para cada dNTP) y se calentó a 70 °C durante 3 min, después de lo cual las muestras se enfriaron rápidamente en hielo. Se añadieron 2 μl de tampón 10x a t.a., 1 μl de retrotranscriptasa del MMLV (100 U/ μl) y 0,25 μl de inhibidor de RNasa (10 U/ μl) a cada muestra, seguido de incubación a 42 °C durante 60 min, inactivación por calor de la enzima a 95 °C durante 10 min y, a continuación, la muestra se enfrió a 4 °C. Las muestras de ADNr se diluyeron 1:5 y se sometieron a RT-QPCR usando la mezcla maestra Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems n.º de cat. 4364103) y el ensayo de expresión génica de Taqman frente a la diana X siguiendo el protocolo del fabricante y procesado en el instrumento de RT-qPCR de Applied Biosystems (ViiA7) en modo rápido. La expresión del ARNm de la diana X se normalizó a la expresión del ARNm de actina beta (mBACT n.º 4352341E) y se comparó con los niveles de ARNm simulados.

30 **Ejemplo 10: estudio en primates no humanos**

- El objetivo principal de este estudio es investigar marcadores de lípidos seleccionados durante 7 semanas después de una única inyección intravenosa lenta de compuestos conjugados de LNA anti-PCSK9 y anti-ApoB a macacos de Java y evaluar la toxicidad potencial de los compuestos en monos. Los compuestos usados en este estudio son SEQ ID NO 46 y 49, 5 y 54, que se prepararon en solución salina estéril (0,9 %) a una concentración inicial de 0,625 y 2,5 mg/ml).

- 40 Se utilizan monos machos (PCSK9) o monos hembra (ApoB) de al menos 24 meses de edad, y se les da acceso libre a agua del grifo y se distribuirán diariamente 180 g de dieta expandida MWM(E) SQC SHORT (Dietex France, SDS, Saint Gratien, Francia) por animal. La cantidad total de alimento distribuido en cada jaula se calculará de acuerdo con el número de animales en la jaula ese día. Además, se entregarán diariamente frutas y verduras a cada animal. Los animales se aclimatarán a las condiciones del estudio durante un período de al menos 14 días antes del comienzo del período de tratamiento. Durante este período, se realizarán investigaciones previas al tratamiento. Los animales recibirán por vía i.v. una dosis de, por ejemplo, 0,25 mg/kg o 1 mg/kg.

- El volumen de dosis será de 0,4 ml/kg. Se usan 2 animales por grupo. Después de tres semanas, se analizarán los datos y se podrá iniciar un segundo grupo de animales que usen un régimen de dosificación mayor o menor. El ajuste de la dosis preliminar es de 0,5 mg/kg y 1 mg/kg, o menor que el basado en el primer conjunto de datos.

- 50 Las formulaciones de dosis se administrarán una vez el día 1. Se observará a los animales durante un período de 7 semanas después del tratamiento y se liberarán del estudio el día 51. El día 1 corresponde al primer día del período de tratamiento. Las observaciones clínicas y el peso corporal y la ingesta de alimentos (por grupo) se registrarán antes y durante el estudio.

- 55 Se obtendrán muestras de la sangre y se analizarán en los siguientes puntos temporales:

Día del estudio	Parámetros
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
1	Administración
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA
8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA

Día del estudio	Parámetros
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA

RCP 0 patología clínica de rutina, LSB = bioquímica de seguridad hepática, PK = farmacocinética, OA = otro análisis, L = lípidos.

5 Bioquímica sanguínea

Los siguientes parámetros se determinarán para todos los animales supervivientes en las ocasiones que se indican a continuación:

- 10 • panel completo de bioquímica (lista completa a continuación) - en los días -8, 15 y 50,
- seguridad hepática (solo ASAT, ALP, ALAT, TBIL y GGT) - en los días 4, 8, 22 y 36,
- 15 • perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C y triglicéridos) y Apo-B solo - en los días -1, 4, 8, 22, 29, 36 y 43.

Se obtendrá sangre (aproximadamente 1,0 ml) en tubos con heparina de litio (usando el analizador de bioquímica sanguínea ADVIA 1650): Apo-B, sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo inorgánico, glucosa, HDL-C, LDL-C, urea, creatinina, bilirrubina total (TBIL), colesterol total, triglicéridos, fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT), creatina cinasa, gamma-glutamilttransferasa (GGT), lactato deshidrogenasa, proteína total, albúmina, cociente albúmina/globulina.

20 Análisis de sangre: Se recogerán muestras de sangre para el análisis de PCSK9 de animales del Grupo 16 solo en los días -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50.

25 Se recogerá sangre venosa (aproximadamente 2 ml) de una vena apropiada en cada animal en un tubo de separación de suero (SST) y se dejará coagular durante al menos 60 ± 30 minutos a temperatura ambiente. La sangre se centrifugará a 1000 g durante 10 minutos en condiciones de refrigeración (configurado para mantener +4 °C). El suero se transferirá a 3 tubos individuales y se almacenará a -80 °C hasta que se analice en CitoLAB France utilizando un procedimiento ELISA (kit ELUL Circulex Human PCSK9, CY-8079, validado para muestras de macaco de Java).

30 Otro análisis: Los documentos WO2011009697 y WO2010142805 proporcionan los procedimientos para el siguiente análisis: qPCR, análisis de ARNm de PCSK9/ApoB, otro análisis incluye ELISA de proteína PCSK9/ApoB, análisis de Lp(a) sérica con ELISA (Mercodia n.º 10-1106-01), análisis de oligonucleótidos en tejido y plasma (contenido del fármaco), extracción de muestras, muestras de ptrón y de control de calidad, determinación del contenido de oligonucleótidos mediante ELISA.

35

Ejemplo 11: Evaluación de la toxicidad hepática y renal en ratas.

40 Los compuestos de la invención se pueden evaluar para determinar su perfil de toxicidad en roedores, tal como en ratones o ratas. A modo de ejemplo se puede usar el siguiente protocolo: Se usan Wistar Han Crl:WI(Han) de aproximadamente 8 semanas de edad. A esta edad, los machos deben pesar aproximadamente 250 g. Todos los animales tienen acceso libre a dieta de mantenimiento granulada SSNIFF R/M-H (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemania) y al agua del grifo (filtrada con un filtro de 0,22 µm) contenida en botellas. Se utiliza el nivel de dosis de 10 y 40 mg/kg/dosis (administración subcutánea) y se administra los días 1 y 8. Los animales son sacrificados el día 15. Se recogen muestras de orina y sangre los días 7 y 14. Se realiza una evaluación de la patología clínica el día 14. El peso corporal se determina antes del estudio, el primer día de administración y 1 semana antes de la necropsia. El consumo de alimentos por grupo se evaluará diariamente. Se obtienen muestras de sangre de la vena de la cola después de 6 horas de ayuno. Se realiza el siguiente análisis de suero sanguíneo: recuento de eritrocitos, volumen corpuscular medio, hematocrito, hemoglobina, concentración de hemoglobina corpuscular media, hemoglobina corpuscular media, recuento de trombocitos, recuento de leucocitos, fórmula leucocitaria con morfología celular, recuento de reticulocitos, sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo inorgánico, glucosa urea, creatinina, bilirrubina total, colesterol total, triglicéridos, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, proteína total, albúmina, cociente albúmina/globulina. El análisis de orina mide α-GST, β-2 microglobulina, calbindina, clusterina, cistatina C, KIM-1, osteopontina, TIMP-1, VEGF y NGAL. Siete analitos (calbindina, clusterina, GST-α, KIM-1, osteopontina, TIMP-1, VEGF) se cuantificarán en el Panel 1 (Panel 1 de microesferas magnéticas para toxicidad renal en ratas MILLIPLEX® MAP, RKT1MAG-37K). Tres analitos (β-2 microglobulina, cistatina C, lipocalina-2/NGAL) se cuantificarán en el Panel 2 (Panel 2 de microesferas magnéticas para toxicidad renal en ratas MILLIPLEX® MAP, RXT2MAG-37K). El ensayo para determinar la concentración de estos biomarcadores en la orina de ratas se basa en la tecnología Luminex xMAP®. Las microesferas recubiertas con anticuerpos anti-α-GST/β-2 microglobulina/calbindina/clusterina/cistatina C/KIM-1/osteopontina/TIMP-1/VEGF/NGAL están codificadas por color

60

- 5 con dos tintes fluorescentes diferentes. Se determinan los siguientes parámetros (orina usando el ADVIA 1650): proteínas en orina, creatinina en orina. Parámetros cuantitativos: volumen, pH (usando tiras reactivas 10-Multistix SG/analizador de orina Clinitek 500), densidad relativa (usando un refractómetro). Parámetros semicuantitativos (usando tiras reactivas 10-Multistix SG/analizador de orina Clinitek 500): proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, bilirrubina, nitritos, sangre, urobilinógeno, citología de sedimentos (mediante examen microscópico). Parámetros cualitativos: Aspecto, color. Después del sacrificio, se determinan el peso corporal y el peso del riñón, el hígado y el bazo. y se calcula la proporción órgano/peso corporal Se obtendrán muestras de riñón e hígado y se congelarán o almacenarán en formol. Se realiza análisis microscópico.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Santaris Pharma A/S

5 <120> CONJUGADOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

<130> 1138WO

<150> EP12192773.5

10 <151> 15-11-2012

<150> EP13153296.2

<151> 30-01-2013

15 <150> EP13157237.2

<151> 28-02-2013

<150> EP13174092.0

<151> 27-06-2013

20 <160> 54

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1

<211> 13

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (1) . . (13)

<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

40 <222> (1) . . (2)

<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>

<221> misc_feature

45 <222> (11) . . (13)

<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 1

gcattggtat tca

50

<210> 2

<211> 13

<212> ADN

<213> Artificial

55 <220>

<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

<220>

<221> misc_feature

60 <222> (1) . . (13)

<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

65 <222> (1) . . (2)

	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
	<221> misc_feature	
5	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 2	
	gcattggtat tca	13
15		
	<210> 3	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20		
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (13)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol unido a disulfuro	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 3	
45	gcattggtat tca	13
	<210> 4	
	<211> 16	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
55	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (4)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
	<220>	
65	<221> misc_feature	

	<222> (4) . . (16)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (4) . . (5)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (14) . . (16)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 4	
15	tcagcattgg tattca	16
	<210> 5	
	<211> 15	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (15)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (4)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13) . . (15)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
50	<400> 5	
	cagcattggt attca	15
	<210> 6	
	<211> 14	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
65	<220>	

	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2) . . (14)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2) . . (3)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (12) . . (14)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
20	<400> 6	
	agcattggta ttca	14
	<210> 7	
	<211> 13	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (13)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> nucleósidos de LNA	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
45	<400> 7	
	gtctgtggaa gcg	13
	<210> 8	
50	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (13)	
60	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
65	<223> nucleósidos de LNA	

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
5	<223> conjugado con 5-colesterol	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (13)	
10	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 8	
	gtctgtggaa gcg	13
	<210> 9	
15	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
25	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
30	<223> conjugado con 5-colesterol	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (15)	
35	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (4)	
40	<223> nucleósidos de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13) . . (15)	
45	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 9	
	cagtctgtgg aagcg	15
50	<210> 10	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
60	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (15)	
5	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (4)	
10	<223> nucleósidos de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13) . . (15)	
15	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 10	
	ctgtctgtgg aagcg	15
20	<210> 11	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
30	<222> (1) . . (13)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
35	<222> (1) . . (2)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
	<221> misc_feature	
40	<222> (1) . . (13)	
	<223> n es a, c, g o t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
45	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 11	
	nnnnnnnnnnn nnn	13
50	<210> 12	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
60	<222> (1) . . (13)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> (1) . . (2)	

	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
	<221> misc_feature	
5	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con complejo con 5-GalNac (Conj1a)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (1) . . (13)	
	<223> n e s a , c , g o t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
15	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 12	
20	nnnnnnnnnnn nnn	13
	<210> 13	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con complejo con 5-GalNac (Conj1a)	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (15)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (4)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
50	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (15)	
	<223> n e s a , c , g o t	
	<220>	
55	<221> misc_feature	
	<222> (13) . . (15)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 13	
60	cannnnnnnnn nnnnn	15
	<210> 14	
	<211> 13	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	

- <220>
- <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

- <220>
- 5 <221> misc_feature
- <222> (1) . . (13)
- <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

- <220>
- 10 <221> misc_feature
- <222> (1) . . (2)
- <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

- <220>
- 15 <221> misc_feature
- <222> (1) . . (1)
- <223> conjugado con 5-colesterol unido a disulfuro

- <220>
- 20 <221> misc_feature
- <222> (1) . . (13)
- <223> n e s a, c, g o t

- <220>
- 25 <221> misc_feature
- <222> (11) . . (13)
- <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

- <400> 14
- 30 **nnnnnnnnnnn nnn**

- <210> 15
- <211> 15
- <212> ADN
- 35 <213> Artificial

- <220>
- <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

- <220>
- 40 <221> misc_feature
- <222> (1) . . (3)
- <223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster

- <220>
- 45 <221> misc_feature
- <222> (1) . . (1)
- <223> conjugado con 5-colesterol

- <220>
- 50 <221> misc_feature
- <222> (3) . . (15)
- <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

- <220>
- 55 <221> misc_feature
- <222> (3) . . (4)
- <223> nucleósidos de LNA

- <220>
- 60 <221> misc_feature
- <222> (3) . . (15)
- <223> n e s a, c, g o t

- <220>
- 65 <221> misc_feature

	<222> (13) . . (15)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 15	
5	cannnnnnnnn nnnnn	15
	<210> 16	
	<211> 16	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (4)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-FAM	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4) . . (16)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4) . . (5)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14) . . (16)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
40	<400> 16	
	tcagcattgg tattca	16
	<210> 17	
	<211> 15	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-FAM	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (15)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
65	<220>	

	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (4)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13) . . (15)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
10	<400> 17	
	cagcattggt attca	15
	<210> 18	
	<211> 14	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-FAM	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2) . . (14)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2) . . (3)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (12) . . (14)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
45	<400> 18	
	agcattggta ttca	14
	<210> 19	
50	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (4)	
60	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
65	<223> conjugado con 5-FAM	

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4) . . (16)	
5	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4) . . (5)	
10	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14) . . (16)	
15	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 19	
	gacgcattgg tattca	16
	<210> 20	
20	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (13)	
30	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
35	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
40	<223> conjugado con 5-FAM	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (13)	
45	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 20	
	gcattggtat tca	13
50	<210> 21	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA + bloqueador del conector PO	
	<220>	
	<221> misc_feature	
60	<222> (1) . . (16)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> (1) . . (3)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	

5	<220> <221> misc_feature <222> (1) .. (9) <223> n e s a , c , g o t	
10	<220> <221> misc_feature <222> (13) .. (27) <223> n e s a , c , g o t	
15	<220> <221> misc_feature <222> (14) .. (16) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
20	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(19) <223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
25	<220> <221> misc_feature <222> (19) .. (27) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
30	<400> 21 nnnnnnnnnnn gcnnnnnnnnn nnnnnnn	27
35	<210> 22 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
45	<220> <221> misc_feature <222> (1) .. (27) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
50	<220> <221> misc_feature <222> (1) .. (3) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1) .. (27) <223> n e s a , c , g o t	
60	<220> <221> misc_feature <222> (14) .. (16) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
65	<400> 22 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnn	27
	<210> 23 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	

- <223> Oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA + bloqueador del conector PO
- <220>
- <221> misc_feature
- 5 <222> (1) . . (16)
- <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato
- <220>
- <221> misc_feature
- 10 <222> (1) . . (3)
- <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>
- <221> misc_feature
- 15 <222> (1) . . (9)
- <223> n es a, c, g o t
- <220>
- <221> misc_feature
- 20 <222> (13) . . (27)
- <223> n es a, c, g o t
- <220>
- <221> misc_feature
- 25 <222> (14) . . (16)
- <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>
- <221> misc_feature
- 30 <222> (16) . . (19)
- <223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster
- <220>
- <221> misc_feature
- 35 <222> (19) . . (27)
- <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato
- <400> 23
- 40 **nnnnnnnnnnn gcnnnnnnnnn nnnnnnn**
- <210> 24
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 45 <220>
- <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA
- <220>
- <221> misc_feature
- 50 <222> (1) . . (27)
- <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato
- <220>
- <221> misc_feature
- 55 <222> (1) . . (3)
- <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>
- <221> misc_feature
- 60 <222> (1) . . (27)
- <223> n es a, c, g o t
- <220>
- <221> misc_feature
- 65 <222> (14) . . (16)

	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 24	
	nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnn	27
5	<210> 25	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (13)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-ácido fólico	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 25	
35	gcattggtat tca	13
	<210> 26	
	<211> 13	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (13)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con ácido fólico unido a disulfuro 5	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
65	<400> 26	
	gcattggtat tca	13

<210> 27
 <211> 15
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (3)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (1)
 <223> conjugado con 5-ácido fólico

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) . . (15)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) . . (4)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13) . . (15)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

 35 <400> 27
cagcattggt attca

 <210> 28
 <211> 13
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (13)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (2)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (1)
 <223> conjugado con 5-monoGalNAc

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11) . . (13)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

 65 <400> 28

gcattggtat tca

13

- <210> 29
- <211> 13
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) . . (13)
- 15 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) . . (2)
- 20 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) . . (1)
- 25 <223> conjugado con monoGalNAc unido a 5-disulfuro

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (11) . . (13)
- 30 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 29
gcattggtat tca

13

- <210> 30
- 35 <211> 15
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 40 <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) . . (3)
- 45 <223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) . . (1)
- 50 <223>conjugado con 5-monoGalNAc

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3) . . (15)
- 55 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3) . . (4)
- 60 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (13) . . (15)
- 65 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

	<400> 30 cagcattggt attca	15
5	<210> 31 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (13) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
20	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (2) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (1) <223> conjugado con 5-FAM	
30	<220> <221> misc_feature <222> (11) . . (13) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 31 gcattggtat tca	13
35	<210> 32 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
45	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (13) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
50	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (2) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (1) <223> conjugado con FAM unido a disulfuro 5	
60	<220> <221> misc_feature <222> (11) . . (13) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
65	<400> 32 gcattggtat tca	13
	<210> 33	

	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
	<220>	
	<221> misc_feature	
15	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-FAM	
	<220>	
	<221> misc_feature	
20	<222> (3) . . (15)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (3) . . (4)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
	<221> misc_feature	
30	<222> (13) . . (15)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 33	
	cagcattggt attca	15
35	<210> 34	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (13)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
50	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
55	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugados con 5-tocoferol	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 34	
65	gcattggtat tca	13

	<210> 35	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (13)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con tocoferol unido a disulfuro 5	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (13)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 35	
30	gcattggtat tca	13
	<210> 36	
	<211> 15	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugados con 5-tocoferol	
	<220>	
50	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (15)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
55	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (4)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (13) . . (15)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 36	
65	cagcattggt attca	15

5	<210> 37 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (14) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (3) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
20	<220> <221> misc_feature <222> (12) . . (14) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
25	<400> 37 tgctacaaaa ccca	14
	<210> 38 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
35	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (16) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
40	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (3) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
45	<220> <221> misc_feature <222> (13) . . (16) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
50	<400> 38 aatgctacaa aaccca	16
	<210> 39 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
60	<220> <221> misc_feature <222> (1) . . (16) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
65		

5	<p><220> <221> misc_feature <222> (1) . . (3) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C</p>	
10	<p><220> <221> misc_feature <222> (14) . . (16) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C</p>	
15	<p><400> 39 aatgctacaa aaccca</p>	16
20	<p><210> 40 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial</p>	
25	<p><220> <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA</p>	
30	<p><220> <221> misc_feature <222> (1) . . (15) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato</p>	
35	<p><220> <221> misc_feature <222> (1) . . (2) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C</p>	
40	<p><220> <221> misc_feature <222> (14) . . (15) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C</p>	
45	<p><400> 40 gctgtgtgag cttgg</p>	15
50	<p><210> 41 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial</p>	
55	<p><220> <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA</p>	
60	<p><220> <221> misc_feature <222> (1) . . (16) <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato</p>	
65	<p><220> <221> misc_feature <222> (1) . . (2) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C</p>	
70	<p><220> <221> misc_feature <222> (14) . . (16) <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C</p>	
75	<p><400> 41 tgctgtgtga gcttgg</p>	16
80	<p><210> 42</p>	

<211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1) . . (16)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1) . . (3)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (14) . . (16)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 42
 25 **tgctgtgtga gcttgg** 16

<210> 43
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

<220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1) . . (16)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1) . . (3)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (14) . . (16)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 43
 50 **tcttggtctg tgttcc** 16

<210> 44
 <211> 16
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (16)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato

65 <220>
 <221> misc_feature

	<222> (1) . . (3)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (15) . . (16)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 44	
10	tactggctctg tgttcc	16
	<210> 45	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (18)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (5)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16) . . (18)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
45	<400> 45	
	cacatgctac aaaaccca	18
	<210> 46	
	<211> 18	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
65	<220>	

	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (18)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (5)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15) . . (18)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
15	<400> 46	
	caaatgctac aaaaccca	18
	<210> 47	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (18)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (5)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16) . . (18)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
50	<400> 47	
	caaatgctac aaaaccca	18
	<210> 48	
55	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
65	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (17)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (4)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16) . . (17)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
20	<400> 48	
	cagctgtgtg agcttgg	17
25	<210> 49	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (18)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3) . . (4)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16) . . (18)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
60	<400> 49	
	catgctgtgt gagcttgg	18
60	<210> 50	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (3)
 5 <223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (1)
 10 <223> conjugado con 5-colesterol
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) . . (18)
 15 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) . . (4)
 20 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16) . . (18)
 25 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 50
catgctgtgt gagcttgg 18
- 30 <210> 51
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 35 <220>
 <223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA
- <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1) . . (3)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster
- <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1) . . (1)
 <223> conjugado con 5-colesterol
- <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (3) . . (18)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato
- <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (3) . . (4)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (16) . . (18)
 <223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 51
catcctggtc tgtgttcc 18
- 65 <210> 52

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (1) . . (3)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster	
	<220>	
	<221> misc_feature	
15	<222> (1) . . (1)	
	<223> conjugado con 5-colesterol	
	<220>	
	<221> misc_feature	
20	<222> (3) . . (18)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (3) . . (4)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<220>	
	<221> misc_feature	
30	<222> (17) . . (18)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 52	
35	catcctgggc tgtgttcc	18
	<210> 53	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (12)	
	<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato	
	<220>	
50	<221> misc_feature	
	<222> (1) . . (2)	
	<223> nucleósidos de LNA	
	<220>	
55	<221> misc_feature	
	<222> (11) . . (12)	
	<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C	
	<400> 53	
60	gttgacactg tc	12
	<210> 54	
	<211> 14	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	

- <220>
<223> conjugado de oligonucleótido gápmero de antisentido de LNA
- <220>
5 <221> misc_feature
<222> (1) . . (3)
<223> enlaces internucleosídicos de fosfodiéster
- <220>
10 <221> misc_feature
<222> (1) . . (1)
<223> conjugado con 5-colesterol
- <220>
15 <221> misc_feature
<222> (3) . . (14)
<223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato
- <220>
20 <221> misc_feature
<222> (3) . . (4)
<223> nucleósidos de LNA
- <220>
25 <221> misc_feature
<222> (13) . . (14)
<223> nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 54
30 **cagttgacac tgtc**

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto oligomérico de 8-35 nucleótidos de longitud, que comprende tres regiones:
 - 5 i) una primera región (región A), que es un oligómero de antisentido de 7-26 nucleótidos contiguos complementarios de una diana de ácido nucleico, que puede modular, en el que la primera región comprende al menos un análogo nucleosídico y en el que los enlaces internucleosídicos de la primera la región son en un 100 % distintos del fosfodiéster;
 - 10 ii) una segunda región (región B) unida covalentemente al nucleótido 5' o 3' de la primera región por medio de un enlace fosfodiéster, en el que la región B consiste en al menos dos, tal como al menos tres unidades consecutivas de ADN y/o ARN que están unidas por enlaces fosfodiéster; y
 - 15 iii) una tercera región que comprende un resto de conjugado o un resto de direccionamiento en el que la tercera región está unida covalentemente a la segunda región.
2. El compuesto oligomérico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los enlaces internucleosídicos distintos de fosfodiéster se seleccionan del grupo que consiste en fosforotioato, fosforoditioato y boranofosfato.
- 20 3. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la diana de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en un microARN, un ARNm, un ARNinc (ARN largo no codificante), un ARNnp, ARNnop y un ARN vírico.
- 25 4. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la primera región del compuesto oligomérico comprende un gápmero, un míxmero o un totalmero.
5. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la primera región del compuesto oligomérico comprende al menos un análogo nucleotídico bicíclico (LNA).
- 30 6. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la primera región y la segunda región forman una secuencia de nucleótidos contiguos.
7. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la segunda región está en 5' respecto a la primera región.
- 35 8. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la segunda región está en 3' respecto a la primera región.
9. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la región B consiste en un dinucleótido de secuencia AA, AT, AC, AG, TA, TT, TC, TG, CA, CT, CC, CG, GA, GT, GC o GG.
- 40 10. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la región B consiste en un trinucleótido de secuencia AAA, AAT, AAC, AAG, ATA, ATT, ATC, ATG, ACA, ACT, ACC, ACG, AGA, AGT, AGC, AGG, TAA, TAT, TAC, TAG, TTA, TTT, TTC, TAG, TCA, TCT, TCC, TCG, TGA, TGT, TGC, TGG, CAA, CAT, CAC, CAG, CTA, CTG, CTC, CTT, CCA, CCT, CCC, CCG, CGA, CGT, CGC, CGG, GAA, GAT, GAC, CAG, GTA, GTT, GTC, GTG, GCA, GCT, GCC, GCG, GGA, GGT, GGC o GGG.
- 45 11. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la segunda región está unida covalentemente a la tercera región en el nucleósido terminal de la segunda región (es decir, el extremo 3' o 5', dependiendo de la posición de la primera región).
- 50 12. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la tercera región comprende un resto no nucleotídico, tal como un resto de conjugado, tal como un esteroles, por ejemplo, colesterol, o un hidrato de carbono, tal como el complejo con GalNac/GalNac.
- 55 13. El compuesto oligomérico de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la tercera región comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en: un grupo lipófilo (por ejemplo, un lípido, un ácido graso, un esteroles), una proteína, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, un polímero, un grupo indicador, un tinte, un ligando de un receptor, un fármaco de molécula pequeña, un profármaco y una vitamina.
- 60 14. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la tercera región comprende un grupo de direccionamiento.
- 65 15. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la segunda y tercera región están unidos covalentemente por un grupo conector no nucleotídico.

- 5
16. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el enlace covalente entre la segunda y tercera regiones comprende un grupo seleccionado de fosfodiéster, un fosforotioato y fosforoditioato o un grupo boranofosfato, tal como un grupo fosfodiéster.
17. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto oligomérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 y un diluyente, vehículo, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 10
18. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para su uso en la inhibición de una diana de ácido nucleico en una célula.
19. El compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para su uso en medicina.

Figura 1

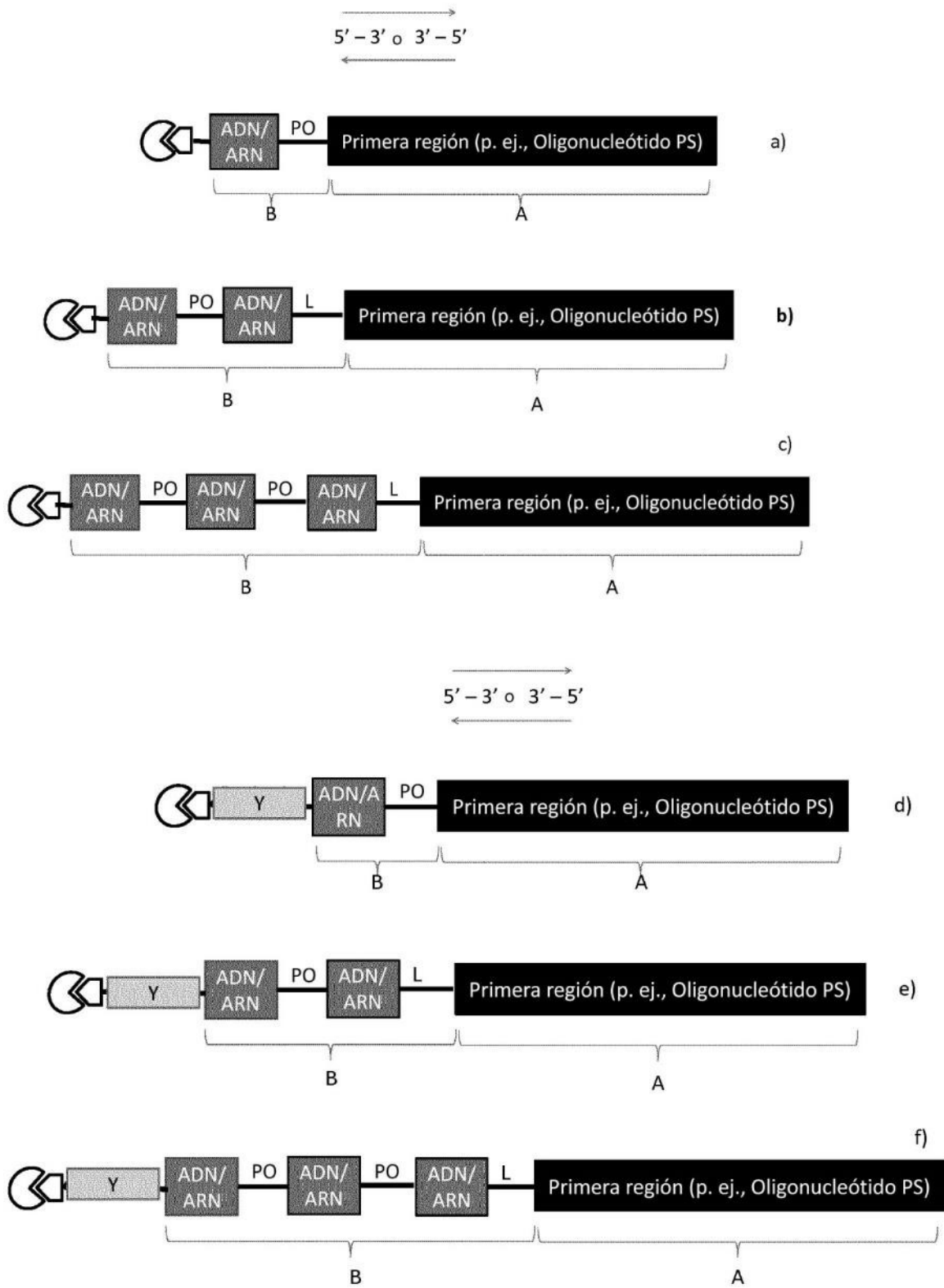


Figura 2

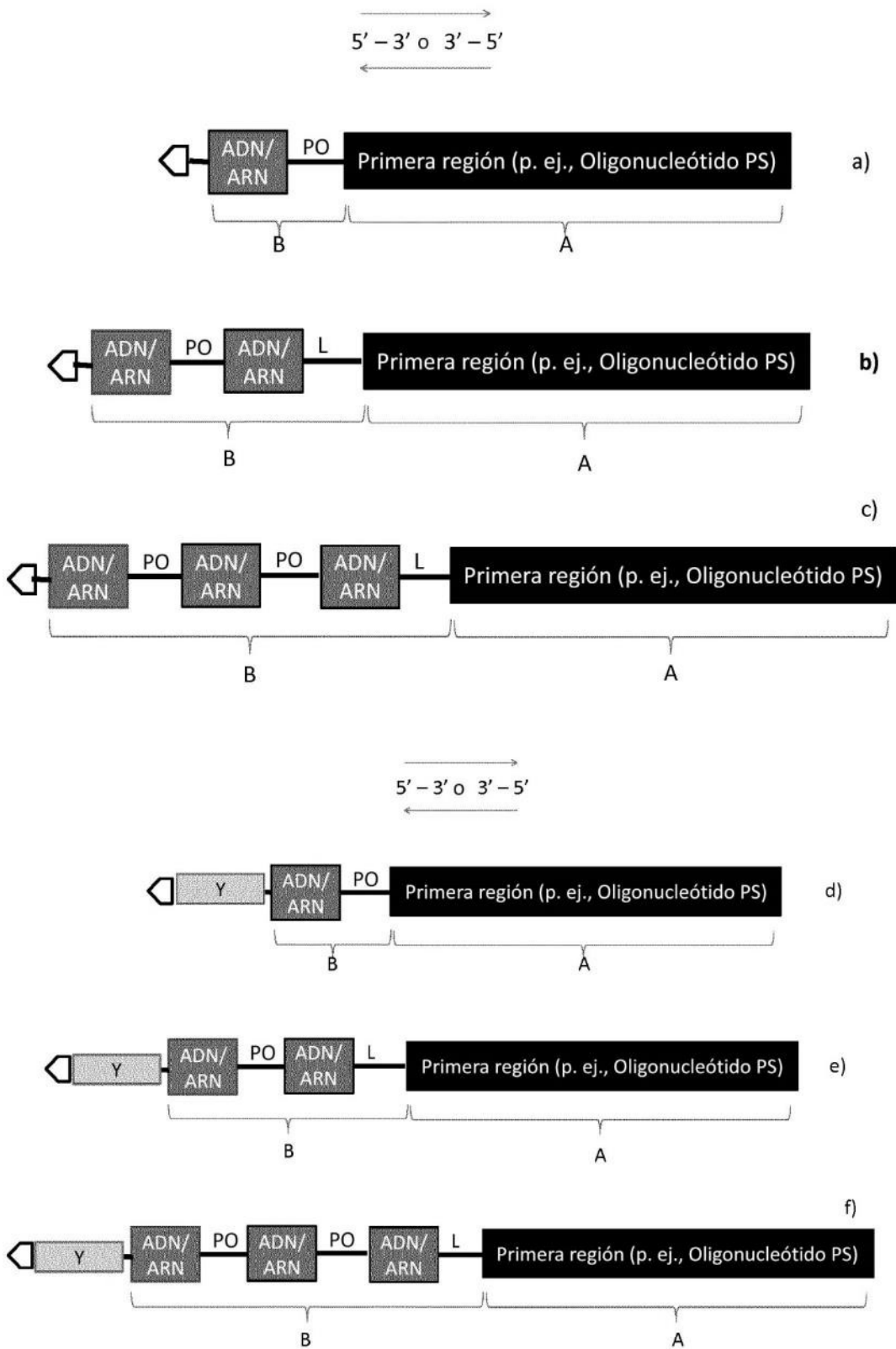


Figura 3

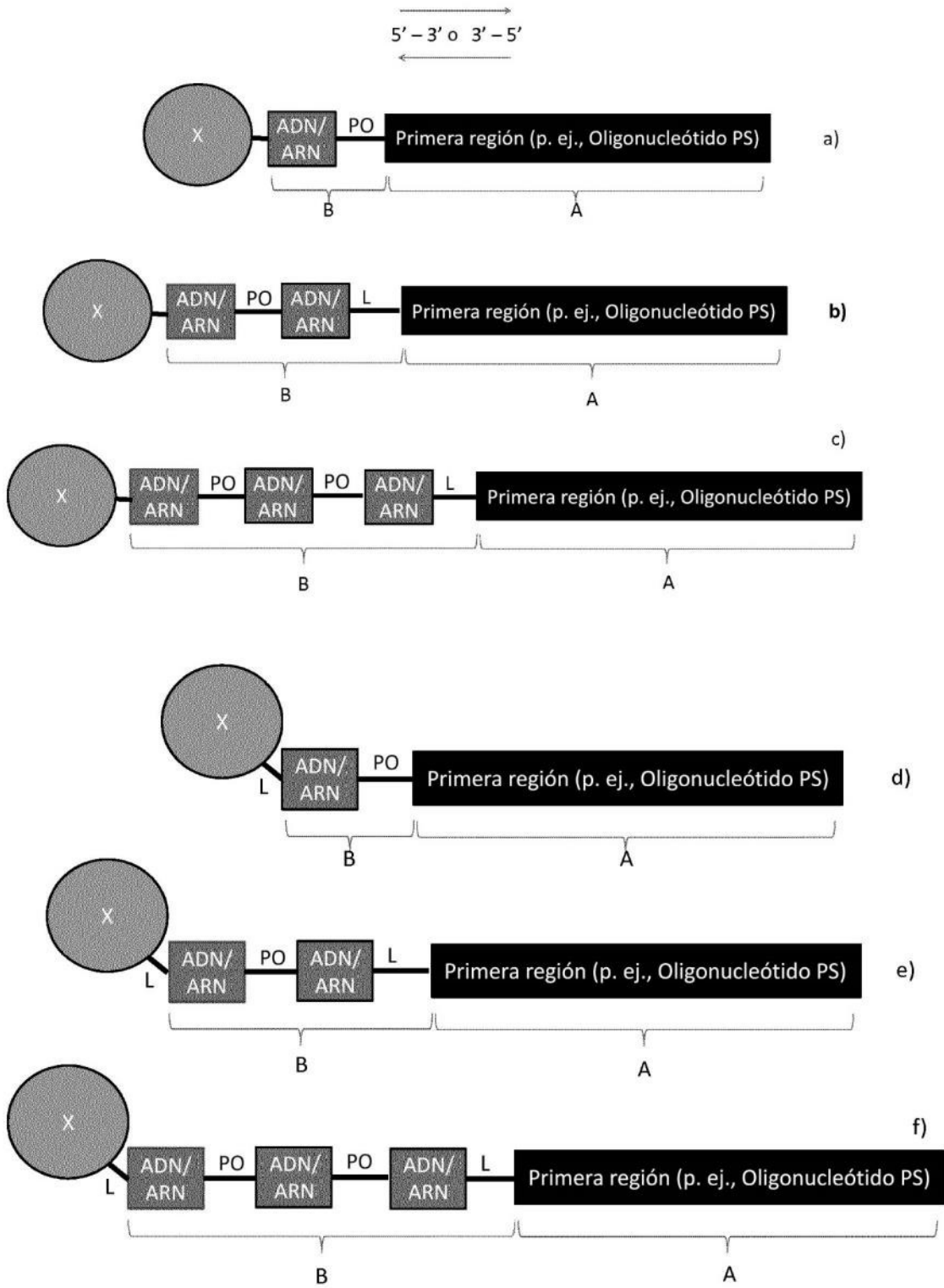


Figura 4

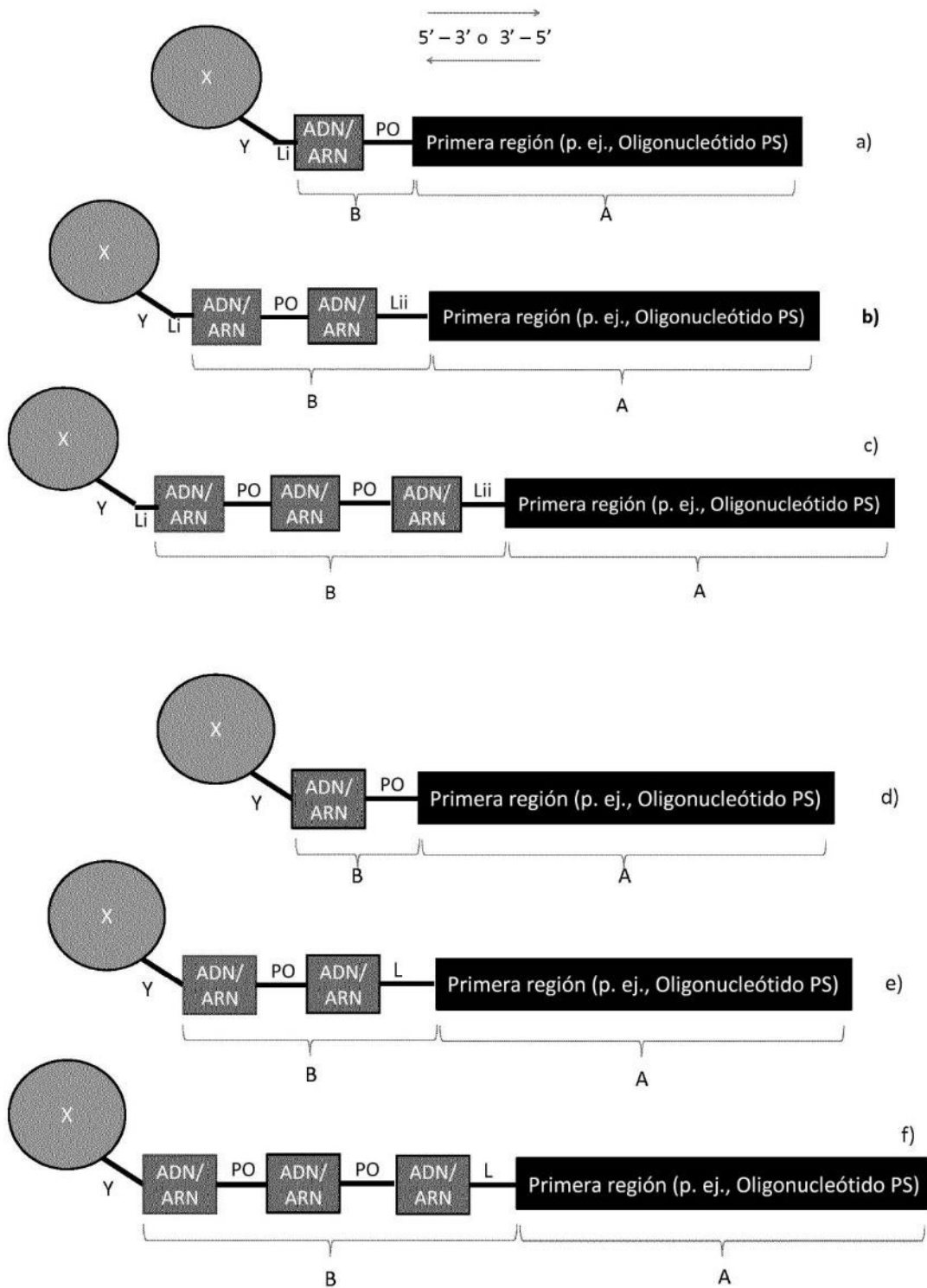


Figura 5a

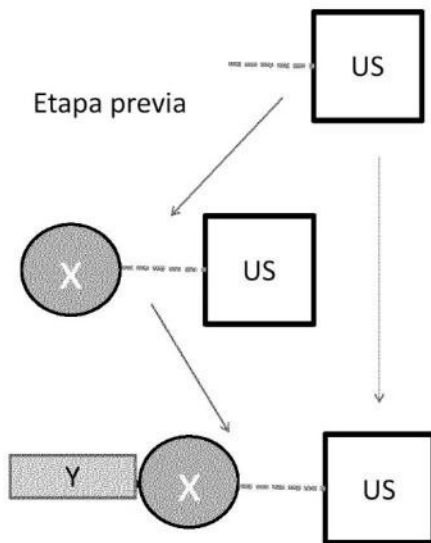


Figura 5b

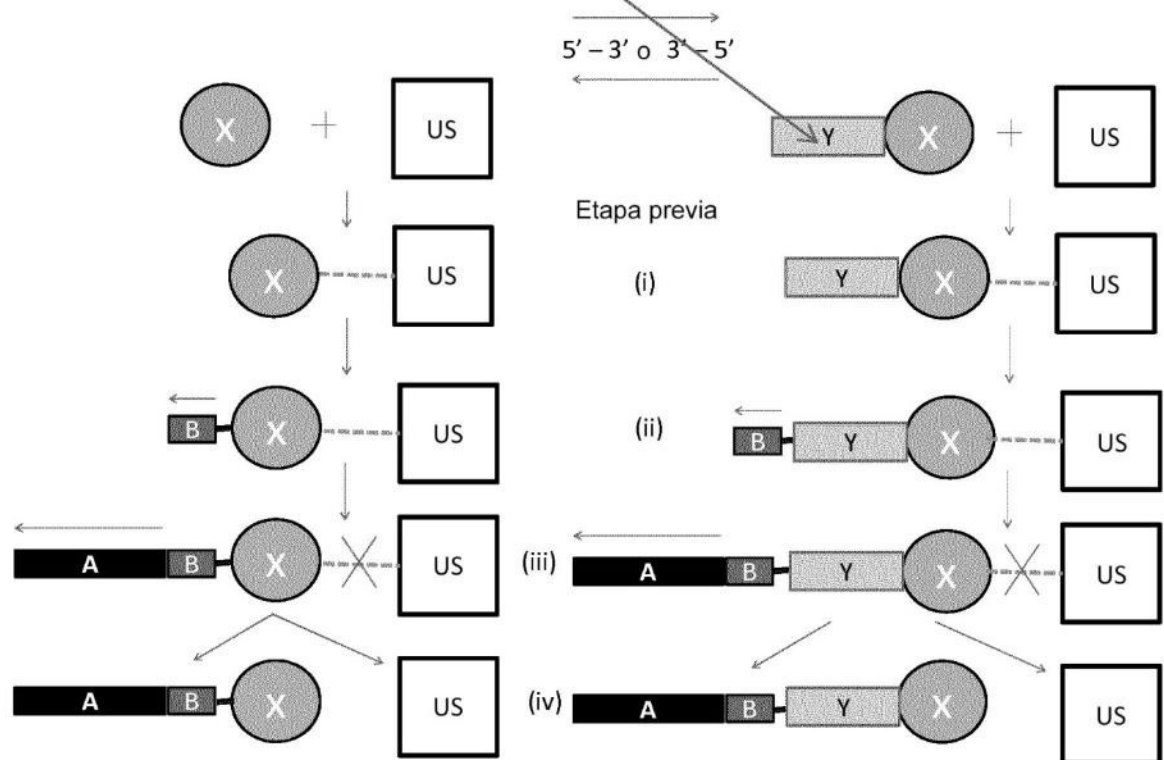


Figura 6

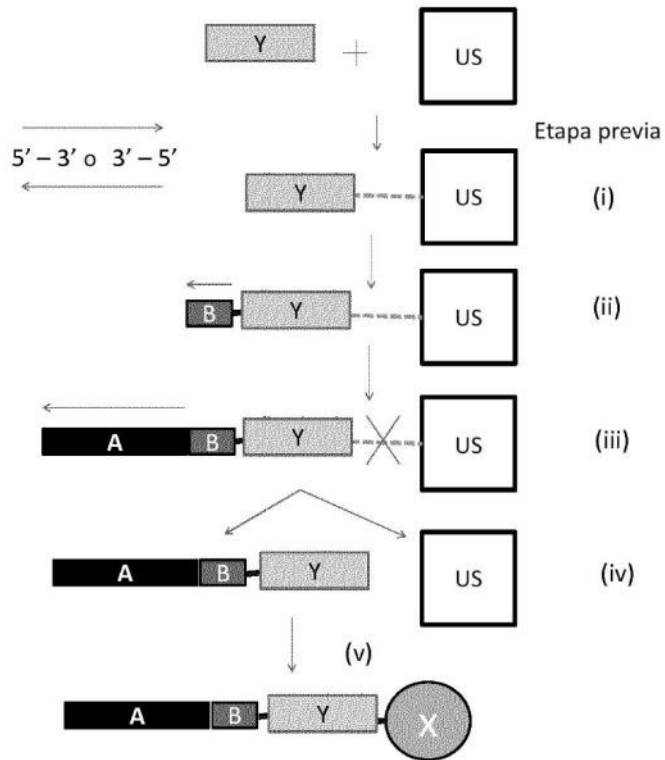


Figura 7

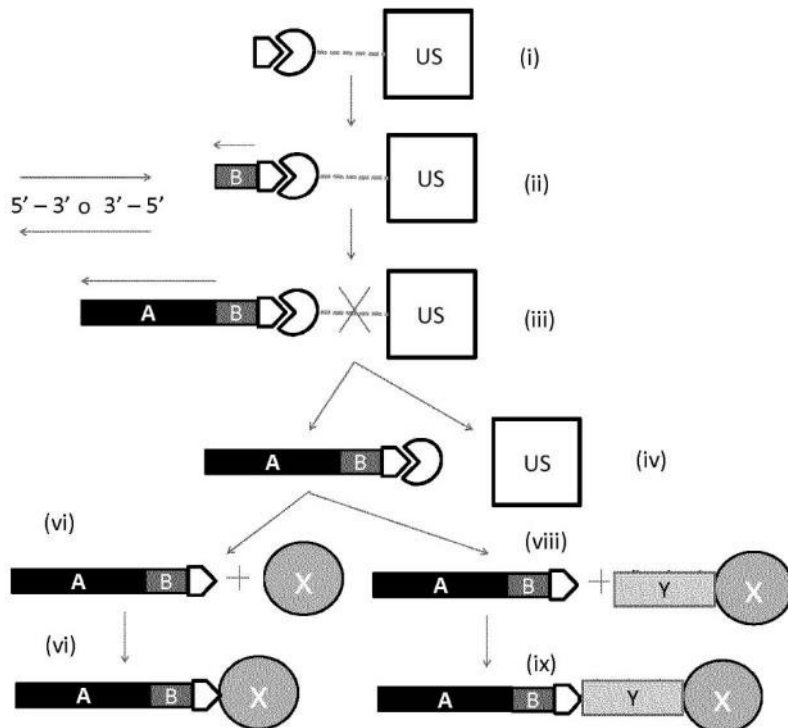


Figura 8

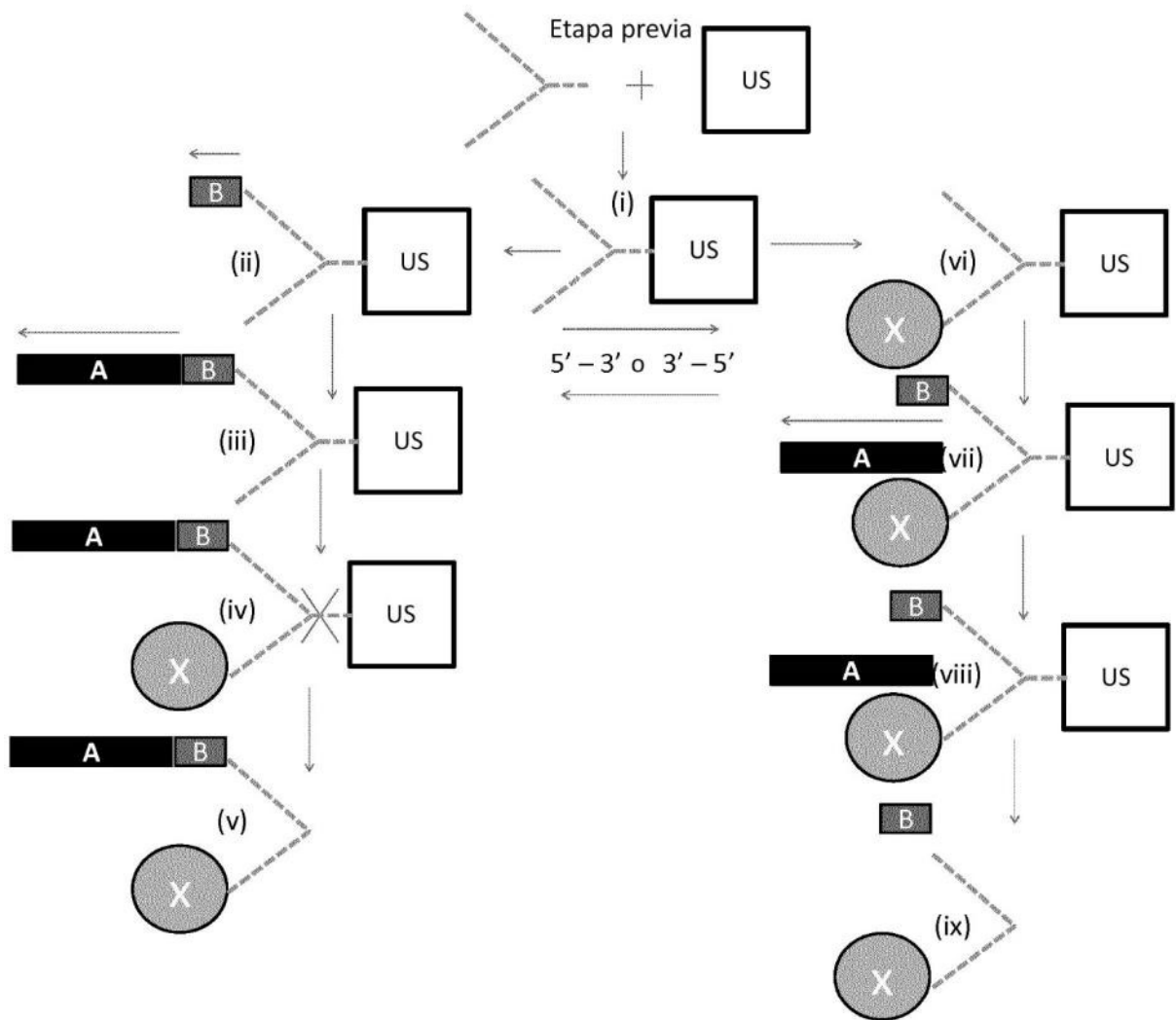


Figura 9

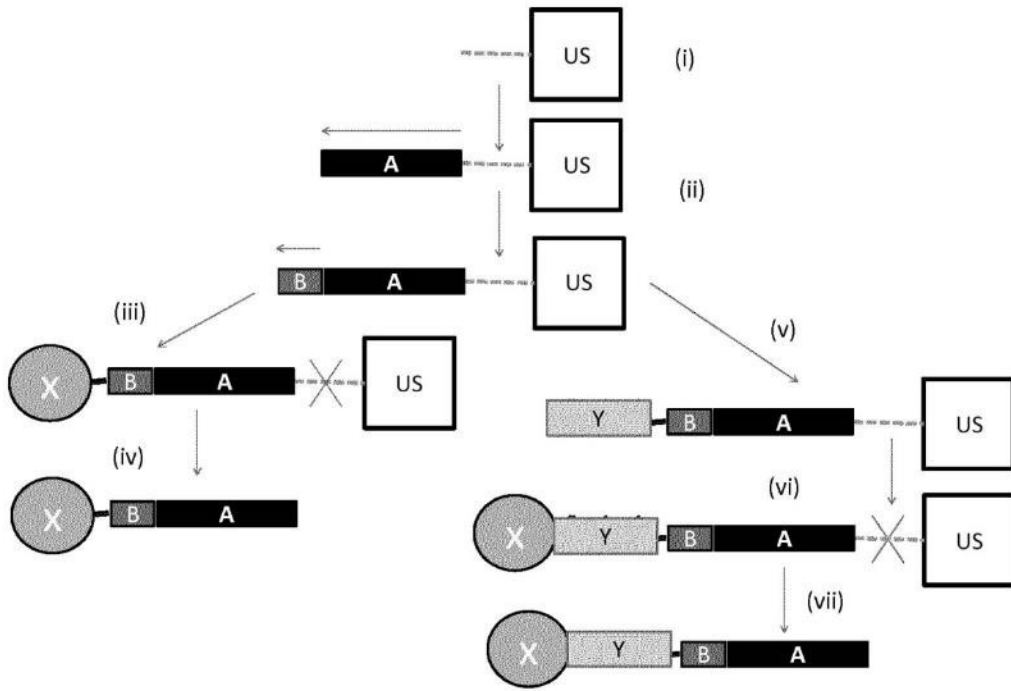


Figura 10

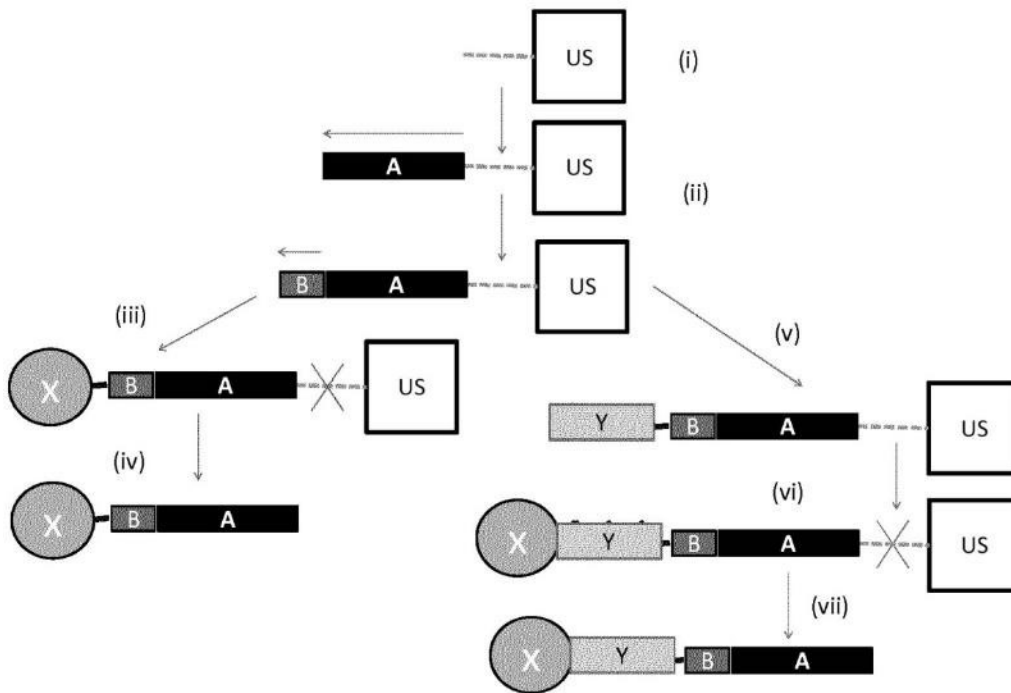


Figura 11

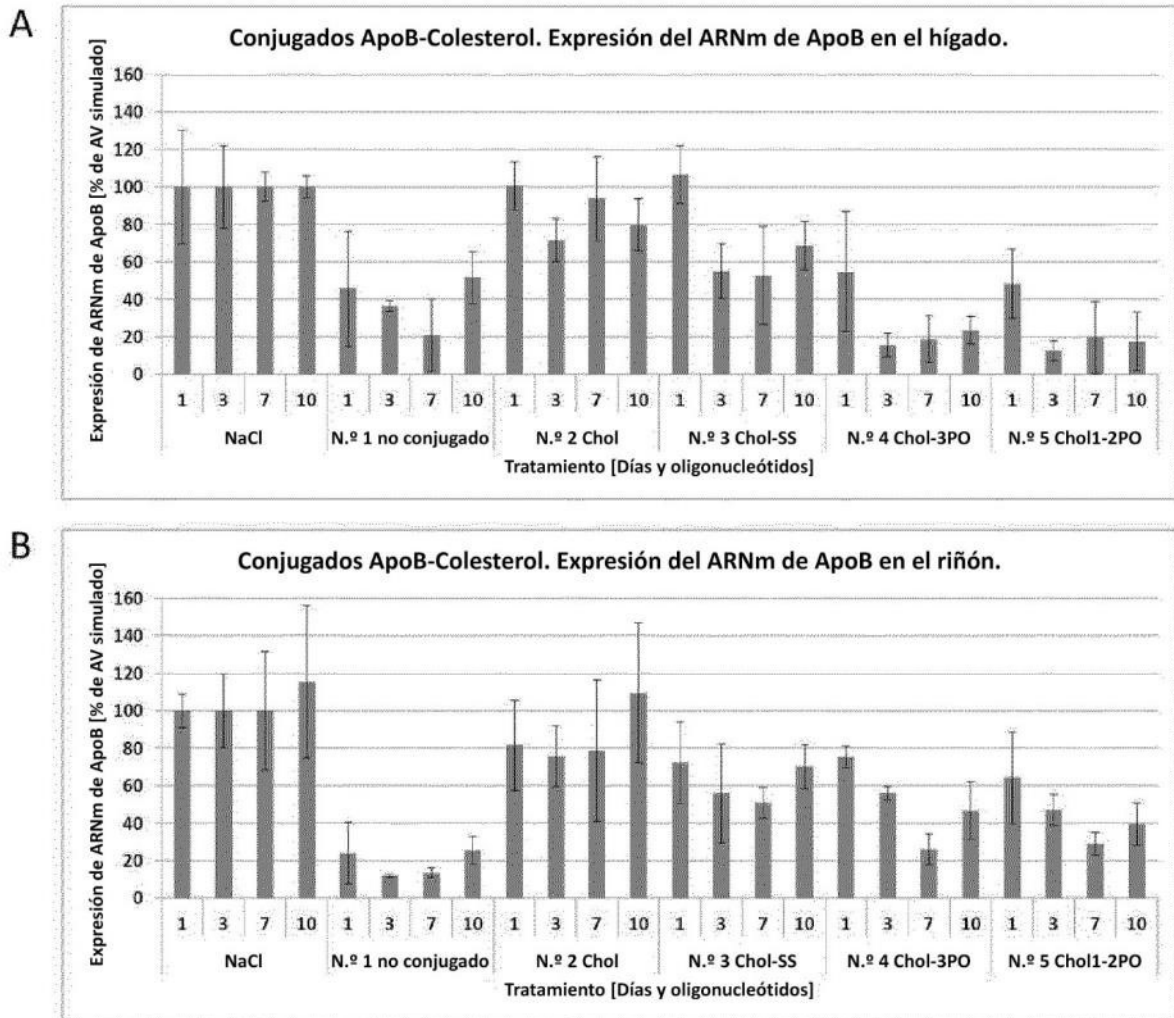
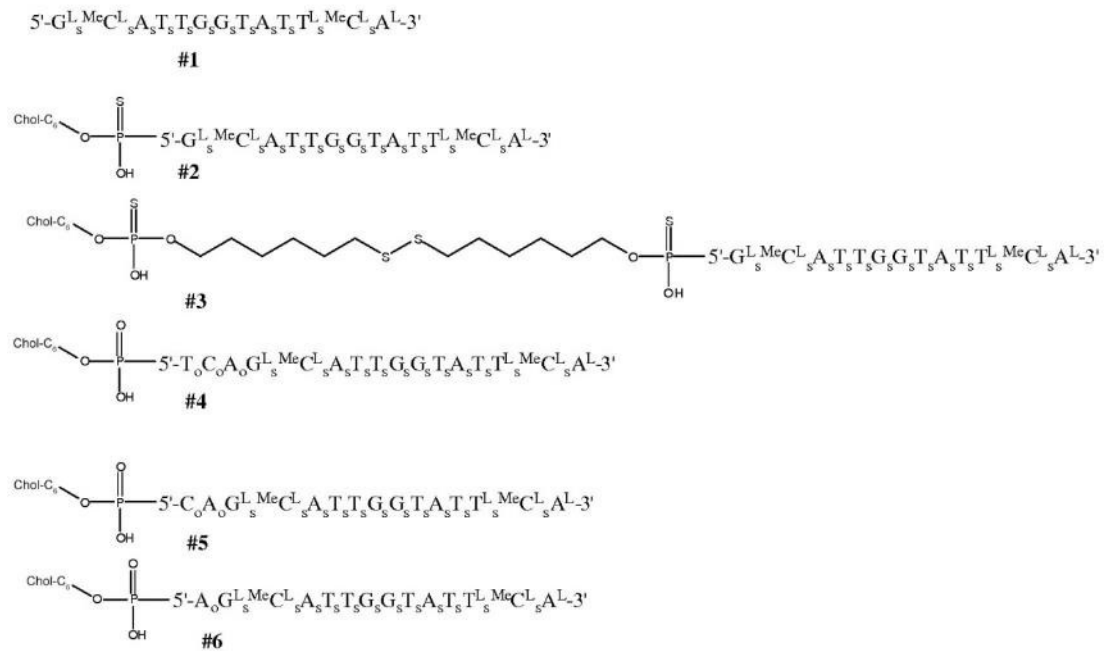


Figura 12





#7



#8



#9



#10



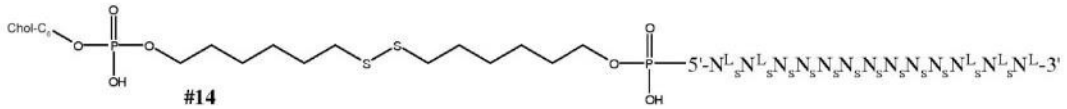
#11



#12



#13



#14



#15



#16



#17



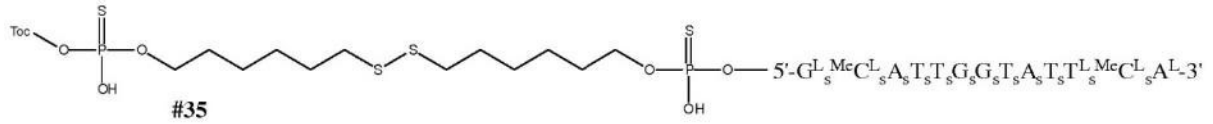
#18



#19



#20



5'-T^L_sG^L_sMeC^L_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sC_sMeC^L_sMeC^L_sA^L-3'
SEQ ID 37

5'-A^L_sA^L_sT^L_sG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sMeC^L_sMeC^L_sMeC^L_sA^L-3'
SEQ ID 38

5'-A^L_sA^L_sT^L_sG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sC_sMeC^L_sMeC^L_sA^L-3'
SEQ ID 39

5'-G^L_sMeC^L_sT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT_sG^L_sG^L-3'
SEQ ID 40

5'-T^L_sG^L_sC_sT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT^L_sG^L_sG^L-3'
SEQ ID 41

5'-T^L_sG^L_sMeC^L_sT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT^L_sG^L_sG^L-3'
SEQ ID 42

5'-T^L_sMeC^L_sMeC^L_sT_sG_sT_sC_sT_sG_sT_sG_sT^L_sMeC^L_sMeC^L_s-3'
SEQ ID 43

5'-T^L_sMeC^L_sMeC^L_sT_sG_sT_sC_sT_sG_sT_sG_sT^L_sMeC^L_sMeC^L_s-3'
SEQ ID 44



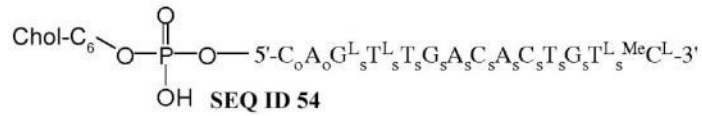
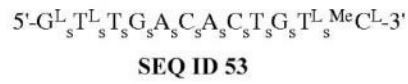
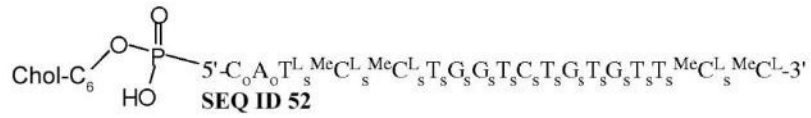
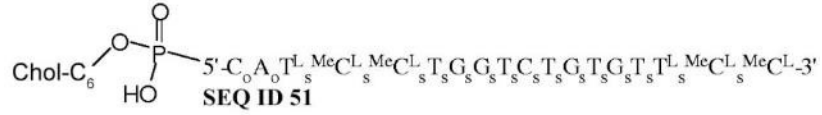
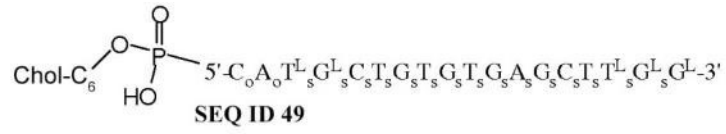
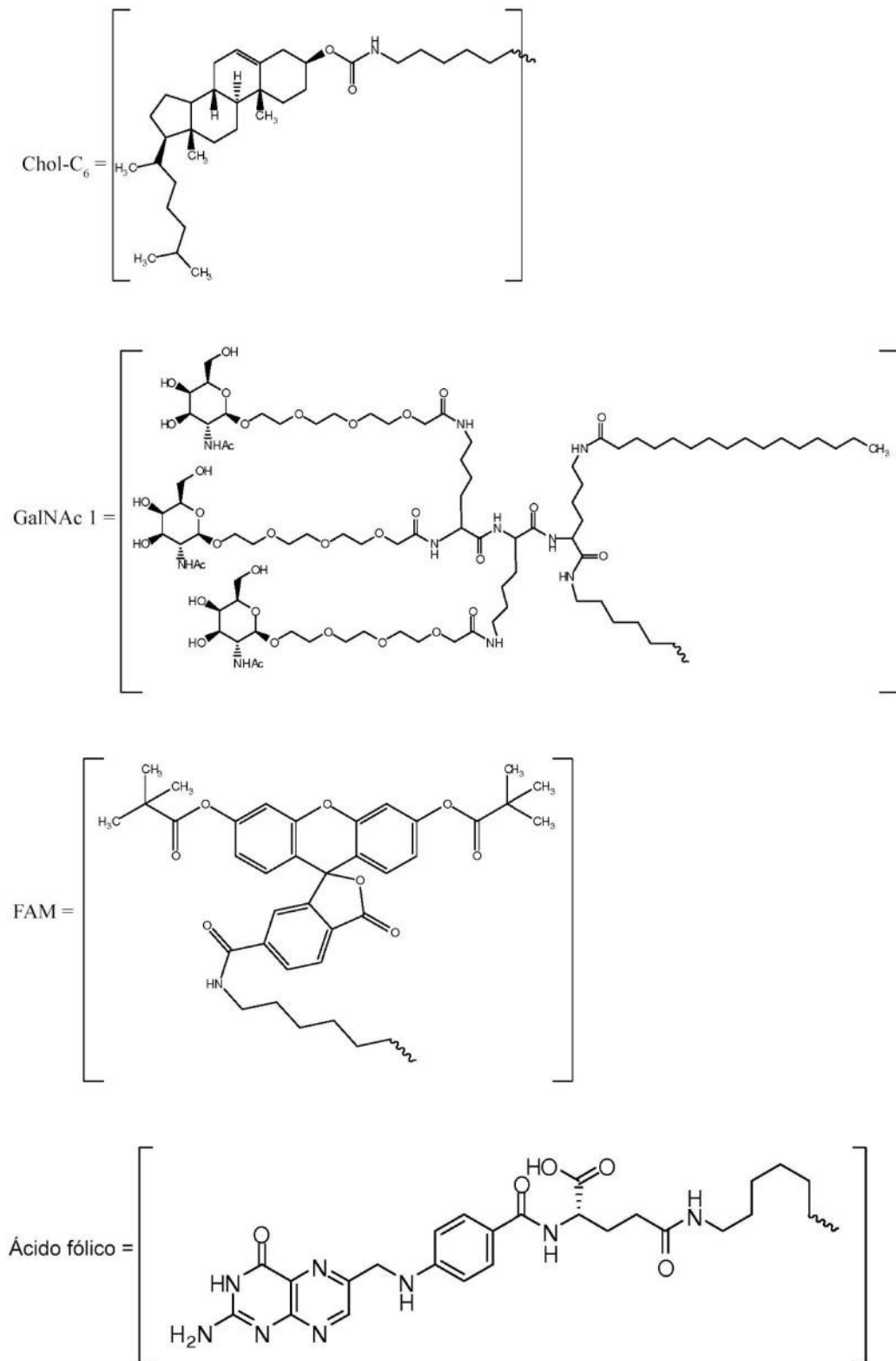


Figura 13



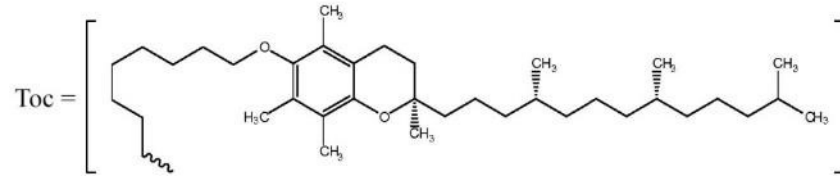
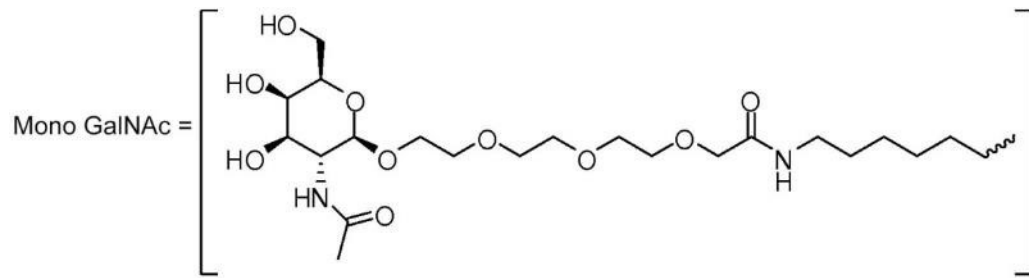
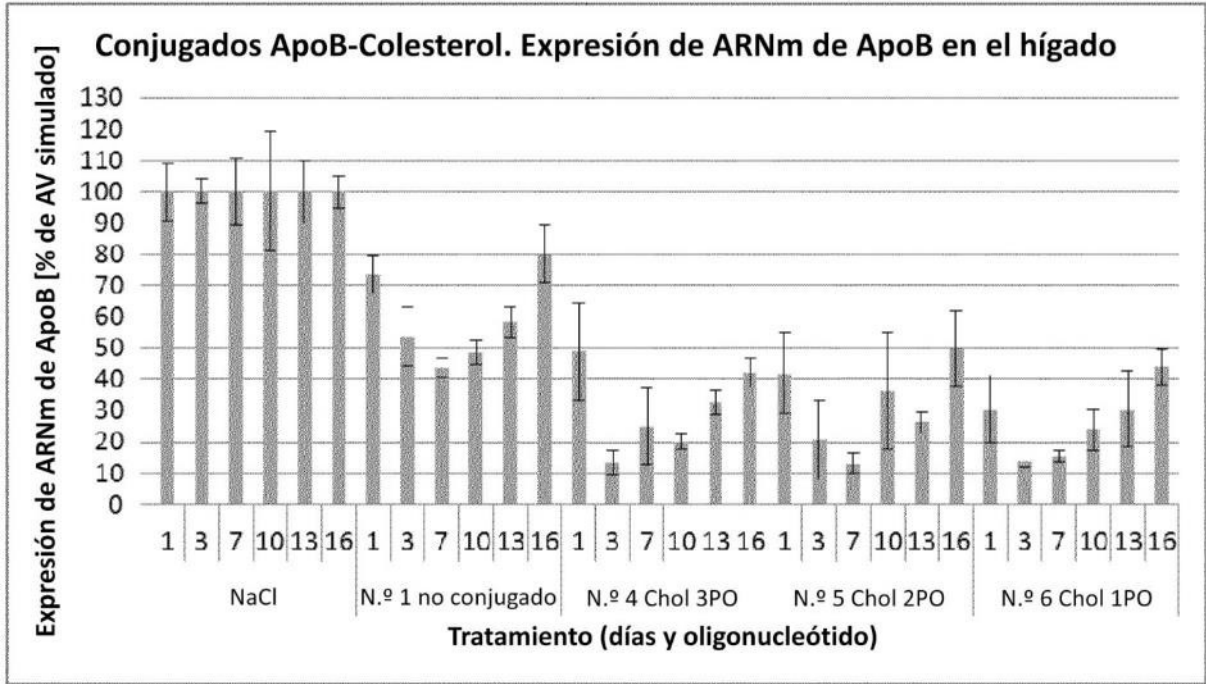


Figura 14

A



B

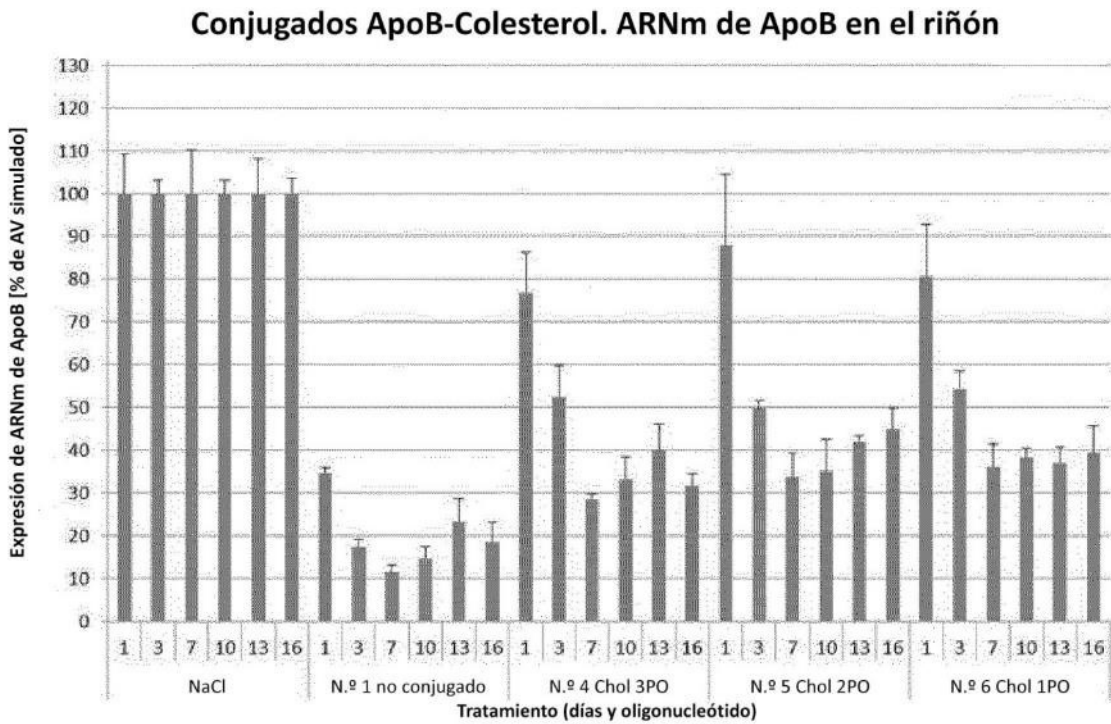
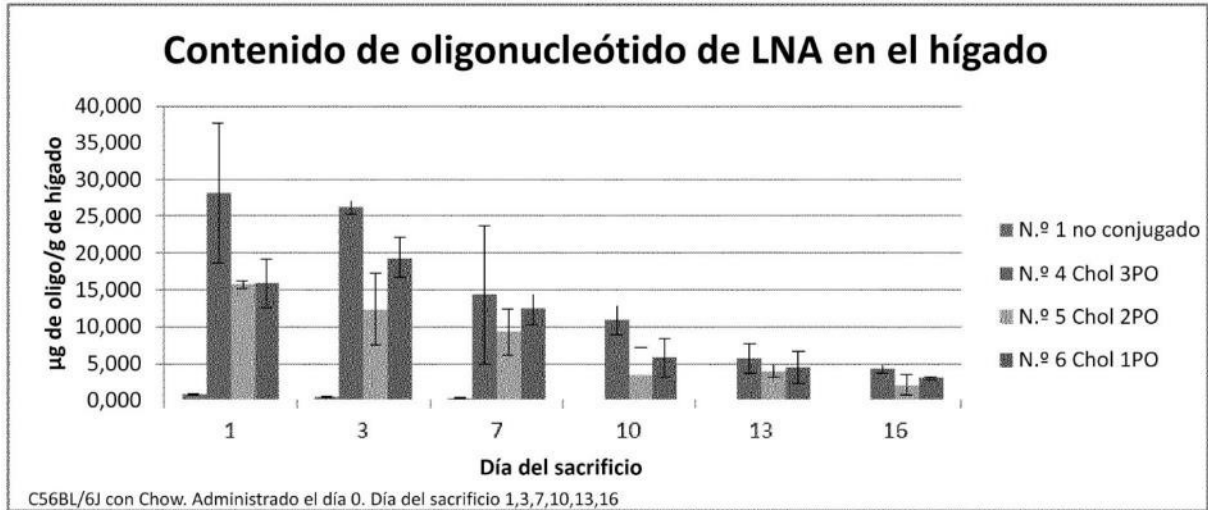


Figura 15

A



B

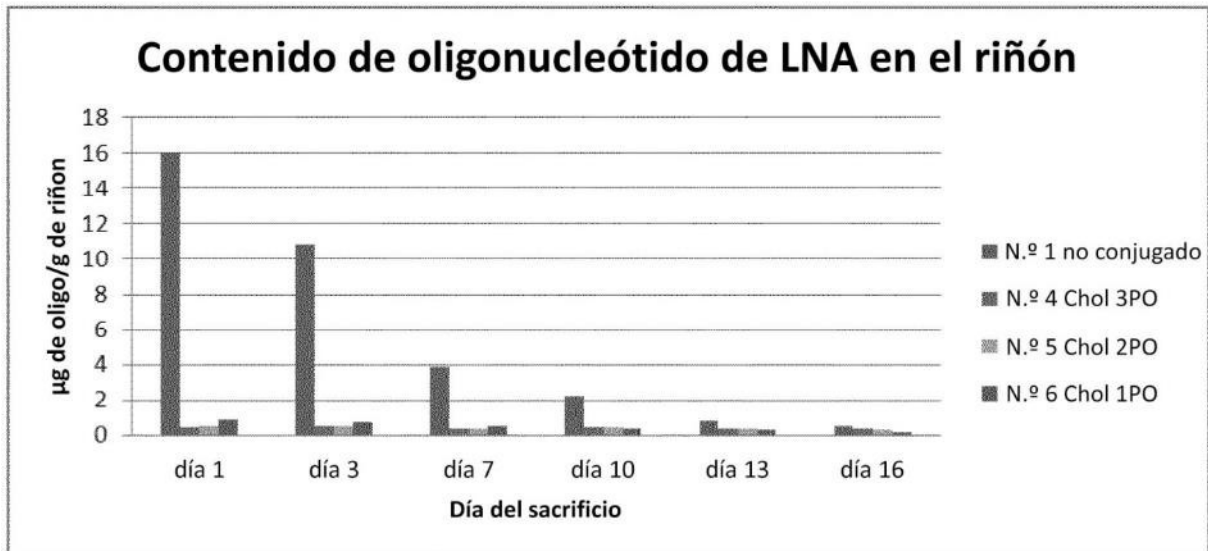
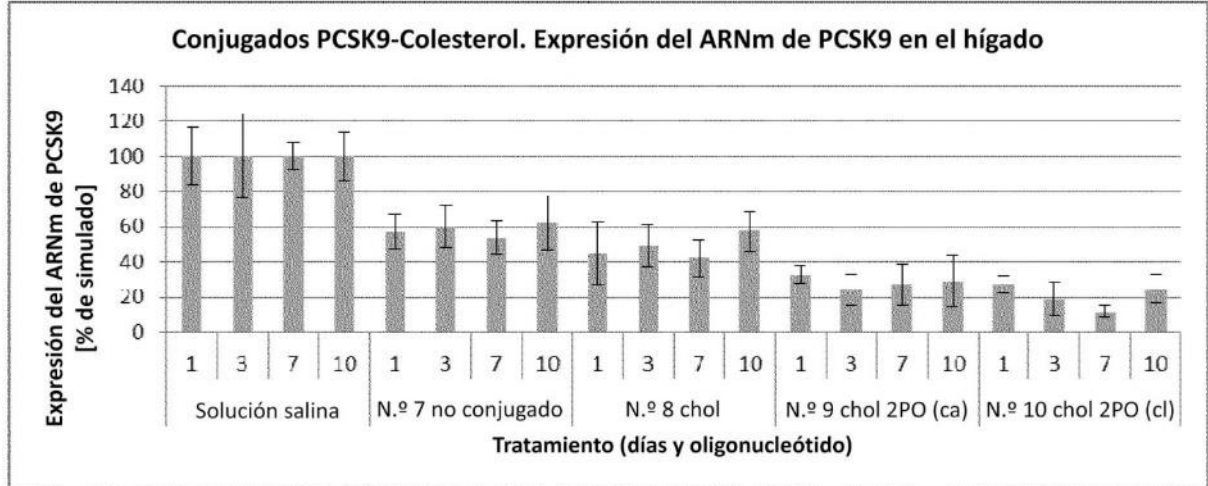


Figura 16

A



B

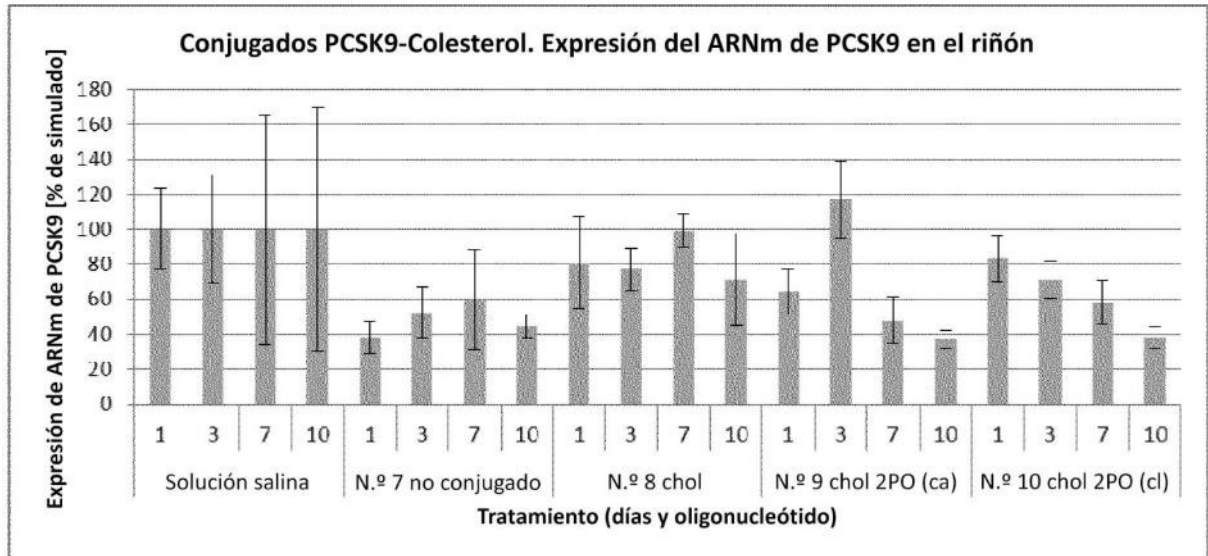
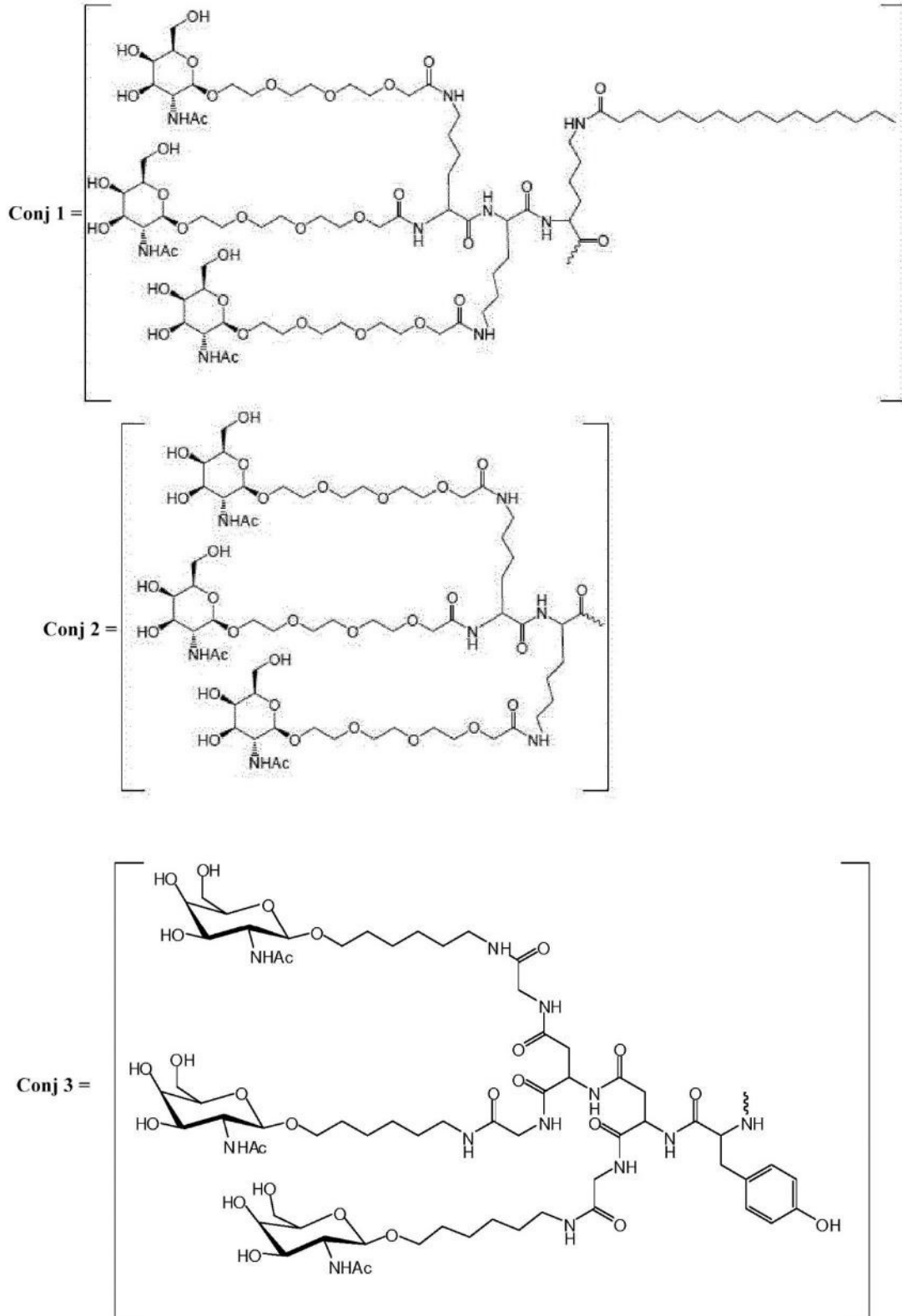
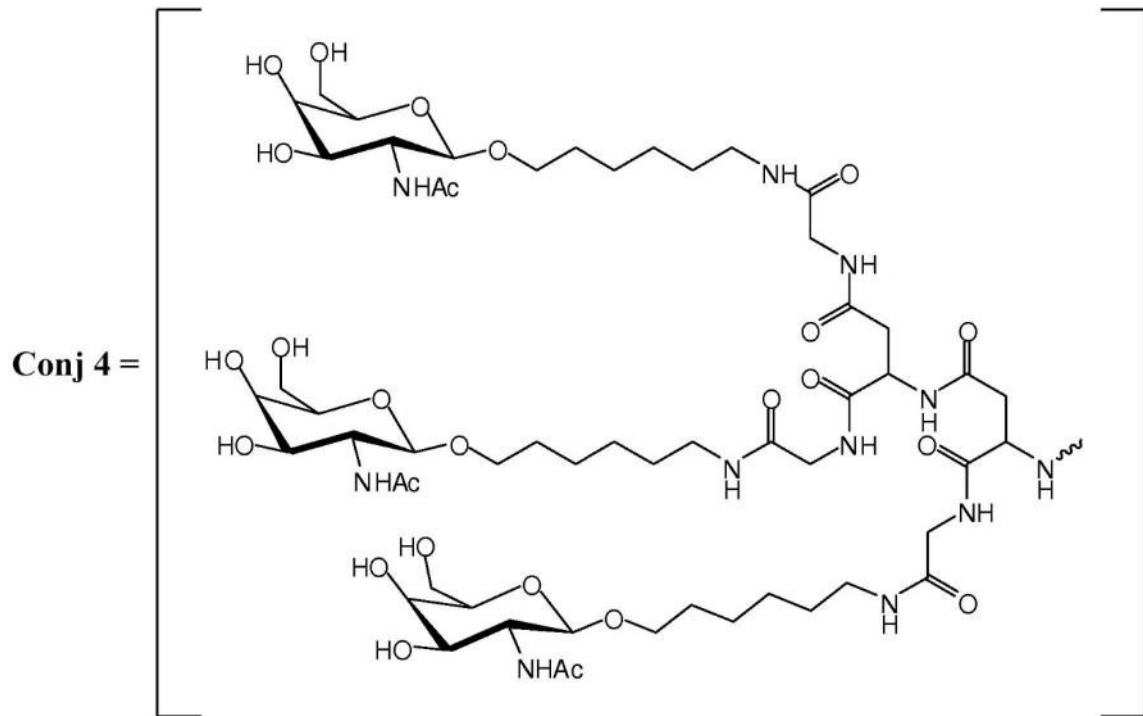
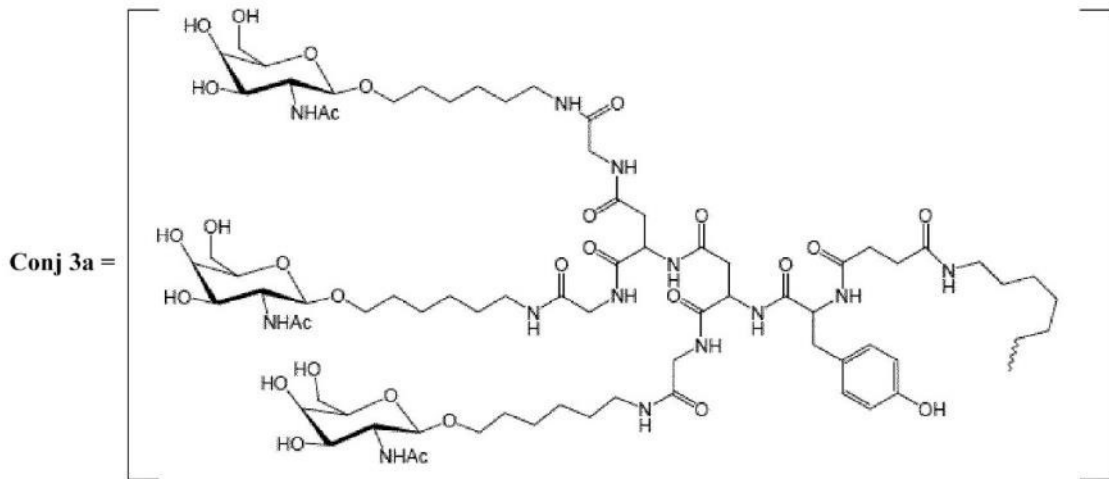
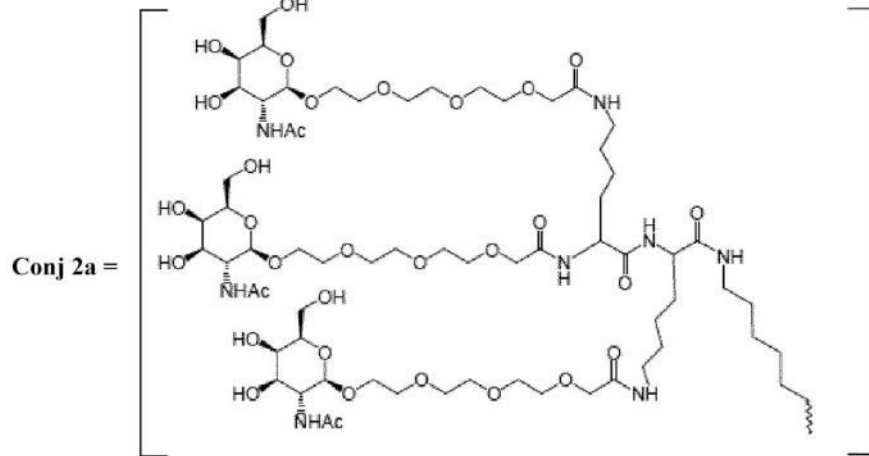
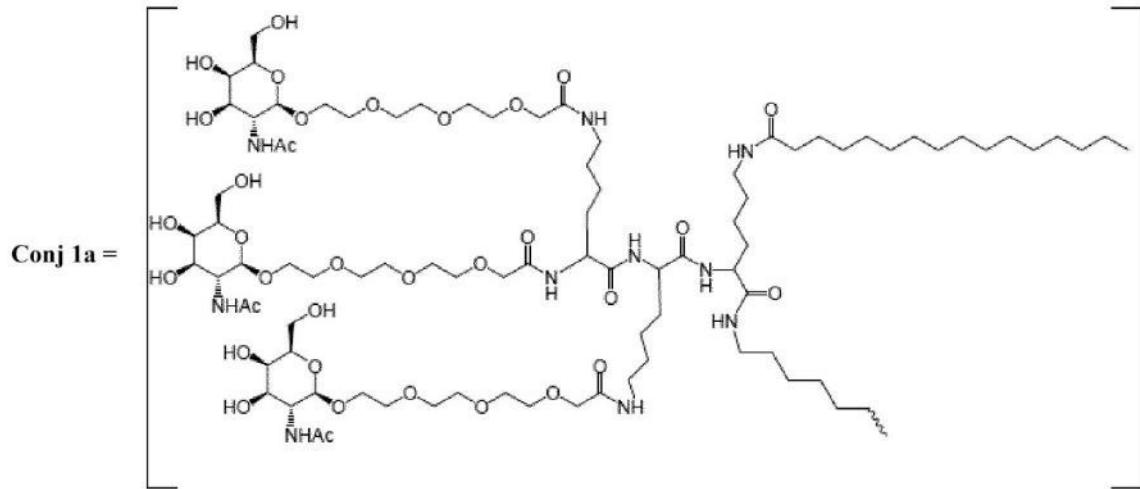


Figura 17







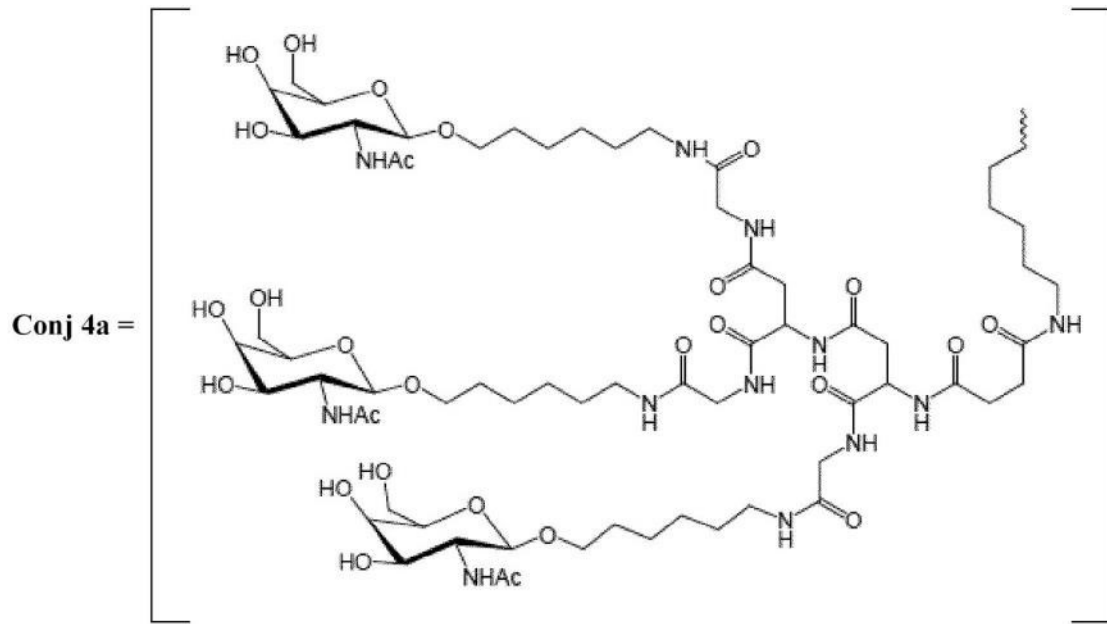


Figura 18

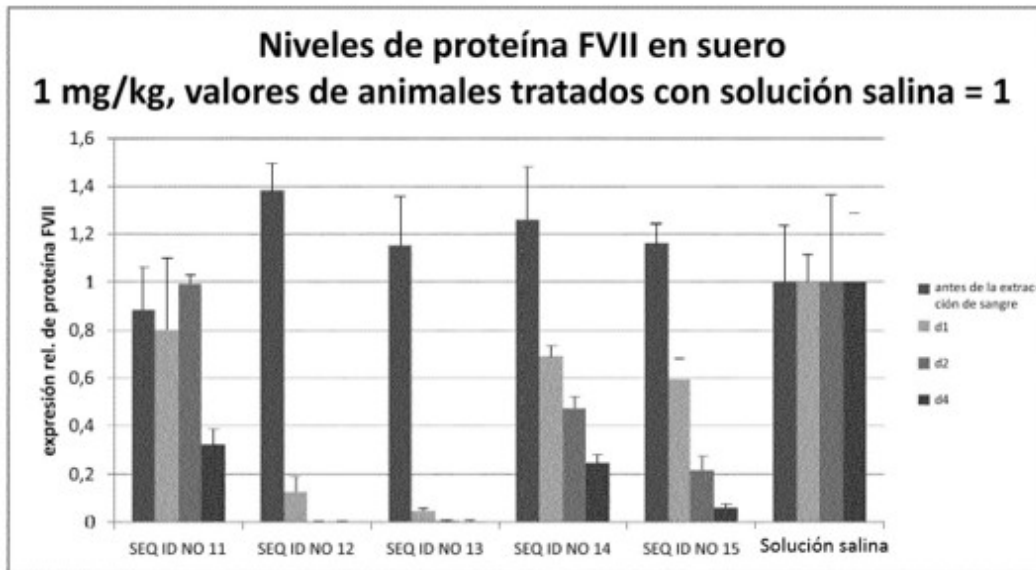


Figura 19

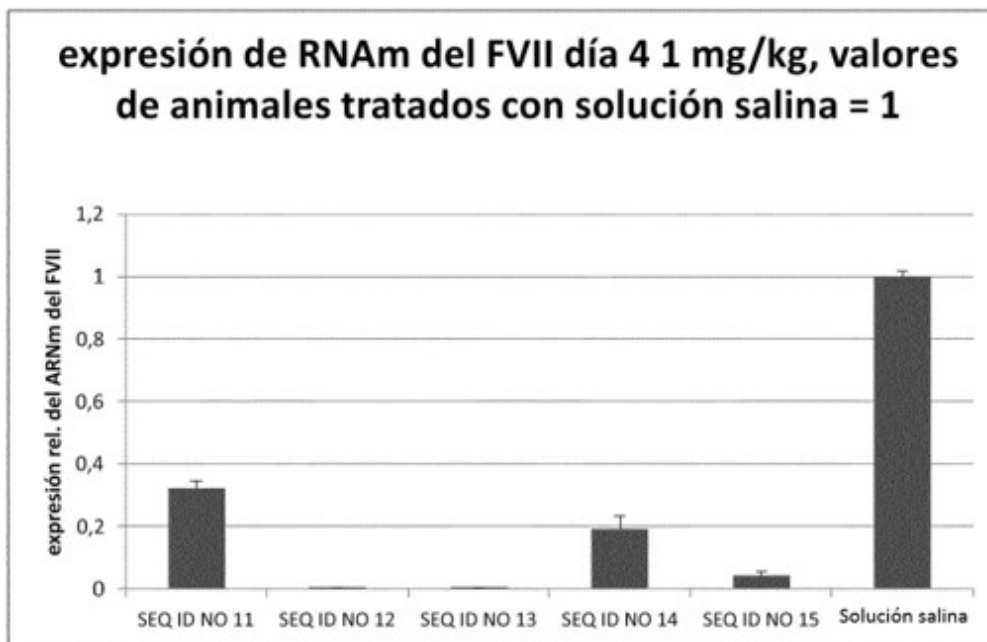


Figura 20

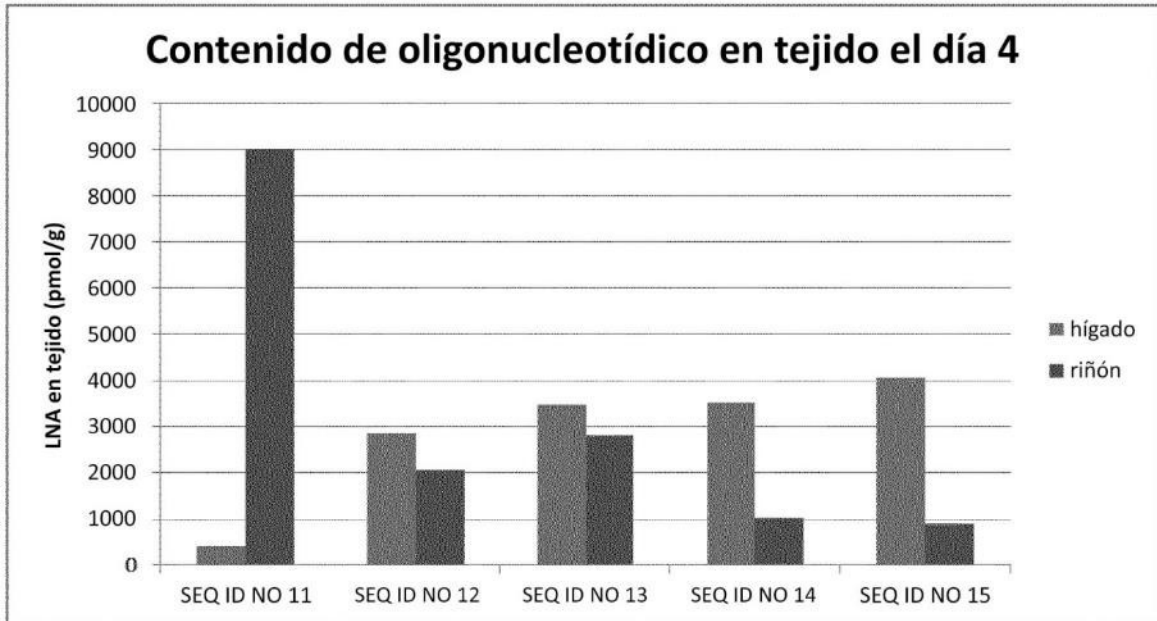


Figura 21

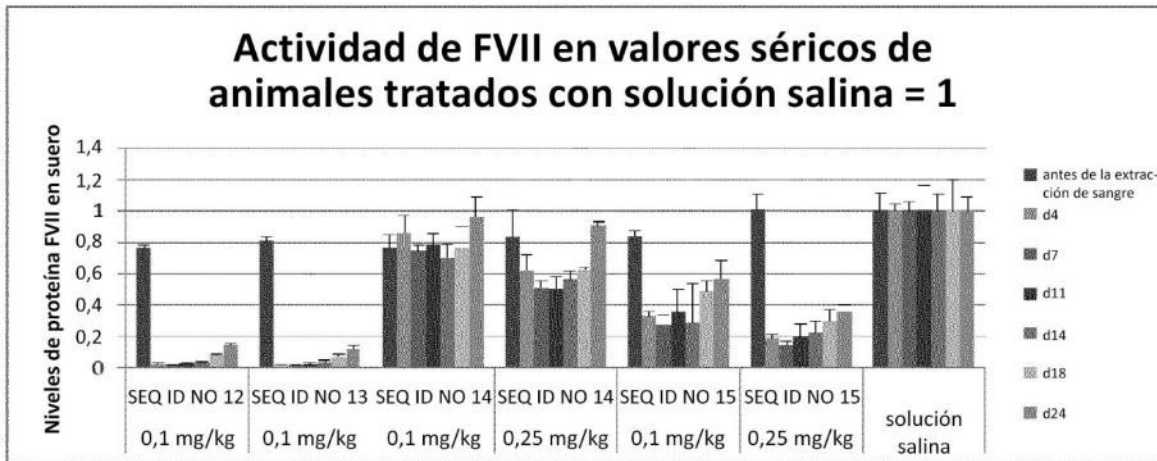


Figura 22

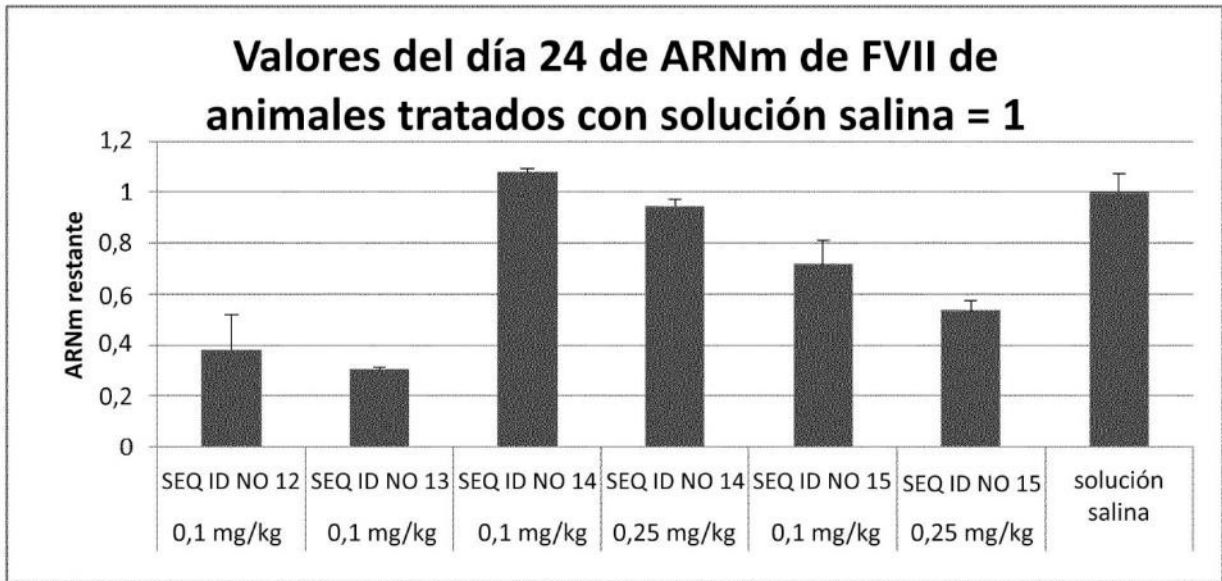


Figura 23

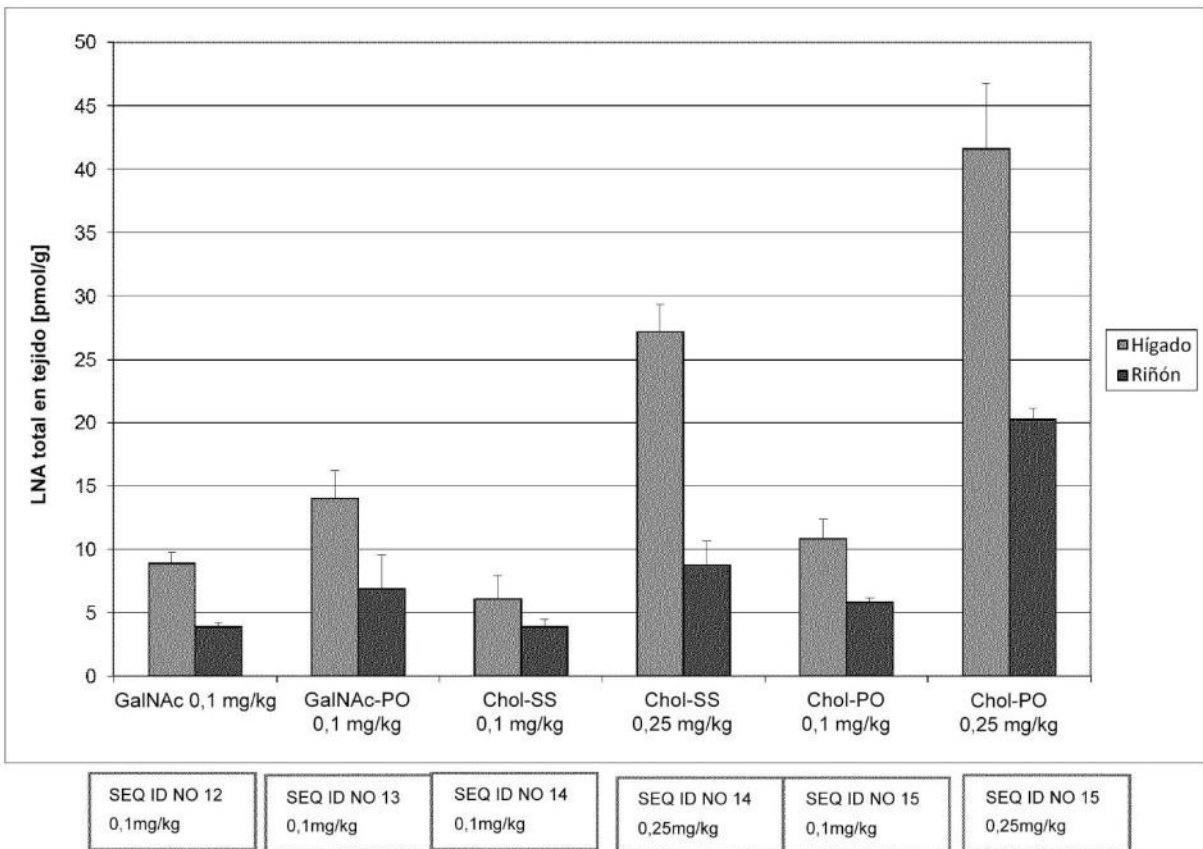
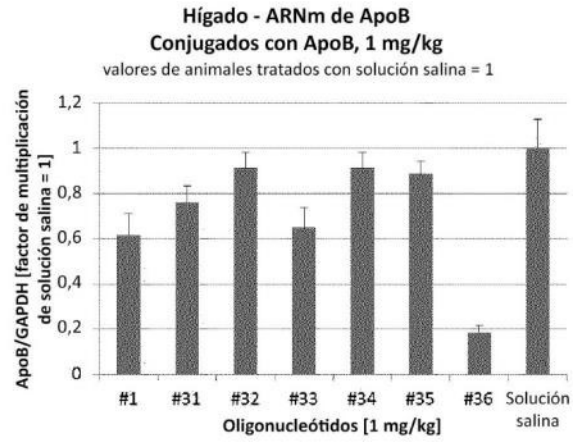
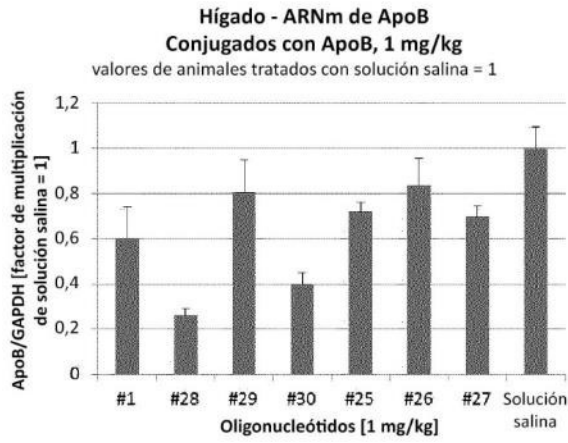


Figura 24

A



B

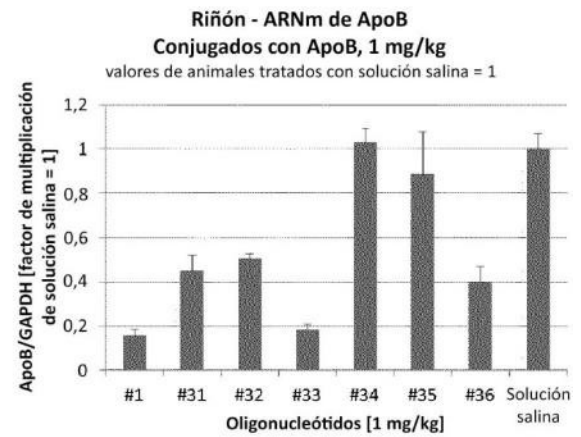
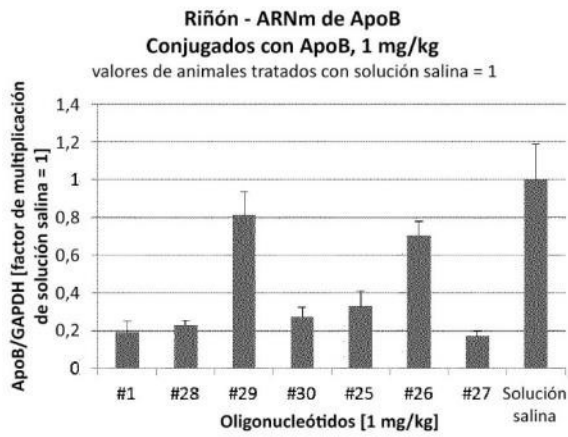


Figura 25

