

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 015**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2014 PCT/US2014/036463**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14179627**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2014 E 14791344 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2992098**

54 Título: **Composiciones y métodos para modular expresión de HBV y de TTR**

30 Prioridad:

01.05.2013 US 201361818442 P

15.05.2013 US 201361823826 P

08.07.2013 US 201361843887 P

29.08.2013 US 201361871673 P

20.09.2013 US 201361880790 P

08.04.2014 US 201461976991 P

30.04.2014 US 201461986867 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2019

73 Titular/es:

IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

2855 Gazelle Court

Carlsbad, CA 92010 , US

72 Inventor/es:

PRAKASH, THAZHA, P.;

SETH, PUNIT, P. y

SWAYZE, ERIC, E.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 730 015 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para modular expresión de HBV y de TTR

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

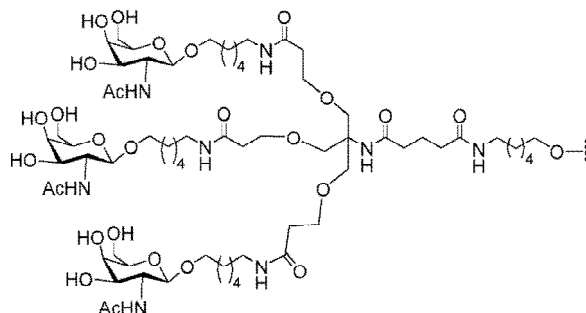
[0001] El principio detrás de la tecnología antisentido es que un compuesto antisentido se hibrida con un ácido nucleico diana y modula la cantidad, actividad y/o función del ácido nucleico diana. Por ejemplo, en ciertos casos, los compuestos antisentido resultan en una transcripción o traducción alterada de una diana. Dicha modulación de la expresión se puede lograr, por ejemplo, mediante la degradación del ARNm diana o la inhibición basada en la ocupación. Un ejemplo de modulación de la función diana del ARN por degradación es la degradación basada en RNasa H del ARN diana tras la hibridación con un compuesto antisentido similar al ADN. Otro ejemplo de modulación de la expresión génica por degradación de dianas es la interferencia de ARN (ARNi). ARNi se refiere al silenciamiento génico mediado por antisentido a través de un mecanismo que utiliza el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Un ejemplo adicional de modulación de la función diana del ARN es mediante un mecanismo basado en la ocupación, tal como se emplea de forma natural mediante microARN. Los microARN son pequeños ARN no codificantes que regulan la expresión de los ARN codificantes de proteínas. La unión de un compuesto antisentido a un microARN evita que el microARN se una a sus dianas de ARN mensajero, y por lo tanto interfiere con la función del microARN. Los imitadores de microARN pueden mejorar la función del microARN nativo. Ciertos compuestos antisentido alteran el corte y empalme del pre-ARNm. Independientemente del mecanismo específico, la especificidad de secuencia hace que los compuestos antisentido sean atractivos como herramientas para la validación de dianas y la funcionalización de genes, así como los agentes terapéuticos para modular selectivamente la expresión de genes involucrados en la patogenia de las enfermedades.

[0002] La tecnología antisentido es un medio eficaz para modular la expresión de uno o más productos génicos específicos y, por lo tanto, puede resultar singularmente útil en varias aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. Los nucleósidos modificados químicamente pueden incorporarse en compuestos antisentido para mejorar una o más propiedades, como la resistencia a la nucleasa, la farmacocinética o la afinidad por un ácido nucleico diana. En 1998, el compuesto antisentido, Vitravene® (fomivirsén; desarrollado por Isis Pharmaceuticals Inc., Carlsbad, CA) fue el primer fármaco antisentido que logró la aprobación comercial de la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (FDA), y actualmente es un tratamiento de la retinitis inducida por citomegalovirus (CMV) en pacientes con SIDA.

[0003] Las nuevas modificaciones químicas han mejorado la potencia y la eficacia de los compuestos antisentido, descubriendo el potencial para la administración oral y mejorando la administración subcutánea, disminuyendo el potencial de efectos secundarios y conduciendo a mejoras en la conveniencia del paciente. Las modificaciones químicas que aumentan la potencia de los compuestos antisentido permiten la administración de dosis más bajas, lo que reduce el potencial de toxicidad, así como la disminución del costo general de la terapia. Las modificaciones que aumentan la resistencia a la degradación provocan una eliminación más lenta del cuerpo, lo que permite una dosificación menos frecuente. Se pueden combinar diferentes tipos de modificaciones químicas en un compuesto para optimizar aún más la eficacia del compuesto.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] La presente invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, en el que el oligonucleótido modificado consta de 12 a 30 nucleósidos unidos y tiene una secuencia de nucleobases al menos el 85% complementaria a SEQ ID NO: 1 que codifica el virus de la hepatitis B (HBV), y en el que el grupo conjugado comprende:



[0005] La presente invención también proporciona una composición que comprende el compuesto de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona el compuesto o la composición de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección relacionada con el VHB.

La presente invención también proporciona el compuesto o la composición de la invención para uso en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o afección relacionada con el VHB en un sujeto, en el que la enfermedad, trastorno o afección es ictericia, inflamación del hígado, hígado. fibrosis, inflamación, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, cáncer de hígado, enfermedad inflamatoria hepatocelular difusa, síndrome hemofagocítico, hepatitis sérica, viremia por VHB o trasplante relacionado con enfermedad hepática.

La presente invención también proporciona el compuesto o la composición de la invención para uso en la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de antígeno de HBV en un sujeto infectado con HBV.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

[0007] En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona compuestos antisentido conjugados. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona compuestos antisentido conjugados que comprenden un oligonucleótido antisentido complementario a un transcrito de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos que comprenden poner en contacto una célula con un compuesto antisentido conjugado que comprende un oligonucleótido antisentido complementario a un transcrito de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos que comprenden poner en contacto una célula con un compuesto antisentido conjugado que comprende un oligonucleótido antisentido y reducir la cantidad o actividad de un transcrito de ácido nucleico en una célula.

[0008] El receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R) se ha descrito anteriormente. Ver, por ejemplo, Park et al., PNAS vol. 102, N° 47, pp 17125-17129 (2005). Dichos receptores se expresan en las células hepáticas, particularmente en los hepatocitos. Además, se ha demostrado que los compuestos que comprenden grupos de tres ligandos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) son capaces de unirse a la ASGP-R, dando como resultado la absorción del compuesto en la célula. Ver, por ejemplo, Khorev et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, pp 5216-5231 (mayo de 2008). Por consiguiente, los conjugados que comprenden tales agrupaciones de GalNAc se han usado para facilitar la captación de ciertos compuestos en células hepáticas, específicamente hepatocitos. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertos conjugados que contienen GalNAc aumentan la actividad de los compuestos de ARNip dúplex en células hepáticas in vivo. En tales casos, el conjugado que contiene GalNAc está unido típicamente a la cadena de sentido del dúplex de siRNA. Dado que la cadena con sentido se desecha antes de que la cadena antisentido finalmente se hibride con el ácido nucleico diana, existe poca preocupación de que el conjugado interfiera con la actividad. Típicamente, el conjugado está unido al extremo 3' de la cadena con sentido del ARNsi. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 8,106,022, Ciertos grupos conjugados descritos en el presente documento son más activos y/o más fáciles de sintetizar que los grupos conjugados descritos anteriormente.

[0009] En ciertas realizaciones de la presente divulgación, los conjugados se unen a compuestos antisentido monocatenarios, que incluyen, pero no se limitan a, compuestos antisentido basados en ARNasa H y compuestos antisentido que alteran el corte y empalme de un ácido nucleico diana pre-ARNm. En tales realizaciones, el conjugado debe permanecer unido al compuesto antisentido el tiempo suficiente para proporcionar un beneficio (captación mejorada en las células), pero luego debe ser escindido o, de lo contrario, no interferir con los pasos subsiguientes necesarios para la actividad, como la hibridación a ácido nucleico diana e interacción con RNasa H o enzimas asociadas con el empalme o la modulación de empalme. Este equilibrio de propiedades es más importante en el establecimiento de compuestos antisentido de una sola hebra en los compuestos de ARNsi, donde el conjugado puede estar simplemente unido a la hebra con sentido. En este documento se describen compuestos antisentido de cadena sencilla conjugados que tienen una potencia mejorada en células hepáticas in vivo en comparación con el mismo compuesto antisentido que carece del conjugado. Dado el balance requerido de propiedades para estos compuestos, tal potencia mejorada es sorprendente.

[0010] En ciertas realizaciones, los grupos conjugados en el presente documento comprenden un resto escindible. Como se señaló, sin desear estar limitado por un mecanismo, es lógico que el conjugado permanezca en el compuesto el tiempo suficiente para proporcionar un aumento en la captación, pero después de eso, es deseable para alguna parte o, idealmente, todo el conjugado para ser escindido, liberando el compuesto de origen (por ejemplo, compuesto antisentido) en su forma más activa. En ciertas realizaciones, el resto escindible es un nucleósido escindible. Dichas realizaciones aprovechan las nucleasas endógenas en la célula uniendo el resto del conjugado (el grupo) al oligonucleótido antisentido a través de un nucleósido a través de uno o más enlaces escindibles, como los de un enlace fosfodiéster. En ciertas realizaciones, el grupo se une al nucleósido escindible a través de un enlace fosfodiéster. En ciertas realizaciones, el nucleósido escindible está unido al oligonucleótido antisentido (compuesto antisentido) mediante un enlace fosfodiéster. En ciertas realizaciones, el grupo conjugado puede comprender dos o tres nucleósidos escindibles. En tales realizaciones, tales nucleósidos escindibles están unidos entre sí, al compuesto antisentido y/o al grupo a través de enlaces escindibles (tales como los de un enlace fosfodiéster). Ciertos conjugados en este documento no comprenden un nucleósido escindible y en su lugar comprenden un enlace escindible. Se muestra que la suficiente escisión del conjugado del oligonucleótido es proporcionada por al menos un enlace que es vulnerable a la escisión en la célula (un enlace escindible).

[0011] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados son profármacos. Tales profármacos se administran a un animal y, en última instancia, se metabolizan a una forma más activa. Por ejemplo, los compuestos antisentido conjugados se escinden para eliminar todo o parte del conjugado dando como resultado la forma activa

(o más activa) del compuesto antisentido que carece de todo o parte del conjugado.

[0012] En ciertas realizaciones, los conjugados están unidos en el extremo 5' de un oligonucleótido. Ciertos tales conjugados 5' se escinden más eficientemente que las contrapartes que tienen un grupo conjugado similar unido en el extremo 3'. En ciertas realizaciones, la actividad mejorada puede correlacionarse con una escisión mejorada. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado en el extremo 5' tienen mayor eficacia que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado en el extremo 3' (ver, por ejemplo, los Ejemplos 56, 81, 83 y 84). Además, la unión 5' permite una síntesis de oligonucleótidos más simple. Típicamente, los oligonucleótidos se sintetizan en un soporte sólido en la dirección 3' a 5'. Para hacer un oligonucleótido conjugado en 3', por lo general, uno une un nucleósido 3' pre-conjugado al soporte sólido y luego construye el oligonucleótido como de costumbre. Sin embargo, la unión de ese nucleósido conjugado al soporte sólido agrega complicación a la síntesis. Además, utilizando ese enfoque, el conjugado está presente a lo largo de la síntesis del oligonucleótido y puede degradarse durante los pasos subsiguientes o puede limitar el tipo de reacciones y reactivos que se pueden usar. Usando las estructuras y técnicas descritas en el presente documento para oligonucleótidos conjugados en 5', se puede sintetizar el oligonucleótido usando técnicas automatizadas estándar e introducir el conjugado con el nucleósido final (la mayoría de los 5') o después de que el oligonucleótido se haya separado del soporte sólido.

[0013] En vista de la técnica y la presente descripción, un experto en la materia puede hacer fácilmente cualquiera de los conjugados y oligonucleótidos conjugados en el presente documento. Además, la síntesis de ciertos conjugados y oligonucleótidos conjugados descritos en este documento es más fácil y/o requiere pocos pasos y, por lo tanto, es menos costosa que la de los conjugados descritos anteriormente, lo que proporciona ventajas en la fabricación. Por ejemplo, la síntesis de ciertos grupos conjugados consiste en menos pasos sintéticos, lo que resulta en un mayor rendimiento, en relación con los grupos conjugados descritos anteriormente. Los grupos de conjugados como GalNAc3-10 en el Ejemplo 46 y GalNAc3-7 en el Ejemplo 48 son mucho más simples que los conjugados descritos anteriormente, como los descritos en los documentos US 8,106,022 o US 7,262,177 que requieren el ensamblaje de más intermedios químicos. Por consiguiente, estos y otros conjugados descritos en el presente documento tienen ventajas sobre los compuestos descritos previamente para su uso con cualquier oligonucleótido, incluidos los oligonucleótidos monocatenarios y cualquiera de las cadenas de oligonucleótidos bicatenarios (por ejemplo, ARNip).

[0014] De manera similar, en el presente documento se describen grupos conjugados que tienen solo uno o dos ligandos de GalNAc. Como se muestra, tales grupos de conjugados mejoran la actividad de compuestos antisentido. Tales compuestos son mucho más fáciles de preparar que los conjugados que comprenden tres ligandos de GalNAc. Los grupos conjugados que comprenden uno o dos ligandos de GalNAc pueden unirse a cualquier compuesto antisentido, incluidos los oligonucleótidos monocatenarios y cualquiera de las cadenas de oligonucleótidos bicatenarios (por ejemplo, siRNA).

[0015] En ciertas realizaciones, los conjugados en el presente documento no alteran sustancialmente ciertas medidas de tolerabilidad. Por ejemplo, se muestra aquí que los compuestos antisentido conjugados no son más inmunogénicos que los compuestos originales no conjugados. Dado que se mejora la potencia, las realizaciones en las que la tolerabilidad sigue siendo la misma (o incluso si la tolerabilidad empeora solo ligeramente en comparación con las ganancias en la potencia) tienen propiedades mejoradas para la terapia.

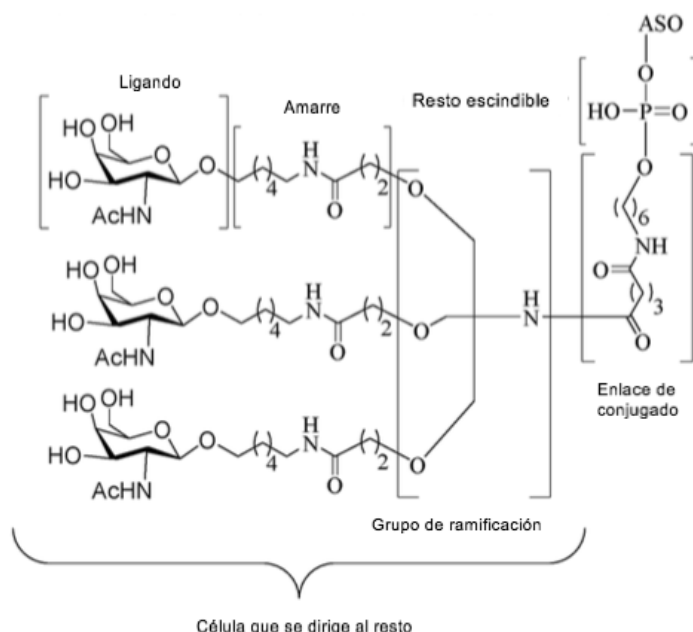
[0016] En ciertas realizaciones, la conjugación permite alterar compuestos antisentido de manera que tienen consecuencias menos atractivas en ausencia de conjugación. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, reemplazar uno o más enlaces de fosforotioato de un compuesto antisentido completamente fosforotioato con enlaces de fosfodiéster da como resultado una mejora en algunas medidas de tolerabilidad. Por ejemplo, en ciertos casos, tales compuestos antisentido que tienen uno o más fosfodiésteres son menos inmunogénicos que el mismo compuesto en el que cada enlace es un fosforotioato. Sin embargo, en ciertos casos, como se muestra en el Ejemplo 26, el mismo reemplazo de uno o más enlaces de fosforotioato con enlaces de fosfodiéster también resulta en una menor captación celular y/o pérdida de potencia. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados descritos en el presente documento toleran dicho cambio en los enlaces con poca o ninguna pérdida en la captación y la potencia en comparación con la contraparte de fosforotioato completo conjugado. De hecho, en ciertas realizaciones, por ejemplo, en los Ejemplos 44, 57, 59 y 86, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado y al menos un enlace internucleósido fosfodiéster en realidad exhiben una potencia incrementada in vivo incluso con respecto a una contraparte de fosforotioato completo que también comprende el mismo conjugado. Además, dado que la conjugación produce aumentos sustanciales en la absorción/potencia, una pequeña pérdida en esa ganancia sustancial puede ser aceptable para lograr una mejor tolerabilidad. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados comprenden al menos un enlace fosfodiéster.

[0017] En ciertas realizaciones, la conjugación de compuestos antisentido en el presente documento da como resultado un aumento de la administración, la captación y la actividad en los hepatocitos. De este modo, se administra más compuesto al tejido hepático. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el aumento del suministro por sí solo no explica el aumento total de la actividad. En ciertas de tales realizaciones, más compuesto entra en los hepatocitos. En ciertas realizaciones, incluso el aumento de la captación de hepatocitos no explica el aumento total de la actividad. En tales realizaciones, aumenta la captación productiva del compuesto conjugado. Por ejemplo,

como se muestra en el Ejemplo 102, ciertas realizaciones de conjugados que contienen GalNAc aumentan el enriquecimiento de oligonucleótidos antisentido en hepatocitos frente a células no parenquimáticas. Este enriquecimiento es beneficioso para los oligonucleótidos que se dirigen a los genes que se expresan en los hepatocitos.

[0018] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados en el presente documento dan como resultado una exposición reducida al riñón. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 20, las concentraciones de oligonucleótidos antisentido que comprenden ciertas realizaciones de conjugados que contienen GalNAc son más bajas en el riñón que las de los oligonucleótidos antisentido que carecen de un conjugado que contiene GalNAc. Esto tiene varias implicaciones terapéuticas beneficiosas. Para las indicaciones terapéuticas donde no se busca actividad en el riñón, la exposición al riñón corre el riesgo de toxicidad renal sin el beneficio correspondiente. Por otra parte, la alta concentración en el riñón generalmente resulta en la pérdida de compuesto a la orina, lo que resulta en una eliminación más rápida. En consecuencia, para objetivos no renales, la acumulación de riñón no es deseada.

[0019] En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos antisentido conjugados que tienen la estructura:



DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0020] Se debe entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la divulgación. Aquí, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en este documento, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo" así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique lo contrario.

[0021] Los encabezados de sección usados en este documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia descrita.

A. Definiciones

[0022] A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para la síntesis química y el análisis químico. Ciertas técnicas y procedimientos de este tipo se pueden encontrar, por ejemplo, en "Modificaciones de carbohidratos en investigación antisentido", editado por Sangvi y Cook, American Chemical Society, Washington DC, 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., 21ª edición, 2005; y "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications", editado por Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida; y Sambrook et al., "Molecular Cloning, A laboratory

Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,

[0023] A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

Como se usa en el presente documento, "nucleósido" significa un compuesto que comprende un resto de nucleobase y un resto de azúcar. Los nucleósidos incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos naturales (como se encuentran en el ADN y el ARN) y nucleósidos modificados. Los nucleósidos pueden estar unidos a un resto fosfato.

[0024] Como se usa en este documento, "modificación química" significa una diferencia química en un compuesto cuando se compara con una contraparte natural. Las modificaciones químicas de los oligonucleótidos incluyen modificaciones de nucleósidos (incluidas modificaciones de restos de azúcar y modificaciones de nucleobases) y modificaciones de enlaces internucleósidos. En referencia a un oligonucleótido, la modificación química no incluye diferencias solo en la secuencia de nucleobases.

[0025] Como se usa en el presente documento, "furanosilo" significa una estructura que comprende un anillo de 5 miembros que comprende cuatro átomos de carbono y un átomo de oxígeno.

[0026] Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar natural" significa un ribofuranosilo tal como se encuentra en el ARN natural o un desoxirribofuranosilo tal como se encuentra en el ADN natural.

[0027] Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar" significa un resto de azúcar que se produce naturalmente o un resto de azúcar modificado de un nucleósido.

[0028] Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar modificado" significa un resto de azúcar sustituido o un sustituto de azúcar.

[0029] Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar sustituido" significa un furanosilo que no es un resto de azúcar que se produce de forma natural. Los restos de azúcar sustituidos incluyen, pero no se limitan a furanosilos que comprenden sustituyentes en la posición 2', la posición 3', la posición 5' y/o la posición 4'. Ciertos restos de azúcar sustituidos son restos de azúcares bicíclicos.

[0030] Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar sustituido en 2'" significa un furanosilo que comprende un sustituyente en la posición 2' distinta de H u OH. A menos que se indique lo contrario, un resto de azúcar sustituido en 2' no es un resto de azúcar bicíclico (es decir, el sustituyente en 2' de un resto de azúcar sustituido en 2' no forma un puente hacia otro átomo del anillo de furanosilo).

[0031] Como se usa en el presente documento, "MOE" significa $-OCH_2CH_2OCH_3$,

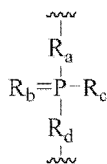
[0032] Como se usa en el presente documento, "2'-F nucleósido" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende flúor en la posición 2'.

[0033] A menos que se indique lo contrario, el flúor en un nucleósido 2'-F se encuentra en la posición ribo (que reemplaza al OH de una ribosa natural). Como se usa en el presente documento, el término "sustituto del azúcar" significa una estructura que no comprende un furanosilo y que es capaz de reemplazar el resto de azúcar natural de un nucleósido, de manera que las subunidades de nucleósidos resultantes son capaces de vincularse entre sí y/o se une a otros nucleósidos para formar un compuesto oligomérico que es capaz de hibridar con un compuesto oligomérico complementario. Tales estructuras incluyen anillos que comprenden un número diferente de átomos que furanosilo (por ejemplo, anillos de 4, 6 o 7 miembros); reemplazo del oxígeno de un furanosilo con un átomo no de oxígeno (por ejemplo, carbono, azufre o nitrógeno); o tanto un cambio en el número de átomos como un reemplazo del oxígeno. Dichas estructuras también pueden comprender sustituciones correspondientes a las descritas para restos de azúcar sustituidos (por ejemplo, sustitutos de azúcares bicíclicos carbocíclicos de 6 miembros que comprenden opcionalmente sustituyentes adicionales). Los sustitutos del azúcar también incluyen reemplazos de azúcar más complejos (por ejemplo, los sistemas sin anillo del ácido nucleico peptídico). Los sustitutos del azúcar incluyen, sin limitación, morfolinos, ciclohexenilos y ciclohexitoles.

[0034] Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar bicíclico" significa un resto de azúcar modificado que comprende un anillo de 4 a 7 miembros (incluido, entre otros, un furanosilo) que comprende un puente que conecta dos átomos del anillo de 4 a 7 miembros para formar un segundo anillo, resultando en una estructura bicíclica. En ciertas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un anillo de azúcar. En ciertas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un furanosilo. En ciertas de tales realizaciones, el puente conecta el carbono 2' y el carbono 4' del furanosilo.

[0035] Como se usa en el presente documento, "nucleótido" significa un nucleósido que comprende además un grupo de enlace fosfato. Como se usa en el presente documento, los "nucleósidos unidos" pueden estar o no unidos por enlaces fosfato y, por lo tanto, incluyen, pero no se limitan a, "nucleótidos unidos" como se usa en el presente documento, los "nucleósidos unidos" son nucleósidos que están conectados en una secuencia continua (es decir, no hay nucleósidos adicionales entre los que están unidos).

- 5 **[0036]** Como se usa en este documento, "nucleobase" significa un grupo de átomos que se pueden unir a un resto de azúcar para crear un nucleósido que es capaz de incorporarse en un oligonucleótido, y en donde el grupo de átomos es capaz de unirse con una nucleobase suplementaria natural. La presente de otro oligonucleótido o ácido nucleico. Las nucleobases pueden ser naturales o modificadas.
- 10 **[0037]** Como se usa en el presente documento, los términos "nucleobase no modificada" o "nucleobase de origen natural" significan las nucleobases heterocíclicas de ARN o ADN que se producen de forma natural: las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) (incluyendo 5-metil C) y uracilo (U).
- 15 **[0038]** Como se usa en el presente documento, "nucleobase modificada" significa cualquier nucleobase que no sea una nucleobase natural.
- [0039]** Como se usa en el presente documento, "nucleósido modificado" significa un nucleósido que comprende al menos una modificación química comparada con los nucleósidos de ARN o ADN que ocurren naturalmente. Los nucleósidos modificados comprenden un resto de azúcar modificado y/o una nucleobase modificada.
- 20 **[0040]** Como se usa en el presente documento, "nucleósido bicíclico" o "BNA" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar bicíclico.
- [0041]** Como se usa en el presente documento, "nucleósido de etil restringido" o "cEt" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH (CH₃)-O-2'
- 25 **[0042]** Como se usa en este documento, "nucleósido de ácido nucleico bloqueado" o "LNA" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH₂-O-2'.
- [0043]** Como se usa en el presente documento, "nucleósido sustituido en 2'" significa un nucleósido que comprende un sustituyente en la posición 2' diferente de H u OH. A menos que se indique lo contrario, un nucleósido sustituido en 2' no es un nucleósido bicíclico.
- 30 **[0044]** Como se usa en el presente documento, "desoxinucleósido" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar 2'-H furanosilo, como se encuentra en desoxirribonucleósidos naturales (ADN). En ciertas realizaciones, un 2'-desoxinucleósido puede comprender una nucleobase modificada o puede comprender una nucleobase de ARN (por ejemplo, uracilo).
- 35 **[0045]** Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido" significa un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos no modificados (ARN) y/o desoxirribonucleósidos no modificados (ADN) y/o uno o más nucleósidos modificados.
- 40 **[0046]** Como se usa en el presente documento, "oligonucleósido" significa un oligonucleótido en el que ninguno de los enlaces internucleósidos contiene un átomo de fósforo. Como se usa en el presente documento, los oligonucleótidos incluyen oligonucleósidos.
- 45 **[0047]** Como se usa en este documento, "oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende al menos un nucleósido modificado y/o al menos un enlace internucleósido modificado.
- [0048]** Como se usa en el presente documento, "enlace" o "grupo de enlace" significa un grupo de átomos que se unen entre sí a otros dos o más grupos de átomos.
- 50 **[0049]** Como se usa en este documento, "enlace internucleosídico" significa un enlace covalente entre nucleósidos adyacentes en un oligo-nucleótido.
- [0050]** Como se usa en el presente documento, "enlace internucleosídico natural" significa un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.
- 55 **[0051]** Como se usa en el presente documento, "enlace internucleosídico modificado" significa cualquier enlace internucleósido distinto de un enlace internucleósido que se produce.
- 60 **[0052]** Como se usa en el presente documento, "enlace internucleosídico terminal" significa el enlace entre los dos últimos nucleósidos de un oligonucleótido o una región definida del mismo.
- [0053]** Como se usa en el presente documento, "grupo de enlace de fósforo" significa un grupo de enlace que comprende un átomo de fósforo. Los grupos de enlace de fósforo incluyen, sin limitación, grupos que tienen la fórmula:



5

10 en donde:

- 15 R_a y R_d son cada uno, independientemente, O, S, CH_2 , NH o NJ_1 en donde J_1 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ sustituido;
 R_b es O o S;
 R_c es OH, SH, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ sustituido, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_6$, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ sustituido, amino o amino sustituido; y
 J_1 es R_b es O o S.

20 Los grupos de enlace de fósforo incluyen, sin limitación, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, fosfinato, fosforamidato, fosforotioamidato, tionoalquilfosfonato, fosfotriésteres, tioalquilfosfotriéster y boranofosfato.

[0054] Como se usa en el presente documento, "grupo de enlace de fósforo internucleósido" significa un grupo de enlace de fósforo que une directamente dos nucleósidos.

25 **[0055]** Como se usa en este documento, "grupo de enlace de fósforo no internucleósido" significa un grupo de enlace de fósforo que no se une directamente a dos nucleósidos. En ciertas realizaciones, un grupo de enlace de fósforo no internucleósido une un nucleósido a un grupo distinto de un nucleósido. En ciertas realizaciones, un grupo de enlace de fósforo no internucleósido une dos grupos, ninguno de los cuales es un nucleósido.

30 **[0056]** Como se usa en el presente documento, "grupo de enlace neutro" significa un grupo de enlace que no está cargado. Los grupos de enlace neutro incluyen, sin limitación, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI ($-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-O}-$), amida-3 ($-\text{CH}_2\text{-C}(\text{=O})\text{-N}(\text{H})-$), amida-4 ($-\text{CH}_2\text{-N}(\text{H})\text{-C}(\text{=O})-$), formacetal ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{-O}-$) y tioformacetal ($-\text{S}-\text{CH}_2\text{-O}-$). Otros grupos de enlace neutro incluyen enlaces no iónicos que comprenden siloxano (dialquilsiloxano), éster de carboxilato, carboxamida, sulfuro, éster de sulfonato y amidas (véase, por ejemplo: Modificaciones de carbohidratos en investigación antisentido; YS Sanghvi y PD Cook Eds. ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 y 4, (pp. 40-65)). Otros grupos de enlace neutro incluyen enlaces no iónicos que comprenden partes mixtas de N, O, S y CH_2 .

35 **[0057]** Como se usa en el presente documento, "grupo de enlace neutro internucleosídico" significa un grupo de enlace neutro que une directamente dos nucleósidos.

40 **[0058]** Como se usa en el presente documento, "grupo de enlace neutro no internucleosídico" significa un grupo de enlace neutro que no se une directamente a dos nucleósidos. En ciertas realizaciones, un grupo de enlace neutro no internucleosídico une un nucleósido a un grupo distinto de un nucleósido. En ciertas realizaciones, un grupo de enlace neutro no internucleosídico une dos grupos, ninguno de los cuales es un nucleósido.

45 **[0059]** Como se usa en el presente documento, "compuesto oligomérico" significa una estructura polimérica que comprende dos o más subestructuras. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico comprende un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico comprende uno o más grupos conjugados y/o grupos terminales. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico consiste en un oligonucleótido. Los compuestos oligoméricos también incluyen ácidos nucleicos naturales. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico comprende un esqueleto de una o más subunidades monoméricas enlazadas en las que cada subunidad monomérica enlazada está unida directa o indirectamente a un resto de base heterocíclica. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos también pueden incluir subunidades monoméricas que no están unidas a un resto de base heterocíclica, proporcionando de este modo sitios abásicos. En ciertas realizaciones, los enlaces que unen las subunidades monoméricas, los restos de azúcar o sustitutos y los restos de base heterocíclica pueden modificarse independientemente. En ciertas realizaciones, la unidad de enlace-azúcar, que puede o no incluir una base heterocíclica, puede estar sustituida con un mimético tal como los monómeros en ácidos nucleicos peptídicos.

50 **[0060]** Como se usa en el presente documento, "grupo terminal" significa uno o más átomos unidos a uno o ambos, el extremo 3' o el extremo 5' de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un grupo terminal es un grupo conjugado. En ciertas realizaciones, un grupo terminal comprende uno o más nucleósidos de grupo terminal.

55 **[0061]** Como se usa en el presente documento, "conjugado" o "grupo conjugado" significa un átomo o grupo de átomos unidos a un oligonucleótido o compuesto oligomérico. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto al que están unidos, incluidas, entre otras, propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas, de unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y/o depuración.

65

- 5 **[0062]** Como se usa en el presente documento, "enlazador conjugado" o "enlazador" en el contexto de un grupo conjugado significa una porción de un grupo conjugado que comprende cualquier átomo o grupo de átomos y que se unen covalentemente a (1) un oligonucleótido a otra porción del grupo conjugado o (2) dos o más porciones del grupo conjugado.
- 10 **[0063]** Los grupos conjugados se muestran aquí como radicales, que proporcionan un enlace para formar la unión covalente a un compuesto oligomérico tal como un oligonucleótido antisentido. En ciertas realizaciones, el punto de unión en el compuesto oligomérico es el átomo de oxígeno 3' del grupo 3'-hidroxilo del nucleósido terminal 3' del compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, el punto de unión en el compuesto oligomérico es el átomo de oxígeno 5' del grupo 5'-hidroxilo del nucleósido terminal 5' del compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, el enlace para formar la unión al compuesto oligomérico es un enlace escindible. En ciertas de tales realizaciones, dicho enlace escindible constituye todo o parte de un resto escindible.
- 15 **[0064]** En ciertas realizaciones, los grupos conjugados comprenden un resto escindible (por ejemplo, un enlace escindible o un nucleósido escindible) y una porción de agrupación de hidratos de carbono, tal como una porción de agrupación de GalNAc. Dicha porción de grupo de carbohidratos comprende: un resto de direccionamiento y, opcionalmente, un enlazador conjugado. En ciertas realizaciones, la porción del grupo de carbohidratos se identifica por el número y la identidad del ligando. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la porción de grupo de carbohidratos comprende 3 grupos GalNAc y se designa "GalNAc3". En ciertas realizaciones, la porción del grupo de carbohidratos comprende 4 grupos GalNAc y se designa "GalNAc4". Las partes específicas del grupo de hidratos de carbono (que tienen una ligadura, una ramificación y un grupo enlazador conjugado específico) se describen aquí y se designan con números romanos seguidos por el subíndice "a". Por consiguiente, "GalNAc3-1a" se refiere a una porción de grupo de hidratos de carbono específico de un grupo conjugado que tiene 3 grupos GalNAc y grupos de enlace, ramificación y enlace específicamente identificados. Dicho fragmento de grupo de carbohidratos está unido a un compuesto oligomérico a través de un resto escindible, como un enlace escindible o un nucleósido escindible.
- 20 **[0065]** Como se usa en el presente documento, "resto escindible" significa un enlace o grupo que puede dividirse en condiciones fisiológicas. En ciertas realizaciones, un resto escindible se escinde dentro de una célula o compartimentos subcelulares, tales como un lisosoma. En ciertas realizaciones, un resto escindible se escinde por enzimas endógenas, tales como nucleasas. En ciertas realizaciones, un resto escindible comprende un grupo de átomos que tienen uno, dos, tres, cuatro, o más de cuatro enlaces escindibles.
- 25 **[0066]** Como se usa en el presente documento, "enlace escindible" significa cualquier enlace químico capaz de dividirse. En ciertas realizaciones, un enlace escindible se selecciona entre: una amida, una poliamida, un éster, un éter, uno o ambos ésteres de un fosfodiéster, un éster de fosfato, un carbamato, un di-sulfuro o un péptido.
- 30 **[0067]** Como se usa en el presente documento, "grupo de carbohidratos" significa un compuesto que tiene uno o más residuos de carbohidratos unidos a un andamio o grupo enlazador. (Ver, por ejemplo, Maier et al., "Síntesis de oligonucleótidos antisentido conjugados a un grupo de carbohidratos multivalentes para la selección celular," Bioconjugate Chemistry, 2003, (14): 18-29, o Rensen et al., "Diseño y síntesis de nuevos glicolípidos terminados en N-acetilgalactosamina para dirigir las lipoproteínas al receptor de asiaglicoproteína hepática," J. Med. Chem. 2004, (47): 5798-5808, para ejemplos de grupos de conjugado de carbohidratos conjugados).
- 35 **[0068]** Como se usa en el presente documento, "derivado de carbohidrato" significa cualquier compuesto que pueda sintetizarse usando un carbohidrato como material de partida o intermedio.
- 40 **[0069]** Como se usa en el presente documento, "carbohidrato" significa un carbohidrato de origen natural, un carbohidrato modificado o un derivado de carbohidrato.
- 45 **[0070]** Como se usa en este documento, "grupo protector" significa cualquier compuesto o grupo protector conocido por los expertos en la técnica. Se pueden encontrar ejemplos no limitativos de grupos protectores en "Grupos protectores en química orgánica", TW Greene, PGM Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, Nueva York.
- 50 **[0071]** Como se usa en el presente documento, "monocatenario" significa un compuesto oligomérico que no se hibrida con su complemento y que carece de auto-complementariedad suficiente para formar un dúplex autoestable estable.
- 55 **[0072]** Como se usa en el presente documento, "doble cadena" significa un par de compuestos oligoméricos que se hibridan entre sí o un único compuesto oligomérico autocomplementario que forma una estructura de horquilla. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico de doble cadena comprende un primer y un segundo compuesto oligomérico.
- 60 **[0073]** Como se usa en el presente documento, "compuesto antisentido" significa un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido, al menos una porción del cual es complementario a un ácido nucleico diana con el
- 65

que es capaz de hibridar, dando como resultado al menos una actividad antisentido.

[0074] Como se usa en este documento, "actividad antisentido" significa cualquier cambio detectable y/o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido a su ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la actividad antisentido incluye la modulación de la cantidad o actividad de un transcrito de ácido nucleico diana (por ejemplo, ARNm). En ciertas realizaciones, la actividad antisentido incluye la modulación del empalme del pre-ARNm.

[0075] Como se usa en el presente documento, "compuesto antisentido basado en RNasa H" significa un compuesto antisentido en el que al menos parte de la actividad antisentido del compuesto antisentido es atribuible a la hibridación del compuesto antisentido a un ácido nucleico diana y la subsiguiente escisión del ácido nucleico diana por RNasa H.

[0076] Como se usa en el presente documento, "compuesto antisentido basado en RISC" significa un compuesto antisentido en el que al menos parte de la actividad antisentido del compuesto antisentido es atribuible al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

[0077] Como se usa en el presente documento, "detectar" o "medir" significa que se realiza un ensayo para detectar o medir. Dicha detección y/o medición puede resultar en un valor de cero. Por lo tanto, si una prueba de detección o medición resulta en un hallazgo de que no hay actividad (actividad de cero), la etapa de detección o medición de la actividad, sin embargo, se ha realizado.

[0078] Como se usa en el presente documento, "actividad detectable y/o medible" significa una actividad estadísticamente significativa que no es cero.

[0079] Como se usa en este documento, "esencialmente no modificado" significa poco o ningún cambio en un parámetro particular, particularmente relativo a otro parámetro que cambia mucho más. En ciertas realizaciones, un parámetro no cambia esencialmente cuando cambia menos del 5%. En ciertas realizaciones, un parámetro no cambia esencialmente si cambia menos de dos veces, mientras que otro parámetro cambia al menos diez veces. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una actividad antisentido es un cambio en la cantidad de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones de este tipo, la cantidad de un ácido nucleico no diana no cambia esencialmente si cambia mucho menos que el ácido nucleico diana, pero el cambio no necesita ser cero.

[0080] Como se usa en el presente documento, "expresión" significa el proceso por el cual un gen finalmente produce una proteína. La expresión incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional (por ejemplo, empalme, poliadenilación, adición de 5'-cap) y traducción.

[0081] Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico diana" significa una molécula de ácido nucleico con la cual se pretende que un compuesto antisentido se hibride para dar como resultado una actividad antisentido deseada. Los oligonucleótidos antisentido tienen suficiente complementariedad con sus ácidos nucleicos diana para permitir la hibridación en condiciones fisiológicas.

[0082] Como se usa en este documento, "complementariedad de nucleobase" o "complementariedad" cuando en referencia a nucleobases significa una nucleobase que es capaz de emparejamiento de bases con otra nucleobase. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria de la timina (T). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria al uracilo (U). En ciertas realizaciones, nucleobase complementaria significa una nucleobase de un compuesto antisentido que es capaz de emparejar bases con una nucleobase de su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico diana, se considera que la posición de los enlaces de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana es complementario en ese par de nucleobases. Las nucleobases que comprenden ciertas modificaciones pueden mantener la capacidad de emparejarse con una nucleobase homóloga y, por lo tanto, aún son capaces de complementariedad de nucleobase.

[0083] Como se usa en el presente documento, "no complementario" en referencia a nucleobases significa un par de nucleobases que no forman enlaces de hidrógeno entre sí.

[0084] Como se usa en el presente documento, "complementario" en referencia a compuestos oligoméricos (por ejemplo, nucleósidos unidos, oligonucleótidos o ácidos nucleicos) significa la capacidad de dichos compuestos oligoméricos o regiones de los mismos para hibridar con otro compuesto oligomérico o región del mismo a través de complementariedad de nucleobase. Los compuestos oligoméricos complementarios no necesitan tener una complementariedad de nucleobase en cada nucleósido. Más bien, se toleran algunos desajustes. En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricos complementarios son complementarios al 70% de las nucleobases (70% complementarios). En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricos complementarios son 80% complementarios. En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricos complementarios son 95% complementarios. En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricos complementarios son 100% complementarios.

- 5 **[0085]** Como se usa en el presente documento, "falta de coincidencia" significa una nucleobase de un primer compuesto oligomérico que no es capaz de emparejarse con una nucleobase en una posición correspondiente de un segundo compuesto oligomérico, cuando el primer y el segundo compuesto oligomérico están alineados. Cualquiera o ambos de los compuestos oligoméricos primero y segundo pueden ser oligonucleótidos.
- 10 **[0086]** Como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el emparejamiento de compuestos oligoméricos complementarios (por ejemplo, un compuesto antisentido y su ácido nucleico diana). Si bien no se limita a un mecanismo particular, el mecanismo más común de emparejamiento implica el enlace de hidrógeno, que puede ser el enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre nucleobases complementarias.
- 15 **[0087]** Como se usa en el presente documento, "hibrida específicamente" significa la capacidad de un compuesto oligomérico para hibridar con un sitio de ácido nucleico con mayor afinidad que la que hibrida con otro sitio de ácido nucleico.
- 20 **[0088]** Como se usa en este documento, "completamente complementario" en referencia a un oligonucleótido o porción del mismo significa que cada nucleobase del oligonucleótido o porción del mismo es capaz de emparejarse con una nucleobase de un ácido nucleico complementario o una porción contigua del mismo. Por lo tanto, una región completamente complementaria no comprende desajustes o nucleobases no hibridados en ninguna de las cadenas.
- 25 **[0089]** Como se usa en este documento, "porcentaje de complementariedad" significa el porcentaje de nucleobases de un compuesto oligomérico que son complementarios a una porción de igual longitud de un ácido nucleico diana. El porcentaje de complementariedad se calcula dividiendo el número de nucleobases del compuesto oligomérico que son complementarios a las nucleobases en las posiciones correspondientes en el ácido nucleico diana por la longitud total del compuesto oligomérico.
- 30 **[0090]** Como se usa en este documento, "porcentaje de identidad" significa el número de nucleobases en un primer ácido nucleico que son del mismo tipo (independientemente de la modificación química) que las nucleobases en las posiciones correspondientes en un segundo ácido nucleico, dividido por el número total de nucleobases en el primer ácido nucleico.
- 35 **[0091]** Como se usa en este documento, "modulación" significa un cambio en la cantidad o calidad de una molécula, función o actividad cuando se compara con la cantidad o calidad de una molécula, función o actividad antes de la modulación. Por ejemplo, la modulación incluye el cambio, ya sea un aumento (estimulación o inducción) o una disminución (inhibición o reducción) en la expresión génica. Como ejemplo adicional, la modulación de la expresión puede incluir un cambio en la selección del sitio de empalme del procesamiento previo al ARNm, dando como resultado un cambio en la cantidad absoluta o relativa de una variante de empalme particular en comparación con la cantidad en ausencia de modulación.
- 40 **[0092]** Como se usa en el presente documento, "motivo químico" significa un patrón de modificaciones químicas en un oligonucleótido o una región del mismo. Los motivos pueden definirse por modificaciones en ciertos nucleósidos y/o en ciertos grupos de enlace de un oligonucleótido.
- 45 **[0093]** Como se usa en el presente documento, "motivo de nucleósido" significa un patrón de modificaciones de nucleósidos en un oligonucleótido o una región del mismo. Los enlaces de tal oligonucleótido pueden modificarse o no modificarse. A menos que se indique lo contrario, los motivos que describen en este documento solo los nucleósidos pretenden ser motivos de nucleósidos. Por lo tanto, en tales casos, los enlaces no están limitados.
- 50 **[0094]** Como se usa en el presente documento, "motivo de azúcar" significa un patrón de modificaciones de azúcar en un oligonucleótido o una región del mismo.
- 55 **[0095]** Como se usa en el presente documento, "motivo de enlace" significa un patrón de modificaciones de enlace en un oligonucleótido o región del mismo. Los nucleósidos de tal oligonucleótido pueden modificarse o no modificarse. A menos que se indique lo contrario, los motivos en el presente documento que describen solo enlaces están destinados a ser motivos de enlace. Por lo tanto, en tales casos, los nucleósidos no están limitados.
- 60 **[0096]** Como se usa en este documento, "motivo de modificación de nucleobase" significa un patrón de modificaciones a las nucleobases a lo largo de un oligonucleótido. A menos que se indique lo contrario, un motivo de modificación de nucleobase es independiente de la secuencia de nucleobase.
- 65 **[0097]** Como se usa en este documento, "motivo de secuencia" significa un patrón de nucleobases dispuesto a lo largo de un oligonucleótido o una porción del mismo. A menos que se indique lo contrario, un motivo de secuencia es independiente de las modificaciones químicas y, por lo tanto, puede tener cualquier combinación de modificaciones químicas, sin modificaciones químicas.

5 **[0098]** Como se usa en este documento, "tipo de modificación" en referencia a un nucleósido o un nucleósido de un "tipo" significa la modificación química de un nucleósido e incluye nucleósidos modificados y no modificados. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, un "nucleósido que tiene una modificación de un primer tipo" puede ser un nucleósido no modificado.

10 **[0099]** Como se usa en el presente documento, modificaciones químicas significan modificaciones químicas o sustituyentes químicos que son diferentes entre sí, incluida la ausencia de modificaciones. Así, por ejemplo, un nucleósido de MOE y un nucleósido de ADN no modificado están "modificados de manera diferente", incluso aunque el nucleósido de ADN no esté modificado. Del mismo modo, el ADN y el ARN están "modificados de manera diferente", aunque ambos son nucleósidos no modificados que ocurren naturalmente. Los nucleósidos que son iguales pero que comprenden diferentes nucleobases no se modifican de manera diferente. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un azúcar modificado con 2'-OMe y una nucleobase de adenina no modificada y un nucleósido que comprende un azúcar modificado con 2'-OMe y una nucleobase de timina no modificada no se modifican de manera diferente.

15 **[0100]** Como se usa en este documento, "el mismo tipo de modificaciones" se refiere a modificaciones que son iguales entre sí, incluida la ausencia de modificaciones. Así, por ejemplo, dos nucleósidos de ADN no modificados tienen "el mismo tipo de modificación", aunque el nucleósido de ADN no está modificado. Dichos nucleósidos que tienen la misma modificación de tipo pueden comprender diferentes nucleobases.

20 **[0101]** Como se usa en el presente documento, "regiones separadas" significa porciones de un oligonucleótido en el que las modificaciones químicas o el motivo de modificaciones químicas de cualquiera de las porciones vecinas incluyen al menos una diferencia para permitir que las regiones separadas se distingan entre sí.

25 **[0102]** Como se usa en el presente documento, "vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sustancia adecuada para usar en la administración a un animal. En ciertas realizaciones, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable es solución salina estéril. En ciertas realizaciones, tal solución salina estéril es solución salina de calidad farmacéutica.

30 **[0103]** Como se usa en el presente documento, el término "trastorno metabólico" significa una enfermedad o afección caracterizada principalmente por la disregulación del metabolismo, el complejo conjunto de reacciones químicas asociadas con la descomposición de los alimentos para producir energía.

35 **[0104]** Como se usa en el presente documento, el término "trastorno cardiovascular" significa una enfermedad o afección que se caracteriza principalmente por una función alterada del corazón o de los vasos sanguíneos.

40 **[0105]** Como se usa en el presente documento, el término "sistema de anillo mono o policíclico" pretende incluir todos los sistemas de anillo seleccionados entre sistemas de anillo radical simple o policíclico en donde los anillos están fusionados o unidos y se entiende que incluye sistemas de anillo único y mixto individualmente seleccionado entre alifático, alicíclico, arilo, heteroarilo, aralquilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroaromático y heteroarilalquilo. Tales estructuras mono y policíclicas pueden contener anillos que tienen cada uno el mismo nivel de saturación o cada uno, independientemente, tienen grados variables de saturación que incluyen totalmente saturado, parcialmente saturado o totalmente insaturado. Cada anillo puede comprender átomos del anillo seleccionados de C, N, O y S para dar lugar a anillos heterocíclicos, así como anillos que comprenden solo los átomos del anillo C que pueden estar presentes en un motivo mixto tal como, por ejemplo, bencimidazol en el que un anillo tiene solo anillo de carbono. Los átomos y el anillo fundido tienen dos átomos de nitrógeno. El sistema de anillo mono o policíclico se puede sustituir adicionalmente con grupos sustituyentes tales como, por ejemplo, ftalimida que tiene dos grupos = O unidos a uno de los anillos. Los sistemas anulares mono o policíclicos se pueden unir a las moléculas parentales utilizando diversas estrategias tales como directamente a través de un átomo del anillo, fusionado a través de múltiples átomos del anillo, a través de un grupo sustituyente o a través de un resto de enlace bifuncional.

50 **[0106]** Como se usa en el presente documento, "profármaco" significa una forma inactiva o menos activa de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto, se metaboliza para formar el compuesto activo, o más activo, (por ejemplo, el fármaco).

55 **[0107]** Como se usa en el presente documento, "sustituyente" y "grupo sustituyente" significa un átomo o grupo que reemplaza el átomo o grupo de un compuesto parental nombrado. Por ejemplo, un sustituyente de un nucleósido modificado es cualquier átomo o grupo que difiere del átomo o grupo que se encuentra en un nucleósido natural (por ejemplo, un subponente 2' modificado es cualquier átomo o grupo en la posición 2' de otro nucleósido que H u OH). Los grupos sustituyentes pueden estar protegidos o desprotegidos. En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación tienen sustituyentes en una o en más de una posición del compuesto original. Los sustituyentes también pueden sustituirse adicionalmente con otros grupos sustituyentes y pueden unirse directamente o mediante un grupo de enlace tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo a un compuesto principal.

65 **[0108]** Del mismo modo, como se usa en este documento, "sustituyente" en referencia a un grupo funcional químico

significa un átomo o grupo de átomos que difiere del átomo o un grupo de átomos normalmente presente en el grupo funcional nombrado. En ciertas realizaciones, un sustituyente reemplaza un átomo de hidrógeno del grupo funcional (por ejemplo, en ciertas realizaciones, el sustituyente de un grupo metilo sustituido es un átomo o grupo distinto de hidrógeno que reemplaza uno de los átomos de hidrógeno de un grupo metilo no sustituido). A menos que se indique lo contrario, los grupos susceptibles de ser utilizados como sustituyentes incluyen, sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, alquilo, acilo (-C(O)R_{aa}), carboxilo (-C(O)O-R_{aa}), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxi sustituido (-O-R_{aa}), arilo, aralquilo, radical heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-N(R_{bb})(R_{cc})), imino(=NR_{bb}), amido (-C(O)N(R_{bb})(R_{cc}) o -N(R_{bb})C(O)R_{aa}), azido (-N₃), nitro (-NO₂), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc}) o -N(R_{bb})C(O)OR_{aa}), ureido (-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc})), tioureido (-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})-)(R_{cc})), guanidinilo (-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})), amidinilo (-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc}) o -N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa}), tiol (-SR_{bb}), sulfinilo (-S(O)R_{bb}), sulfonilo (-S(O)₂R_{bb}) y sulfonamidilo (-S(O)₂N(R_{bb})(R_{cc}) o -N(R_{bb})S(O)₂R_{bb}). En donde cada R_{aa}, R_{bb} y R_{cc} es, independientemente, H, un grupo funcional químico opcionalmente unido o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida que incluye sin limitación, alquilo, alqueno, alquino, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo. Los sustituyentes seleccionados dentro de los compuestos descritos en el presente documento están presentes en un grado recursivo.

[0109] Como se usa en el presente documento, "alquilo", como se usa en el presente documento, significa un radical hidrocarburo saturado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, sin limitación, metilo, etil, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Los grupos alquilo incluyen típicamente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono (alquilo C₁-C₁₂), siendo más preferidos de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

[0110] Como se usa en este documento, "alqueno" significa un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen, sin limitación, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alqueno incluyen típicamente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferidos de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alqueno como se usan en este documento pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

[0111] Como se usa en este documento, "alquino" significa un radical de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquino incluyen, sin limitación, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo y similares. Los grupos alquino incluyen típicamente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferidos de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquino como se usan en este documento pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

[0112] Como se usa en este documento, "acilo" significa un radical formado por la eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la Fórmula general -C(O)-X donde X es típicamente alifático, alicíclico o aromático. Los ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfinilos aromáticos, sulfinilos alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Los grupos acilo como se usan en este documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

[0113] Como se usa en el presente documento, "alícíclico" significa un sistema de anillo cíclico en el que el anillo es alifático. El sistema de anillo puede comprender uno o más anillos en los que al menos un anillo es alifático. Los alícíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo alícíclico, como se usa en el presente documento, puede incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

[0114] Como se usa en este documento, "alifático" significa un radical de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono en el que la saturación entre cualquiera de los dos átomos de carbono es un enlace simple, doble o triple. Un grupo alifático contiene preferiblemente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferido de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático se puede interrumpir con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Tales grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen, sin limitación, polialcoxis, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y poliiminas. Los grupos alifáticos como se usan en este documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

[0115] Como se usa en este documento, "alcoxi" significa un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno en el que el átomo de oxígeno se usa para unir el grupo alcoxi a una molécula principal. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, sin limitación, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentoxi, neopentoxi, n-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi como se usan en este documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

[0116] Como se usa en el presente documento, "aminoalquilo" significa un radical alquilo C₁-C₁₂ sustituido con

amino. La porción alquilo del radical forma un enlace covalente con una molécula parental. El grupo amino puede ubicarse en cualquier posición y el grupo aminoalquilo puede estar sustituido con un grupo sustituyente adicional en las porciones alquilo y/o amino.

5 **[0117]** Como se usa en el presente documento, "aralquilo" y "arilalquilo" significan un grupo aromático que está unido covalentemente a un radical alquilo C₁-C₁₂. La porción de radical alquilo del grupo aralquilo (o arilalquilo) resultante forma un enlace covalente con una molécula principal. Los ejemplos incluyen, sin limitación, bencil, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente otros grupos sustituyentes unidos al alquilo, el arilo o ambos grupos que forman el grupo radical.

10 **[0118]** Como se usa en el presente documento, "arilo" y "aromático" significan radicales de sistema de anillo carbocíclico monocíclicos o policíclicos que tienen uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares. Los sistemas de anillos arilo preferidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo como se usan en este documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

15 **[0119]** Como se usa en el presente documento, "halo" y "halógeno", significan un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

20 **[0120]** Como se usa en el presente documento, "heteroarilo" y "heteroaromático" significa un radical que comprende un anillo aromático mono o policíclico, sistema de anillo o sistema de anillo fusionado en el que al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo también pretende incluir sistemas de anillos fusionados, incluidos sistemas en los que uno o más de los anillos fusionados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo incluyen típicamente un átomo de anillo seleccionado de azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinil, y similares. Los radicales heteroarilo pueden unirse a una molécula parental directamente o a través de un resto de enlace, como un grupo alifático o heteroátomo. Los grupos heteroarilo como se usan en este documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

25 **[0121]** Como se usa en el presente documento, "compuesto conjugado" significa cualquier átomo, grupo de átomos, o grupo de átomos unidos adecuado para uso como un grupo conjugado. En ciertas realizaciones, los compuestos conjugados pueden poseer o impartir una o más propiedades, que incluyen, pero no se limitan a las propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas, de unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y/o depuración.

30 **[0122]** Como se usa en el presente documento, a menos que se indique o modifique de otra manera, el término "doble cadena" se refiere a dos compuestos oligoméricos separados que se hibridan entre sí. Dichos compuestos de doble cadena pueden tener uno o más nucleósidos o no hibridantes en uno o ambos extremos de una o ambas cadenas (salientes) y/o uno o más nucleósidos internos no hibridantes (desajustes) siempre que exista suficiente complementariedad para mantener la hibridación bajo condiciones fisiológicamente relevantes.

B. Ciertos compuestos

35 **[0123]** En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona compuestos antisentido conjugados que comprenden oligonucleótidos antisentido y un conjugado.

a. Ciertos oligonucleótidos antisentido

40 **[0124]** En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona oligonucleótidos antisentido. Tales oligonucleótidos antisentido comprenden nucleósidos unidos, comprendiendo cada nucleósido un resto azúcar y una nucleobase. La estructura de tales oligonucleótidos antisentido puede considerarse en términos de características químicas (por ejemplo, modificaciones y patrones de modificaciones) y secuencia de nucleobases (por ejemplo, secuencia de oligonucleótidos antisentido, identidad y secuencia de ácido nucleico diana).

i. Ciertas características de la química

45 **[0125]** El oligonucleótido antisentido comprende una o más modificaciones. En ciertas de tales realizaciones, los oligonucleótidos antisentido comprenden uno o más nucleósidos modificados y/o enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden un resto de azúcar modificado y/o una nucleobase modificada.

1. Ciertos restos de azúcar

50 **[0126]** En ciertas realizaciones, los compuestos de la divulgación comprenden uno o más nucleósidos modificados que comprenden un resto de azúcar modificado. Dichos compuestos que comprenden uno o más nucleósidos

modificados con azúcar pueden tener propiedades deseables, tales como estabilidad mejorada de la nucleasa o afinidad de unión aumentada con un ácido nucleico diana en relación con un oligonucleótido que comprende solo nucleósidos que comprenden restos de azúcar que se producen naturalmente. En ciertas realizaciones, los restos de azúcar modificados son restos de azúcar sustituidos. En ciertas realizaciones, los restos de azúcar modificados son sustitutos del azúcar. Tales sustitutos de azúcar pueden comprender una o más sustituciones correspondientes a las de restos de azúcar sustituidos.

[0127] En ciertas realizaciones, los restos de azúcar modificados son restos de azúcar sustituidos que comprenden uno o más sustituyentes de azúcar no puente, que incluyen pero no se limitan a sustituyentes en las posiciones 2' y/o 5'. Los ejemplos de sustituyentes de azúcar adecuados para la posición 2' incluyen, entre otros: 2'-F, 2'-OCH₃ ("OMe" u "O-metilo") y 2'-O(CH₂)₂OCH₃ ("MOE"). En ciertas realizaciones, los sustituyentes de azúcar en la posición 2' se seleccionan entre alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, alquilo O-C₁-C₁₀ sustituido; OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-ON(R_m)(R_n), y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. Los ejemplos de sustituyentes de azúcar en la posición 5' incluyen, pero no se limitan a: 5'-metilo (R o S); 5'-vinilo, y 5'-metoxi. En ciertas realizaciones, los azúcares sustituidos comprenden más de un sustituyente de azúcar no puente, por ejemplo, restos de azúcar 2'-F-5'-metilo (véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional PCT WO 2008/101157, para restos de azúcares sustituidos por 5', 2'-bis y nucleósidos adicionales).

[0128] Los nucleósidos que comprenden restos de azúcares sustituidos en 2' se denominan nucleósidos sustituidos en 2'. En ciertas realizaciones, un nucleósido sustituido en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de halo, alilo, amino, azido, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O, S o N(R_m)-alquilo; O, S o N(R_m)-alqueno; O, S o N(R_m)-alquino; O-alquilenil-O-alquilo, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo, O-aralquilo, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-ON(R_m)(R_n) u O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H, un grupo protector de amino o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. Estos grupos sustituyentes en 2' pueden estar además sustituidos con uno o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencil, fenilo, nitro (NO₂), tiol, tioalcoxi (S-alquilo), halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

[0129] En ciertas realizaciones, un nucleósido sustituido en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, NH₂, N₃, OCF₃, O-CH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂-CH=CH₂, O-CH₂-CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ y acetamida N-sustituida (O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) donde cada R_m y R_n es, independientemente, H, un grupo protector de amino o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

[0130] En ciertas realizaciones, un nucleósido sustituido en 2' comprende un resto de azúcar que comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, OCF₃, O-CH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-ON(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, y O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃,

[0131] En ciertas realizaciones, un nucleósido sustituido en 2' comprende un resto de azúcar que comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, O-CH₃ y OCH₂CH₂OCH₃,

[0132] Ciertos restos de azúcar modificados comprenden un sustituyente de azúcar puente que forma un segundo anillo que da como resultado un resto de azúcar bicíclico. En ciertas realizaciones de este tipo, el resto de azúcar bicíclico comprende un puente entre los átomos del anillo de furanosa 4' y 2'. Los ejemplos de dichos sustituyentes de azúcar 4' a 2' incluyen, entre otros: -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_aR_b)-N(R)-O-, -C(R_aR_b)-ON(R)-; 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt) y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', y sus análogos (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 7,399,845, publicada el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' y sus análogos, (véase, por ejemplo, el documento WO2009/006478, publicado el 8 de enero de 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' y sus análogos (ver, por ejemplo, WO2008/150729, publicado el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH₂-ON(CH₃)-2' (ver, por ejemplo, US2004/0171570, publicado el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH₂-ON(R)-2', y 4'-CH₂-N(R)-O-2', en donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector, o alquilo C₁-C₁₂; 4'-CH₂-N(R)-O-2', en donde R es H, alquilo C₁-C₁₂, o un grupo protector (ver, Patente de EE.UU. 7,427,672, concedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (ver, por ejemplo, Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' y sus análogos (ver, publicado en la Solicitud Internacional PCT WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008).

[0133] En ciertas realizaciones, tales puentes 4' a 2' comprenden independientemente de 1 a 4 grupos enlazados seleccionados independientemente de -[C(R_a)(R_b)]_n-, -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-, y -N(R_a)-; en donde:

x es 0, 1 o 2;

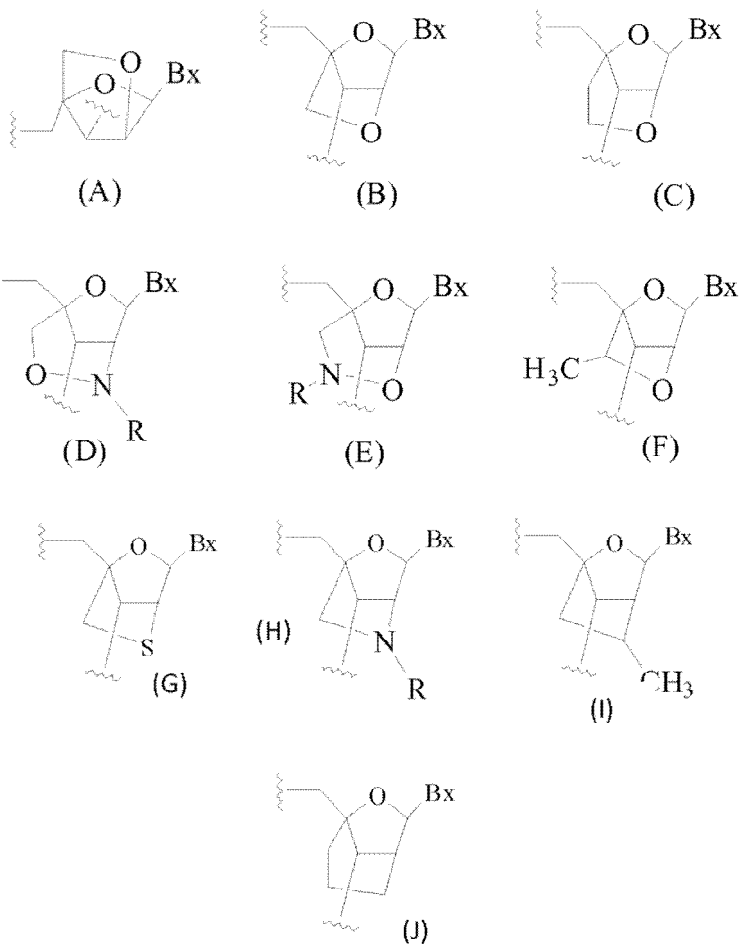
n es 1, 2, 3 o 4;

cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C₅-C₇, radical alicíclico C₅-C₇ sustituido, halógeno, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN,

sulfonilo (S(=O)₂-J₁) o sulfoxilo (S(=O)-J₁); y

cada J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂ sustituido o un grupo protector.

[0134] Los nucleósidos que comprenden restos de azúcares bicíclicos se denominan nucleósidos bicíclicos o BNA. Los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, (A) α-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β-D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA (también denominado ácido nucleico bloqueado o LNA), (C) Etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) Aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, (E) Oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, (F) metil (metilenoxi) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (también denominado etil restringido o cEt), (G) metileno-tio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) metileno-amino (4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (I) metil carbocíclico (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, y (J) propileno carbocíclico (4'-(CH₂)₃-2') BNA como se muestra a continuación.



en donde Bx es un resto nucleobase y R es, independientemente, H, un grupo protector, o alquilo C₁-C₁₂,

[0135] Los restos de azúcares bicíclicos adicionales se conocen en la técnica, por ejemplo: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y otros, Proc. Natl Acad Sci. EE.UU., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Medicina. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava y otros, J. Am. Chem. Soc., 129 (26) 8362-8379 (4 de julio de 2007); Elayadi et al., Curr. Opinión Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch y col., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum et al., Curr. Opinión mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Las patentes de EE.UU. n° 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 6,670,461 y 7,399,845; WO 2004/106356, WO 1994/14226, WO 2005/021570 y WO 2007/134181; las publicaciones de patentes de EE.UU. US2004/0171570, US2007/0287831, y US2008/0039618; Las patentes de EE.UU. N°s 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 números PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, y PCT/US2008/068922.

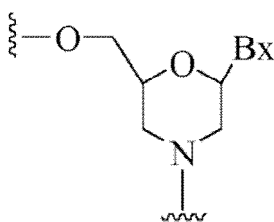
[0136] En ciertas realizaciones, los restos de azúcares bicíclicos y los nucleósidos que incorporan dichos restos de

azúcares bicíclicos se definen adicionalmente por configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2'metileno-oxi, puede estar en la configuración α -L o en la configuración β -D. Anteriormente, los nucleósidos bicíclicos α -L-metileno-oxi (4'-CH₂-O-2') se habían incorporado en oligonucleótidos antisentido que mostraban actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

[0137] En ciertas realizaciones, los restos de azúcar sustituidos comprenden uno o más sustituyentes de azúcar no puente y uno o más sustituyentes de azúcar puente (por ejemplo, azúcares 5' sustituidos y 4'-2' puente). (Ver, Solicitud Internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 22/22/07, en donde LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo).

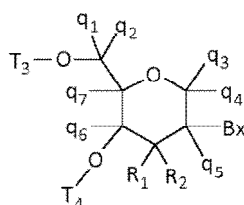
[0138] En ciertas realizaciones, los restos de azúcar modificados son sustitutos del azúcar. En ciertas realizaciones de este tipo, el átomo de oxígeno del azúcar natural se sustituye, por ejemplo, con un átomo de sulfuro, carbono o nitrógeno. En ciertas de tales realizaciones, dicho resto de azúcar modificado también comprende puentes y/o sustituyentes no puente como se describió anteriormente. Por ejemplo, ciertos sustitutos del azúcar comprenden un átomo de azufre 4' y una sustitución en la posición 2' (ver, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense publicada US2005/0130923, publicada el 16 de junio de 2005) y/o la posición 5'. A modo de ejemplo adicional, se han descrito nucleósidos bicíclicos carbocíclicos que tienen un puente 4'-2' (véase, por ejemplo, Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4429-4443 y Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740).

[0139] En ciertas realizaciones, los sustitutos del azúcar comprenden anillos que tienen otros 5 átomos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un sustituto del azúcar comprende un morfolino. Los compuestos morfolinos y su uso en compuestos oligoméricos se han publicado en numerosas patentes y artículos publicados (ver, por ejemplo, Braasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510; y patentes estadounidenses 5,698,685; 5,166,315; 5,185,444 y 5,034,506). Tal como se usa aquí, el término "morfolino" significa un sustituto del azúcar que tiene la siguiente estructura:



En ciertas realizaciones, los morfolinos pueden modificarse, por ejemplo, añadiendo o alterando varios grupos sustituyentes de la estructura de morfolino anterior. Tales sustitutos del azúcar se denominan en el presente documento "morfolinos modificados".

[0140] Para otro ejemplo, en ciertas realizaciones, un sustituto del azúcar comprende un tetrahidropirano de seis miembros. Tales tetrahidropiranos pueden ser modificados o sustituidos adicionalmente. Los nucleósidos que comprenden tales tetrahidropiranos modificados incluyen, entre otros, ácido nucleico hexitol (HNA), ácido nucleico anitol (ANA), ácido nucleico manitol (MNA) (ver Leumann, C.J. Bioorg. & Med. Chem. (2002) 10: 841-854), flúor HNA (F-HNA) y aquellos compuestos que tienen la Fórmula VI:



VI

en donde independientemente para cada uno de dichos al menos un análogo de nucleósido de tetrahidropirano de Fórmula VI:

Bx es un resto nucleobase;

T3 y T4 son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleósido que une el análogo nucleosídico de tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T3 y T4 es un grupo de enlace internucleósido que une el análogo de nucleósido tetrahidropirano al compuesto antisentido y el otro de T3 y T4 es H, un grupo protector de

hidroxilo, un grupo conjugado unido, o un grupo terminal 5' o 3';

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ o alquino C₂-C₆ sustituido; y

cada uno de R₁ y R₂ se selecciona independientemente entre: hidrógeno, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂, y CN, en donde X es O, S o NJ₁, y cada J₁, J₂ y J₃ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₆,

[0141] En ciertas realizaciones, los nucleósidos THP modificados de Fórmula VI se proporcionan en donde q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es distinto de H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es metilo. En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos THP de Fórmula VI en donde uno de R₁ y R₂ es F. En ciertas realizaciones, R₁ es flúor y R₂ es H, R₁ es metoxi y R₂ es H, y R₁ es metoxietoxi y R₂ es H.

[0142] También se conocen muchos otros sistemas de anillos sustitutos de azúcar biciclo y triciclo que se pueden usar para modificar nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido (ver, por ejemplo, artículo de revisión: Leumann, J. C., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10, 841-854).

[0143] También se proporcionan combinaciones de modificaciones sin limitación, tales como nucleósidos sustituidos con 2'-F-5'-metilo (véase la Solicitud Internacional PCT WO 2008/101157, publicada el 21/8/08 para otros 5', 2'-bis nucleósidos sustituidos descritos) y la sustitución del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S y una sustitución adicional en la posición 2' (ver la solicitud de patente estadounidense publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, alternativamente, la sustitución en 5' de un ácido nucleico bicíclico (ver solicitud internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 11/22/07 en la que un nucleósido bicíclico 4'-CH₂-O-2' está además sustituido en la posición 5' con un 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo). La síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos también se han descrito (véase, por ejemplo, Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129 (26), 8362-8379).

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona oligonucleótidos que comprenden nucleósidos modificados. Esos nucleótidos modificados pueden incluir azúcares modificados, nucleobases modificados y/o enlaces modificados. Las modificaciones específicas se seleccionan de manera que los oligonucleótidos resultantes posean características deseables. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden uno o más nucleósidos similares a ARN. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden uno o más nucleótidos similares a ADN.

2. Ciertas modificaciones de nucleobase

[0144] En ciertas realizaciones, los nucleósidos de la presente divulgación comprenden una o más nucleobases no modificadas. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de la presente divulgación comprenden una o más nucleobases modificadas.

[0145] En ciertas realizaciones, las nucleobases modificadas se seleccionan de: bases universales, bases hidrófobas, bases proliscentes, bases expandidas por tamaño y bases fluoradas como se define en el presente documento. Pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 0-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo; 5-propinilcitosina; 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C=C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquílicos de las bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deszaadenina, 3-deazaguanina y 3-deszaadenina, bases universales, bases hidrófobas, bases promiscuas, bases de tamaño expandido, y bases fluoradas como se definen en el presente documento. Otras nucleobases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina ([5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimidino [5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), pinzas G tales como fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-amino-metoxi)-H-pirimidino [5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimidino[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se reemplaza por otros heterociclos, por ejemplo, 7-deazaadenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases adicionales incluyen las descritas en la Patente de EE.UU. Nº 3,687,808, las descritas en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering*, Kroschwitz, JI, Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; los divulgados por Englisch et al., *Angewandte Chemie*, Edición Internacional, 1991, 30, 613; y los divulgados por Sanghvi, YS, Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, ST y Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288,

[0146] Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, sin limitación, los documentos US 3,687,808; 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653 y 6,005,096, algunos de los cuales son comúnmente propiedad de la

aplicación instantánea.

3. Ciertos enlaces internucleosídicos

5 **[0147]** En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona oligonucleótidos que comprenden nucleósidos unidos. En tales realizaciones, los nucleósidos pueden unirse entre sí utilizando cualquier enlace internucleosídico. Las dos clases principales de grupos de enlace internucleosídico se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos que contienen fósforo representativos incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres (PO), fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos (PS). Los grupos de enlace internucleosídicos representativos que no contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, metilnometilimino (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), tiodiéster (-OC(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)₂-O-); y N,N'-dimetilhidracina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). Se pueden usar enlaces modificados, en comparación con enlaces fosfodiéster naturales, para alterar, típicamente aumentar, la resistencia a la nucleasa del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos que tienen un átomo quiral se pueden preparar como una mezcla racémica, o como enantiómeros separados. Los enlaces quirales representativos incluyen, pero no se limitan a, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces internucleosídicos que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 **[0148]** Los oligonucleótidos descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisómeras que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), α o β, tal como para los anómeros de azúcar, o como (D) o (L), como para los aminoácidos, etc. incluidos en los compuestos antisentido proporcionados en este documento están todos los isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

25 **[0149]** Los enlaces internucleosídicos neutros incluyen, sin limitación, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), amida-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), amida-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'), formacetal (3'-O-CH₂-O-5') y tioformacetal (3'-S-CH₂-O-5'). Otros enlaces internucleosídicos neutros incluyen enlaces no iónicos que comprenden siloxano (dialquilsiloxano), éster de carboxilato, carboxamida, sulfuro, éster de sulfonato y amidas (véase, por ejemplo: Modificaciones de carbohidratos en investigación antisentido; YS Sanghvi y PD Cook, Eds., ACS Symposium series 580; Chapters 3 y 4, 40-65). Otros enlaces internucleosídicos neutros incluyen enlaces no iónicos que comprenden partes compuestas de N, O, S y CH₂,

4. Ciertos motivos

35 **[0150]** En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido comprenden uno o más nucleósidos modificados (por ejemplo, un nucleósido que comprende un azúcar modificado y/o una nucleobase modificada) y/o uno o más enlaces internucleosídicos modificados. El patrón de tales modificaciones en un oligonucleótido se denomina aquí como un motivo. En ciertas realizaciones, los motivos de azúcar, nucleobase y enlace son independientes entre sí.

40 a. Ciertos motivos de azúcar

45 **[0151]** En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden uno o más tipos de restos de azúcar modificados y/o restos de azúcar naturales dispuestos a lo largo de un oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o motivo de modificación de azúcar. Tales motivos pueden incluir cualquiera de las modificaciones de azúcar discutidas en este documento y/u otras modificaciones de azúcar conocidas.

50 **[0152]** En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden o consisten en una región que tiene un motivo de azúcar gámpero, que comprende dos regiones externas o "alas" y una región central o interna o "hueco". Las tres regiones de un motivo de azúcar gámpero (el ala 5', el hueco y el ala 3') forman una secuencia contigua de nucleósidos en la que al menos algunos de los restos de azúcar de los nucleósidos de cada una de las alas difieren de al menos algunos de los restos de azúcar de los nucleósidos de la brecha. Específicamente, al menos los restos de azúcar de los nucleósidos de cada ala que están más cerca de la brecha (el nucleósido más 3' del ala 5' y el nucleósido más 5' del ala 3') difieren del azúcar parte de los nucleósidos de la brecha vecina, definiendo así el límite entre las alas y la brecha. En ciertas realizaciones, los restos de azúcar dentro de la brecha son iguales entre sí. En ciertas realizaciones, el espacio incluye uno o más nucleósidos que tienen un resto de azúcar que difiere del resto de azúcar de uno o más nucleósidos del espacio. En ciertas realizaciones, los motivos de azúcar de las dos alas son iguales entre sí (separador de azúcar simétrico). En ciertas realizaciones, los motivos de azúcar del ala 5' difieren del motivo de azúcar del ala 3' (separador de azúcar asimétrico).

60 i. Ciertas alas de 5'

65 **[0153]** En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador consiste en 1 a 8 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gámpero consiste en 1 a 7 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gámpero consiste en 1 a 6 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gámpero consiste en 2 a 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gámpero consiste en 3 a 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5'

de un gápmo consiste en 4 o 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 1 a 4 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 1 a 3 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 1 o 2 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 2 a 4 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 2 o 3 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador consiste en 3 o 4 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 1 nucleósido. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 2 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 3 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 4 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo consiste en 6 nucleósidos unidos.

[0154] En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido bicíclico. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos dos nucleósidos bicíclicos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo comprende al menos tres nucleósidos bicíclicos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo comprende al menos cuatro nucleósidos bicíclicos. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido de etil restringido. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido de LNA. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un espaciador es un nucleósido bicíclico. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un separador es un nucleósido de etil restringido. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un gápmo es un nucleósido LNA.

[0155] En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo comprende al menos un nucleósido modificado no bicíclico. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido sustituido en 2'. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo comprende al menos un nucleósido 2'-MOE. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido 2'-OMe. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un espaciador es un nucleósido modificado no bicíclico. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un separador es un nucleósido sustituido en 2'. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un gápmo es un nucleósido 2'-MOE. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un gápmo es un nucleósido 2'-OMe.

[0156] En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un 2'-desoxinucleósido. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un gápmo es un 2'-desoxinucleósido. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un ribonucleósido. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del ala 5' de un espaciador es un ribonucleósido. En ciertas realizaciones, uno, más de uno, o cada uno de los nucleósidos del ala 5' es un nucleósido similar a ARN.

[0157] En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido bicíclico y al menos un nucleósido modificado no bicíclico. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido bicíclico y al menos un nucleósido sustituido en 2'. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido bicíclico y al menos un nucleósido 2'-MOE. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un gápmo comprende al menos un nucleósido bicíclico y al menos un nucleósido 2'-OMe. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido bicíclico y al menos un 2'-desoxinucleósido.

[0158] En ciertas realizaciones, el ala 5' de un dispositivo de separación comprende al menos un nucleósido de etil restringido y al menos un nucleósido modificado no bicíclico. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido de etil restringido y al menos un nucleósido sustituido en 2'. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido de etil restringido y al menos un nucleósido 2'-MOE. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido de etil restringido y al menos un nucleósido 2'-OMe. En ciertas realizaciones, el ala 5' de un espaciador comprende al menos un nucleósido de etil restringido y al menos un nucleótido 2'-desoxi.

ii. Ciertas alas 3'

[0159] En ciertas realizaciones, el ala 3' de un espaciador consiste en 1 a 8 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 1 a 7 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 1 a 6 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 1 a 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 2 a 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 3 a 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 4 o 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 1 a 4 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 1 a 3 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 1 o 2 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 2 a 4 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 2 o 3 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un espaciador consiste en 3 o 4 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 1 nucleósido. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 2 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 3 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 4 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 5 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo consiste en 6 nucleósidos unidos.

comprende al menos un nucleósido de etil restringido, al menos un nucleósido 2'-OMe y al menos un 2'-desoxinucleósido. En ciertas realizaciones, el ala 3' de un gápmo comprende al menos un nucleósido LNA, al menos un nucleósido 2'-OMe, y al menos un 2'-desoxinucleósido.

5 iii. Ciertas regiones centrales (brechas)

[0170] En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 6 a 20 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 6 a 15 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 6 a 12 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 6 a 10 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 6 a 9 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 6 a 8 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 6 o 7 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 7 a 10 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 7 a 9 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 7 u 8 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 8 a 10 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 8 o 9 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 6 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 7 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 8 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 9 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 10 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 11 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, la brecha de un gápmo consiste en 12 nucleósidos unidos.

[0171] En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la brecha de un gápmo es un 2'-desoxinucleósido. En ciertas realizaciones, la brecha comprende uno o más nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la brecha de un gápmo es un 2'-desoxinucleósido o es un nucleósido modificado que es "similar al ADN". En tales realizaciones, "similar a ADN" significa que el nucleósido tiene características similares a las del ADN, de modo que un dúplex que comprende el gápmo y una molécula de ARN es capaz de activar la RNasa H. Por ejemplo, bajo ciertas condiciones, 2'-(ara)-F se ha demostrado que soporta la activación de la RNasa H, y por lo tanto es similar al ADN. En ciertas realizaciones, uno o más nucleósidos de la brecha de un gápmo no es un 2'-desoxinucleósido y no es similar al ADN. En ciertas de tales realizaciones, el gápmo soporta, no obstante, la activación de la RNasa H (por ejemplo, en virtud del número o la colocación de los nucleósidos que no son ADN).

[0172] En ciertas realizaciones, los huecos comprenden un tramo de 2'-desoxinucleósido no modificado interrumpido por uno o más nucleósidos modificados, dando como resultado tres subregiones (dos tramos de uno o más 2'-desoxinucleósidos y un tramo de uno o más nucleósidos modificados de interrupción). En ciertas realizaciones, ningún tramo de 2'-desoxinucleósidos no modificados es más largo que 5, 6 o 7 nucleósidos. En ciertas realizaciones, tales tramos cortos se logran usando regiones de espacio corto. En ciertas realizaciones, los estiramientos cortos se logran mediante la interrupción de una región de separación más larga.

[0173] En ciertas realizaciones, el espacio comprende uno o más nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, la brecha comprende uno o más nucleósidos modificados seleccionados de entre cEt, FHNA, LNA y 2-tio-timidina. En ciertas realizaciones, el hueco comprende un nucleósido modificado. En ciertas realizaciones, la brecha comprende un resto de azúcar sustituido en 5' seleccionado entre 5'-Me y 5'-(R)-Me. En ciertas realizaciones, la brecha comprende dos nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, la brecha comprende tres nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, la brecha comprende cuatro nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, la brecha comprende dos o más nucleósidos modificados y cada nucleósido modificado es el mismo. En ciertas realizaciones, la brecha comprende dos o más nucleósidos modificados y cada nucleósido modificado es diferente.

[0174] En ciertas realizaciones, la brecha comprende uno o más enlaces modificados. En ciertas realizaciones, el hueco comprende uno o más enlaces metilfosfonato. En ciertas realizaciones, la brecha comprende dos o más enlaces modificados. En ciertas realizaciones, la brecha comprende uno o más enlaces modificados y uno o más nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, la brecha comprende un enlace modificado y un nucleósido modificado. En ciertas realizaciones, la brecha comprende dos enlaces modificados y dos o más nucleósidos modificados.

b. Ciertos motivos de enlace internucleósido

[0175] En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden enlaces internucleosídicos modificados dispuestos a lo largo del oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o un motivo de enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región que tiene un motivo de enlace internucleosídico alternativo. En ciertas realizaciones, los oligo-nucleótidos de la presente divulgación comprenden una región de enlaces internucleosídicos modificados uniformemente. En ciertas de tales realizaciones, el oligonucleótido comprende una región que está unida uniformemente por enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido está unido uniformemente por enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y

fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato y al menos un enlace internucleosídico es fosforotioato.

5 [0176] En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 6 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 7 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 8 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 9 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 10 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 11 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 12 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 13 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 14 enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

15 [0177] En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 6 enlaces internucleosídicos fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 7 enlaces internucleosídicos fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 8 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 9 enlaces internucleosídicos fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 10 enlaces de internucleosídico fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos uno 12 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas de tales realizaciones, al menos uno de tales bloques está localizado en el extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas de tales realizaciones, al menos uno de tales bloques está localizado dentro de 3 nucleosídeos del extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 15 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 14 enlaces nucleotídicos fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 13 enlaces internucleosídicos fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 12 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 11 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 10 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 9 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 8 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 7 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 6 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende menos de 5 enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

c. Ciertos motivos de modificación de nucleobase

40 [0178] En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden modificaciones químicas a nucleobases dispuestas a lo largo del oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o motivo de modificación de nucleobases. En ciertas realizaciones de este tipo, las modificaciones de nucleobase están dispuestas en un motivo espaciado. En ciertas realizaciones, las modificaciones de nucleobase están dispuestas en un motivo alternativo. En ciertas realizaciones, cada nucleobase se modifica. En ciertas realizaciones, ninguna de las nucleobases está modificada químicamente.

45 [0179] En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden un bloque de nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones de este tipo, el bloque está en el extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el bloque está dentro de 3 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas de tales realizaciones, el bloque está en el extremo 5' del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el bloque está dentro de 3 nucleótidos del extremo 5' del oligonucleótido.

50 [0180] En ciertas realizaciones, las modificaciones de nucleobase son una función de la base natural en una posición particular de un oligonucleótido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se modifica cada purina o cada pirimidina en un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, cada adenina se modifica. En ciertas realizaciones, cada guanina se modifica. En ciertas realizaciones, cada timina es modificada. En ciertas realizaciones, cada citosina se modifica. En ciertas realizaciones, cada uracilo es modificado.

55 [0181] En ciertas realizaciones, algunos, todos, o ninguno de los restos de citosina en un oligonucleótido son restos de 5-metil citosina. En este documento, la 5-metilcitosina no es una "nucleobase modificada". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, las nucleobases no modificadas incluyen tanto residuos de citosina que tienen un 5-metilo como aquellos que carecen de un 5-metilo. En ciertas realizaciones, se especifica el estado de metilación de todas o algunas nucleobases de citosina.

60 [0182] En ciertas realizaciones, las modificaciones químicas a las nucleobases comprenden la unión de ciertos grupos conjugados a las nucleobases. En ciertas realizaciones, cada purina o cada pirimidina en un oligonucleótido puede modificarse opcionalmente para comprender un grupo conjugado.

d. Ciertas longitudes totales

[0183] En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona oligonucleótidos de cualquiera de una variedad de intervalos de longitudes. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos consisten en nucleósidos unidos de X a Y, donde X representa el menor número de nucleósidos en el rango y Y representa el mayor número de nucleósidos en el rango. En ciertas de tales realizaciones, X e Y se seleccionan cada uno independientemente de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50; siempre que $X \leq Y$. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede consistir en 8 a 9, 8 a 10, 8 a 11, 8 a 12, 8 a 13, 8 a 14, 8 a 15, 8 a 16, 8 a 17, 8 a 18, 8 a 19, 8 a 20, 8 a 21, 8 a 22, 8 a 23, 8 a 24, 8 a 25, 8 a 26, 8 a 27, 8 a 28, 8 a 29, 8 a 30, 9 a 10, 9 a 11, 9 a 12, 9 a 13, 9 a 14, 9 a 15, 9 a 16, 9 a 17, 9 a 18, 9 a 19, 9 a 20, 9 a 21, 9 a 22, 9 a 23, 9 a 24, 9 a 25, 9 a 26, 9 a 27, 9 a 28, 9 a 29, 9 a 30, 10 a 11, 10 a 12, 10 a 13, 10 a 14, 10 a 15, 10 a 16, 10 a 17, 10 a 18, 10 a 19, 10 a 20, 10 a 21, 10 a 22, 10 a 23, 10 a 24, 10 a 25, 10 a 26, 10 a 27, 10 a 28, 10 a 29, 10 a 30, 11 a 12, 11 a 13, 11 a 14, 11 a 15, 11 a 16, 11 a 17, 11 a 18, 11 a 19, 11 a 20, 11 a 21, 11 a 22, 11 a 23, 11 a 24, 11 a 25, 11 a 26, 11 a 27, 11 a 28, 11 a 29, 11 a 30, 12 a 13, 12 a 14, 12 a 15, 12 a 16, 12 a 17, 12 a 18, 12 a 19, 12 a 20, 12 a 21, 12 a 22, 12 a 23, 12 a 24, 12 a 25, 12 a 26, 12 a 27, 12 a 28, 12 a 29, 12 a 30, 13 a 14, 13 a 15, 13 a 16, 13 a 17, 13 a 18, 13 a 19, 13 a 20, 13 a 21, 13 a 22, 13 a 23, 13 a 24, 13 a 25, 13 a 26, 13 a 27, 13 a 28, 13 a 29, 13 a 30, 14 a 15, 14 a 16, 14 a 17, 14 a 18, 14 a 19, 14 a 20, 14 a 21, 14 a 22, 14 a 23, 14 a 24, 14 a 25, 14 a 26, 14 a 27, 14 a 28, 14 a 29, 14 a 30, 15 a 16, 15 a 17, 15 a 18, 15 a 19, 15 a 20, 15 a 21, 15 a 22, 15 a 23, 15 a 24, 15 a 25, 15 a 26, 15 a 27, 15 a 28, 15 a 29, 15 a 30, 16 a 17, 16 a 18, 16 a 19, 16 a 20, 16 a 21, 16 a 22, 16 a 23, 16 a 24, 16 a 25, 16 a 26, 16 a 27, 16 a 28, 16 a 29, 16 a 30, 17 a 18, 17 a 19, 17 a 20, 17 a 21, 17 a 22, 17 a 23, 17 a 24, 17 a 25, 17 a 26, 17 a 27, 17 a 28, 17 a 29, 17 a 30, 18 a 19, 18 a 20, 18 a 21, 18 a 22, 18 a 23, 18 a 24, 18 a 25, 18 a 26, 18 a 27, 18 a 28, 18 a 29, 18 a 30, 19 a 20, 19 a 21, 19 a 22, 19 a 23, 19 a 24, 19 a 25, 19 a 26, 19 a 27, 19 a 28, 19 a 29, 19 a 30, 20 a 21, 20 a 22, 20 a 23, 20 a 24, 20 a 25, 20 a 26, 20 a 27, 20 a 28, 20 a 29, 20 a 30, 21 a 22, 21 a 23, 21 a 24, 21 a 25, 21 a 26, 21 a 27, 21 a 28, 21 a 29, 21 a 30, 22 a 23, 22 a 24, 22 a 25, 22 a 26, 22 a 27, 22 a 28, 22 a 29, 22 a 30, 23 a 24, 23 a 25, 23 a 26, 23 a 27, 23 a 28, 23 a 29, 23 a 30, 24 a 25, 24 a 26, 24 a 27, 24 a 28, 24 a 29, 24 a 30, 25 a 26, 25 a 27, 25 a 28, 25 a 29, 25 a 30, 26 a 27, 26 a 28, 26 a 29, 26 a 30, 27 a 28, 27 a 29, 27 a 30, 28 a 29, 28 a 30 o 29 a 30 nucleósidos unidos. En realizaciones en las que el número de nucleósidos de un oligonucleótido de un compuesto está limitado, ya sea a un rango o a un número específico, el compuesto puede, sin embargo, comprender otros sustituyentes adicionales. Por ejemplo, un oligonucleótido que comprende 8-30 nucleósidos excluye oligonucleótidos que tienen 31 nucleósidos, pero, a menos que se indique lo contrario, dicho oligonucleótido puede comprender además, por ejemplo, uno o más grupos conjugados, grupos terminales u otros sustituyentes.

[0184] Además, cuando un oligonucleótido se describe por un rango de longitud total y por regiones que tienen longitudes específicas, y donde la suma de las longitudes especificadas de las regiones es menor que el límite superior del rango de longitud total, el oligonucleótido puede tener nucleósidos adicionales, más allá de las regiones especificadas, siempre que el número total de nucleósidos no exceda el límite superior del rango de longitud total.

5. Ciertos motivos antisépticos de la química del oligonucleótido

[0185] En ciertas realizaciones, las características químicas estructurales de los oligonucleótidos antisentido se caracterizan por su motivo de azúcar, motivo de enlace internucleósido, motivo de modificación de nucleobase y longitud total. En ciertas realizaciones, tales parámetros son independientes entre sí. Por lo tanto, cada enlace internucleosídico de un oligonucleótido que tiene un motivo de azúcar gápmo puede modificarse o no modificarse y puede o no seguir el patrón de modificación gápmo de las modificaciones de azúcar. Por lo tanto, los enlaces internucleosídicos dentro de las regiones de ala de un separador de azúcares pueden ser iguales o diferentes entre sí y pueden ser iguales o diferentes de los enlaces internucleosídicos de la región de intervalo. Del mismo modo, dichos oligonucleótidos de separación de azúcar pueden comprender una o más nucleobases modificadas independientemente del patrón de separación de las modificaciones de azúcar. Un experto en la materia apreciará que tales motivos pueden combinarse para crear una variedad de oligonucleótidos.

[0186] En ciertas realizaciones, la selección del enlace internucleosídico y la modificación de nucleósidos no son independientes entre sí.

i. Ciertas secuencias y dianas

[0187] En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona oligonucleótidos antisentido que tienen una secuencia complementaria a un ácido nucleico diana. Tales compuestos antisentido son capaces de hibridar con un ácido nucleico diana, dando como resultado al menos una actividad antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido se hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos diana. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido que hibrida específicamente tiene una secuencia de nucleobases que comprende una región que tiene suficiente complementariedad con un ácido nucleico diana para permitir la hibridación y dar como resultado una actividad antisentido y una complementariedad insuficiente con cualquier no diana para evitar o reducir la hibridación no específica a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea una hibridación específica (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para usos in vivo o terapéuticos, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos in vitro). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son

selectivos entre una diana y una no diana, incluso aunque tanto la diana como la no diana comprenden la secuencia diana. En tales realizaciones, la selectividad puede resultar de la accesibilidad relativa de la región diana de una molécula de ácido nucleico en comparación con la otra.

5 **[0188]** En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona compuestos antisentido que comprenden oligonucleótidos que son completamente complementarios del ácido nucleico diana en toda la longitud del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son 99% complementarios al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son 95% complementarios al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, tales oligonucleótidos son complementarios al 90% del ácido nucleico diana.

10 **[0189]** En ciertas realizaciones, tales oligonucleótidos son complementarios al 85% del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, tales oligonucleótidos son complementarios al 80% del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido comprende una región que es totalmente complementaria a un ácido nucleico diana y es al menos 80% complementaria al ácido nucleico diana en toda la longitud del oligonucleótido. En ciertas de tales realizaciones, la región de completa complementariedad es de 6 a 14 nucleobases de longitud.

15 **[0190]** En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región de hibridación y una región terminal. En ciertas de tales realizaciones, la región de hibridación consiste en 12-30 nucleósidos unidos y es totalmente complementaria al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la región de hibridación incluye una falta de coincidencia con respecto al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la región de hibridación incluye dos desapareamientos con respecto al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la región de hibridación incluye tres desajustes con respecto al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la región terminal consiste en 1-4 nucleósidos terminales. En ciertas realizaciones, los nucleósidos terminales están en el extremo 3'. En ciertas realizaciones, uno o más de los nucleósidos terminales no son complementarios del ácido nucleico diana.

20 **[0191]** Los mecanismos antisentido incluyen cualquier mecanismo que implique la hibridación de un oligonucleótido con un ácido nucleico diana, en el que la hibridación da como resultado un efecto biológico. En ciertas realizaciones, dicha hibridación da como resultado una degradación u ocupación del ácido nucleico diana con inhibición o estimulación concomitante de la maquinaria celular que implica, por ejemplo, traducción, transcripción o empalme del ácido nucleico diana.

25 **[0192]** Un tipo de mecanismo antisentido que implica la degradación del ARN diana es el antisentido mediado por la RNasa H. RNasa H es una endonucleasa celular que corta la cadena de ARN de un dúplex de ARN: ADN. Se sabe en la técnica que los compuestos antisentido monocatenarios que son "similares a ADN" provoca la actividad de la RNasa H en células de mamíferos. La activación de la RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana del ARN, lo que mejora considerablemente la eficacia de la inhibición de la expresión génica mediada por oligonucleótidos similar al ADN.

30 **[0193]** En ciertas realizaciones, un grupo conjugado comprende un resto escindible. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado comprende uno o más enlaces escindibles. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado comprende un enlazador. En ciertas realizaciones, un enlazador comprende un resto de unión a proteína. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado comprende un resto dirigido a la célula (también denominado grupo dirigido a la célula). En ciertas realizaciones, un resto dirigido a la célula comprende un grupo de ramificación. En ciertas realizaciones, un resto dirigido a la célula comprende una o más ataduras. En ciertas realizaciones, un resto dirigido a las células comprende un grupo de carbohidratos o hidratos de carbono.

ii. Ciertos restos escindibles

35 **[0194]** En ciertas realizaciones, un resto escindible es un enlace escindible. En ciertas realizaciones, un resto escindible comprende un enlace escindible. En ciertas realizaciones, el grupo conjugado comprende un resto escindible. En ciertas de tales realizaciones, el resto escindible se une al oligonucleótido antisentido. En ciertas realizaciones de este tipo, el resto escindible se une directamente al resto dirigido a la célula. En ciertas realizaciones de este tipo, el resto escindible se une al enlazador conjugado. En ciertas realizaciones, el resto escindible comprende un fosfato o fosfodiéster. En ciertas realizaciones, el resto escindible es un análogo de nucleósido o nucleósido escindible. En ciertas realizaciones, el análogo de nucleósido o nucleósido comprende una base heterocíclica opcionalmente protegida seleccionada de una purina, purina sustituida, pirimidina o pirimidina sustituida. En ciertas realizaciones, el resto escindible es un nucleósido que comprende una base heterocíclica opcionalmente protegida seleccionada de uracilo, timina, citosina, 4-N-benzoilcitosina, 5-metilcitosina, 4-N-benzoil-5-metilcitosina, adenina, 6-N-benzoiladenina, guanina y 2-N-isobutirilguanina. En ciertas realizaciones, el resto escindible es 2'-desoxi nucleósido que está unido a la posición 3' del oligonucleótido antisentido por un enlace fosfodiéster y está unido al enlazador por un enlace fosfodiéster o fosforotioato. En ciertas realizaciones, el resto escindible es adenosina 2'-desoxi que está unida a la posición 3' del oligonucleótido antisentido por un enlace fosfodiéster y está unida al enlazador por un enlace fosfodiéster o fosforotioato. En ciertas realizaciones, el resto escindible es 2'-desoxi adenosina que está unido a la posición 3' del oligonucleótido antisentido mediante un enlace fosfodiéster y está unido al enlazador mediante un enlace fosfodiéster.

[0195] En ciertas realizaciones, el resto escindible está unido a la posición 3' del oligonucleótido antisentido. En ciertas realizaciones, el resto escindible está unido a la posición 5' del oligonucleótido antisentido. En ciertas realizaciones, el resto escindible está unido a una posición 2' del oligonucleótido antisentido. En ciertas realizaciones, el resto escindible está unido al oligonucleótido antisentido mediante un enlace fosfodiéster. En ciertas realizaciones, el resto escindible está unido al enlazador mediante un fosfodiéster o un enlace de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el resto escindible está unido al enlazador mediante un enlace fosfodiéster. En ciertas realizaciones, el grupo conjugado no incluye un resto escindible.

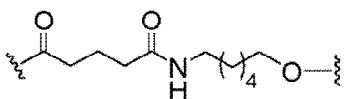
[0196] En ciertas realizaciones, el resto escindible se escinde después de que el complejo se haya administrado a un animal solo después de ser internalizado por una célula diana. Dentro de la célula, el resto escindible se escinde liberando así el oligonucleótido antisentido activo. Si bien no queriendo estar limitado por la teoría, se cree que el resto escindible está escindido por una o más nucleasas dentro de la célula. En ciertas realizaciones, la una o más nucleasas escinden el enlace fosfodiéster entre el resto escindible y el enlazador.

iii. Ciertos enlazadores

[0197] El grupo conjugado del compuesto de la invención comprende un enlazador. En ciertas de tales realizaciones, el enlazador está unido covalentemente al resto escindible. En ciertas de tales realizaciones, el enlazador está unido covalentemente al oligonucleótido antisentido. El enlazador está enlazado covalentemente a un resto dirigido a la célula.

[0198] El enlazador es un grupo lineal que comprende grupos alquilo, amida y éter. En ciertas realizaciones, el grupo lineal está unido covalentemente al resto dirigido a la célula y al resto escindible. En ciertas realizaciones, el grupo lineal está unido covalentemente al resto dirigido a la célula y al oligonucleótido antisentido.

[0199] El enlazador conjugado del compuesto de la invención tiene la estructura:



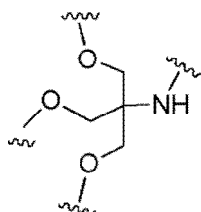
iv. Ciertos restos de direccionamiento celular

[0200] El grupo conjugado del compuesto de la invención comprende restos de direccionamiento celular. Ciertos restos de direccionamiento celular de este tipo aumentan la captación celular de compuestos antisentido. Los restos de direccionamiento celular comprenden un grupo de ramificación, tres correas y tres ligandos.

1. Ciertos grupos de ramificación

[0201] El grupo conjugado del compuesto de la invención comprende un resto dirigido que comprende un grupo de ramificación y tres ligandos unidos. El grupo de ramificación se adjunta covalentemente al enlazador. El grupo de ramificación está unido covalentemente al enlazador y a cada uno de los ligandos unidos.

[0202] El grupo de ramificación del compuesto de la invención tiene la estructura:



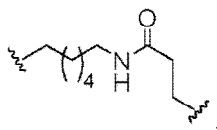
2. Ciertos amarres

[0203] El grupo conjugado del compuesto de la invención comprende tres ataduras unidas covalentemente al grupo de ramificación.

[0204] La atadura se une al grupo de ramificación a través de un grupo éter. La atadura se une al ligando a través de un grupo éter.

[0205] La atadura del compuesto de la invención tiene la estructura:

5

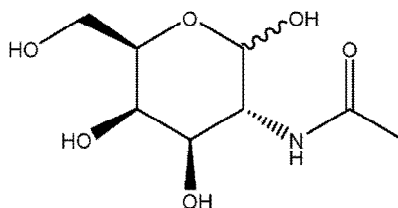


10 **3. Ciertos ligandos**

15 **[0206]** Cada ligando del compuesto de la invención se une covalentemente a una atadura. En ciertas realizaciones, cada ligando se selecciona para que tenga una afinidad por al menos un tipo de receptor en una célula diana. En ciertas realizaciones, se seleccionan ligandos que tienen una afinidad por al menos un tipo de receptor en la superficie de una célula de hígado de mamífero. En ciertas realizaciones, se seleccionan ligandos que tienen una afinidad por el receptor de asialoglicoproteína hepática (ASGP-R). En ciertas realizaciones de la presente divulgación, cada ligando es un carbohidrato. Cada ligando del compuesto de la invención es N-acetil galactoseamina (GalNAc). En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el resto dirigido comprende 3 ligandos. El resto de direccionamiento del compuesto de la invención comprende 3 ligandos de N-acetil galactoseamina.

20 **[0207]** En ciertas realizaciones, "GalNAc" o "Gal-NAC" se refiere a 2-(acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranos, comúnmente referida en la literatura como N-acetil galactosamina. En ciertas realizaciones, "N-acetil galactosamina" se refiere a 2-(acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranos. "GalNAc" o "Gal-NAC" del compuesto de la invención se refiere a 2-(acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranos, que está en la forma β : 2-(acetilamino)-2-desoxi- β -D-galactopiranos. Además de la presente invención, en el presente documento se describe la forma α : 2-(acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranos, que se describe a continuación como referencia.

30

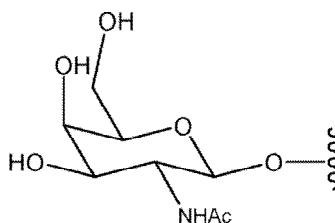


35

40 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranos

40

45

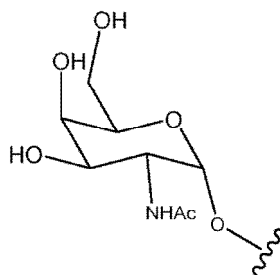


50

55 2-(Acetilamino)-2-desoxi- β -D-galactopiranos

55

60



65

2-(Acetilamino)-2-desoxi- α -D-galactopiranososa

i. Ciertos conjugados

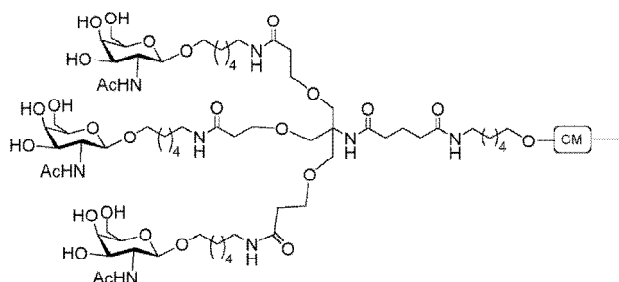
5 **[0208]** En ciertas realizaciones, los grupos conjugados comprenden las características estructurales anteriores que son consistentes con las reivindicaciones anexas.

[0209] En ciertas realizaciones de este tipo, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:

10

15

20

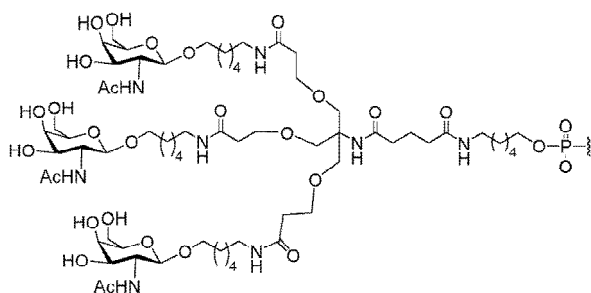


[0210] En ciertas realizaciones de este tipo, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:

25

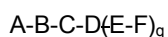
30

35



b. Ciertos compuestos antisentido conjugados

40 **[0211]** En ciertas realizaciones, los conjugados están unidos a un nucleósido del oligonucleótido antisentido en el 2', 3', de la posición 5' del nucleósido. El compuesto antisentido conjugado puede tener la siguiente estructura:

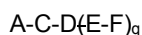


en donde

45

- A es el oligonucleótido antisentido;
- B es el resto escindible
- C es el enlazador conjugado
- D es el grupo de ramificación
- 40 cada E es una atadura;
- 45 cada F es un ligando; y
- 50 q es un número entero entre 1 y 5.

55 **[0212]** En ciertas realizaciones de la presente divulgación, un compuesto antisentido conjugado tiene la siguiente estructura:



en donde

60

- A es el oligonucleótido antisentido;
- C es el enlazador conjugado
- D es el grupo de ramificación
- 60 cada E es una atadura;
- 65 cada F es un ligando; y
- q es un número entero entre 1 y 5.

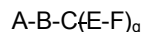
[0212] En ciertas realizaciones de este tipo, el enlazador conjugado comprende al menos un enlace escindible.

[0213] En ciertas realizaciones de este tipo, el grupo de ramificación comprende al menos un enlace escindible.

[0214] En ciertas realizaciones, cada atadura comprende al menos un enlace escindible.

En ciertas realizaciones, los conjugados están unidos a un nucleósido del oligonucleótido antisentido en la posición 2', 3', de 5' del nucleósido.

[0215] En ciertas realizaciones de la presente divulgación, un compuesto antisentido conjugado tiene la siguiente estructura:



en donde

A es el oligonucleótido antisentido;

B es el resto escindible

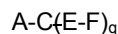
C es el enlazador conjugado

cada E es una atadura;

cada F es un ligando; y

q es un número entero entre 1 y 5.

En ciertas realizaciones, los conjugados están unidos a un nucleósido del oligonucleótido antisentido en la posición 2', 3', de 5' del nucleósido. En ciertas realizaciones de la presente divulgación, un compuesto antisentido conjugado tiene la siguiente estructura:



en donde

A es el oligonucleótido antisentido;

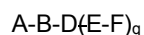
C es el enlazador conjugado

cada E es una atadura;

cada F es un ligando; y

q es un número entero entre 1 y 5.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, un compuesto antisentido conjugado tiene la siguiente estructura:



en donde

A es el oligonucleótido antisentido;

B es el resto escindible

D es el grupo de ramificación

cada E es una atadura;

cada F es un ligando; y

q es un número entero entre 1 y 5.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, un compuesto antisentido conjugado tiene la siguiente estructura:



en donde

A es el oligonucleótido antisentido;

D es el grupo de ramificación

cada E es una atadura;

cada F es un ligando; y

q es un número entero entre 1 y 5.

[0216] Patentes de Estados Unidos representativas, publicaciones de solicitud de Patente de EE.UU. y publicaciones de solicitud de patente internacional que enseñan la preparación de algunos de los conjugados

indicados anteriormente, compuestos antisentido conjugados, correas, ligadores, grupos de ramificación, ligandos, restos escindibles también como otras modificaciones incluyen, sin limitación, los documentos US 5,994,517, US 6,300,319, US 6,660,720, US 6,906,182, US 7,262,177, US 7,491,805, US 8,106,022, US 7,723,509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 y WO 2012/037354. Las publicaciones representativas que enseñan la preparación de algunos de los conjugados mencionados anteriormente, los compuestos antisentido conjugados, las correas, los enlazadores, los grupos de ramificación, los ligandos, los restos escindibles, así como otras modificaciones, incluyen sin limitación, BIESSEN et al., "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN et al., "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE et al., "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500, RENSEN et al., "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT et al., "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1999) 42:609-618, and Valentijn et al., "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" Tetrahedron, 1997, 53(2), 759-770.

[0217] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados comprenden un oligonucleótido basado en RNasa H (como un gápmero) o un oligonucleótido modulador de empalme (como un oligonucleótido completamente modificado) y cualquier grupo conjugado que comprende al menos uno, dos o tres grupos GalNAc. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado comprende cualquier grupo conjugado encontrado en cualquiera de las siguientes referencias: Lee, Carbohydr Res, 1978, 67, 509-514; Connolly y otros, J Biol Chem, 1982, 257, 939-945; Pavia et al., Int J Pep Protein Res, 1983, 22, 539-548; Lee et al., Biochem, 1984, 23, 4255-4261; Lee et al., Glycoconjugate J, 1987, 4, 317-328; Toyokuni et al., Tetrahedron Lett, 1990, 31, 2673-2676; Biessen y otros, J Med Chem, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn et al., Tetrahedron, 1997, 53, 759-770; Kim et al., Tetrahedron Lett, 1997, 38, 3487-3490; Lee et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 762-765; Kato et al., Glycobiol, 2001, 11, 821-829; Rensen et al., J Biol Chem, 2001, 276, 37577-37584; Lee et al., Methods Enzymol, 2003, 362, 38-43; Westerlind y otros, Glycoconj J, 2004, 21, 227-241; Lee et al., Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16 (19), 5132-5135; Maierhofer et al., Bioorg Med Chem, 2007, 15, 7661-7676; Khorev et al., Bioorg Med Chem, 2008, 16, 5216-5231; Lee et al., Bioorg Med Chem, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova et al., Analyt Biochem, 2012, 425, 43-46; Pujol y otros, Angew Chemie Int Ed Engl, 2012, 51, 7445-7448; Biessen y otros, J Med Chem, 1995, 38, 1846-1852; Sliedregt et al., J Med Chem, 1999, 42, 609-618; Rensen et al., J Med Chem, 2004, 47, 5798-5808; Rensen et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg y otros, Gene Ther, 2004, 11, 457-464; Sato y otros, J Am Chem Soc, 2004, 126, 14013-14022; Lee et al., J Org Chem, 2012, 77, 7564-7571; Biessen et al., FASEB J, 2000, 14, 1784-1792; Rajur et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 935-940; Duff et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297-321; Maier et al., Bioconjug Chem, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash et al., Org Lett, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12, 103-128; Merwin et al., Bioconjug Chem, 1994, 5, 612-620; Tomiya et al., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275-5281; Solicitudes internacionales WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; Patentes de Estados Unidos 4,751,219; 8,552,163; 6,908,903; 7,262,177; 5,994,517; 6,300,319; 8,106,022; 7,491,805; 7,491,805; 7,582,744; 8,137,695; 6,383,812; 6,525,031; 6,660,720; 7,723,509; 8,541,548; 8,344,125; 8,313,772; 8,349,308; 8,450,467; 8,501,930; 8,158,601; 7,262,177; 6,906,182; 6,620,916; 8,435,491; 8,404,862; 7,851,615; Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. Publicadas US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; y US2009/0203132.

C. Ciertos usos y características

[0218] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados exhiben una potente reducción del ARN del VHB in vivo. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido no conjugados se acumulan en el riñón. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados se acumulan en el hígado. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados son bien tolerados. Dichas propiedades hacen que los compuestos antisentido conjugados sean particularmente útiles para la inhibición de muchos ARN diana, incluidos, entre otros, aquellos involucrados en enfermedades, trastornos o afecciones metabólicas, cardiovasculares y de otro tipo. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar dichas enfermedades, trastornos o afecciones mediante el contacto de los tejidos del hígado con los compuestos antisentido conjugados dirigidos a los ARN asociados con

dichas enfermedades, trastornos o afecciones. Por lo tanto, también se describen métodos para mejorar cualquiera de una variedad de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y otras, trastornos o afecciones con los compuestos antisentido conjugados de la presente divulgación.

5 **[0219]** En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados son más potentes que sus homólogos no conjugados en una concentración de tejido particular. Sin desear estar limitado por ninguna teoría o mecanismo, en ciertas realizaciones, el conjugado puede permitir que el compuesto antisentido conjugado ingrese a la célula de manera más eficiente o que ingrese a la célula de manera más productiva. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados pueden exhibir una mayor reducción del objetivo en comparación con su contraparte no conjugada, en la que tanto el compuesto antisentido conjugado como su contraparte no conjugada están presentes en el tejido a las mismas concentraciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados pueden exhibir una mayor reducción del objetivo en comparación con su contraparte no conjugada, en donde tanto el compuesto antisentido conjugado como su contraparte no conjugada están presentes en el hígado a las mismas concentraciones.

15 **[0220]** La captación productiva y no productiva de oligonucleótidos se ha discutido anteriormente (Ver, por ejemplo, Geary, RS, E. Wancewicz, et al. (2009). "Effect of Dose and Plasma Concentration on Liver Uptake and Pharmacologic Activity of a 2'-Methoxyethyl Modified Chimeric Antisense Oligonucleotide Targeting PTEN." *Biochem. Pharmacol.* 78(3): 284-91; & Koller, E., T. M. Vincent, et al. (2011). "Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes." *Nucleic Acids Res.* 39(11): 4795-807). Los grupos de conjugados descritos aquí pueden mejorar la captación productiva.

25 **[0221]** En ciertas realizaciones, los grupos conjugados descritos en el presente documento pueden mejorar adicionalmente la potencia aumentando la afinidad del compuesto antisentido conjugado para un tipo particular de célula o tejido. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados descritos en el presente documento pueden mejorar adicionalmente la potencia al aumentar el reconocimiento del compuesto antisentido conjugado por uno o más receptores de la superficie celular. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados descritos en el presente documento pueden mejorar adicionalmente la potencia facilitando la endocitosis del compuesto antisentido conjugado.

30 **[0222]** En ciertas realizaciones, el resto escindible puede mejorar adicionalmente la potencia permitiendo que el conjugado se escinda del oligonucleótido antisentido después de que el compuesto antisentido conjugado haya entrado en la célula. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados pueden administrarse a dosis menores de las que serían necesarios para oligonucleótidos antisentido no conjugados.

35 **[0223]** Los enlaces de fosforotioato se han incorporado a oligonucleótidos antisentido previamente. Dichos enlaces fosforotioato son resistentes a las nucleasas y mejoran la estabilidad del oligonucleótido. Además, los enlaces de fosforotioato también se unen a ciertas proteínas, lo que resulta en la acumulación de oligonucleótido antisentido en el hígado. Los oligonucleótidos con menos enlaces fosforotioato se acumulan menos en el hígado y más en el riñón (ver, por ejemplo, Geary, R, "Pharmacokinetic Properties of 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotide Analogs in Rats," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 296, No. 3, 890-897; & *Pharmacological Properties of 2'-O-Methoxyethyl Modified Oligonucleotides in Antisense a Drug Technology*, Chapter 10, Crooke, S.T., ed., 2008). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos con menos enlaces internucleósido fosforotioato y más enlaces internucleósidos fosfodiéster se acumulan menos en el hígado y más en el riñón. Cuando se tratan enfermedades en el hígado, esto es indeseable por varias razones (1) menos medicamento está llegando al sitio de acción deseado (hígado); (2) la droga se escapa a la orina; y (3) el riñón está expuesto a una concentración relativamente alta de fármaco que puede producir toxicidad en el riñón. Por lo tanto, para las enfermedades del hígado, los enlaces de fosforotioato proporcionan beneficios importantes.

50 **[0224]** Sin embargo, en ciertas realizaciones, la administración de oligonucleótidos unidos uniformemente por enlaces de nucleótidos fosforotioato induce una o más reacciones proinflamatorias. (Véase, por ejemplo: *J Lab Clin Med.* 1996 Sep; 128 (3): 329-38, "Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides". Branda et al.; y consulte, por ejemplo: *Toxicologic Properties in Antisense a Drug Technology*, Capítulo 12, páginas 342-351, Crooke, ST, ed., 2008). En ciertas realizaciones, la administración de oligonucleótidos en donde la mayoría de los enlaces internucleosídicos comprende enlaces internucleósidos fosforotioato induce una o más reacciones proinflamatorias.

60 **[0225]** En ciertas realizaciones, el grado de efecto proinflamatorio puede depender de varias variables (p. ej., Modificación de la columna vertebral, efectos fuera del objetivo, modificaciones de la nucleobase y/o modificaciones de los nucleósidos) ver, por ejemplo: *Propiedades toxicológicas en tecnología antisentido de drogas*, Capítulo 12, páginas 342-351, Crooke, ST, ed., 2008). En ciertas realizaciones, el grado de efecto proinflamatorio puede mitigarse ajustando una o más variables. Por ejemplo, el grado de efecto proinflamatorio de un oligonucleótido dado puede mitigarse reemplazando cualquier número de enlaces nucleotídicos fosforotioato con enlaces internucleósidos fosfodiéster y reduciendo así el número total de enlaces internucleosídicos de fosforotioato.

65 **[0226]** En ciertas realizaciones, sería deseable reducir el número de enlaces de fosforotioato, si se pudiera hacer

esto sin perder estabilidad y sin cambiar la distribución del hígado al riñón. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el número de enlaces de fosforotioato puede reducirse reemplazando los enlaces de fosforotioato con enlaces de fosfodiéster. En una realización de este tipo, el compuesto antisentido que tiene menos enlaces fosforotioato y más enlaces fosfodiéster puede inducir menos reacciones proinflamatorias o ninguna reacción proinflamatoria. Aunque el compuesto antisentido que tiene menos enlaces fosforotioato y más enlaces fosfodiéster puede inducir menos reacciones proinflamatorias, el compuesto antisentido que tiene menos enlaces fosforotioato y más enlaces fosfodiéster puede no acumularse en el hígado y puede ser menos eficaz a la misma o similar dosis en comparación con un compuesto antisentido que tiene más enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, por lo tanto, es deseable diseñar un compuesto antisentido que tenga una pluralidad de enlaces fosfodiéster y una pluralidad de enlaces fosforotioato pero que también posea estabilidad y buena distribución en el hígado.

[0227] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados se acumulan más en el hígado y menos en el riñón que las contrapartes no conjugadas, incluso cuando algunos de los enlaces de fosforotioato se reemplazan con enlaces internucleosídicos fosfodiéster menos inflamatorios. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados se acumulan más en el hígado y no se excretan tanto en la orina en comparación con sus homólogos no conjugados, incluso cuando algunos de los enlaces de fosforotioato se reemplazan con enlaces internucleosídicos de fosfodiéster menos inflamatorios. En ciertas realizaciones, el uso de un conjugado permite diseñar fármacos antisentido más potentes y mejor tolerados. De hecho, en ciertos procesos, los compuestos antisentido conjugados tienen índices terapéuticos más grandes que las contrapartes no conjugadas. Esto permite que el compuesto antisentido conjugado se administre a una dosis absoluta más alta, porque hay menos riesgo de respuesta proinflamatoria y menos riesgo de toxicidad renal. Esta dosis más alta permite una dosis menos frecuente, ya que se espera que el aclaramiento (metabolismo) sea similar. Además, debido a que el compuesto es más potente, como se describió anteriormente, se puede permitir que la concentración disminuya antes de la siguiente dosis sin perder actividad terapéutica, lo que permite períodos incluso más largos entre la dosificación.

[0228] En ciertas realizaciones, la inclusión de algunos enlaces de fosforotioato sigue siendo deseable. Por ejemplo, los enlaces terminales son vulnerables a las exonucleasas y, por lo tanto, en ciertas realizaciones, esos enlaces son fosforotioato u otro enlace modificado. Los enlaces internucleosídicos que unen dos desoxinucleósidos son vulnerables a las endonucleasas y, por lo tanto, en ciertas realizaciones, esos enlaces son fosforotioato u otro enlace modificado. Los enlaces internucleosídicos entre un nucleósido modificado y un desoxinucleósido donde el desoxinucleósido está en el lado 5' del enlace, los desoxinucleósidos son vulnerables a las endonucleasas y, por lo tanto, en ciertas realizaciones, esos enlaces son fosforotioato u otro enlace modificado. Los enlaces internucleosídicos entre dos nucleósidos modificados de ciertos tipos y entre un desoxinucleósido y un nucleósido modificado de cierto tipo donde el nucleósido modificado está en el lado 5' del enlace son lo suficientemente resistentes a la digestión por nucleasas, de modo que el enlace puede ser fosfodiéster.

[0229] En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 16 enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 15 enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 14 enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 13 enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 12 enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 11 enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 10 enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 9 enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido de un compuesto antisentido conjugado comprende menos de 8 enlaces de fosforotioato.

[0230] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que comprenden uno o más grupos de espumas descritos en el presente documento tienen una actividad y/o potencia y/o tolerabilidad aumentadas en comparación con un compuesto antisentido original que carece de uno o más grupos conjugados. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, es deseable la unión de tales grupos conjugados a un oligonucleótido. Dichos grupos conjugados pueden unirse al extremo 5' y/o 3' de un oligonucleótido. En ciertos casos, el apego en el extremo 5' es sintéticamente deseable. Típicamente, los oligonucleótidos se sintetizan mediante la unión del nucleósido terminal 3' a un soporte sólido y el acoplamiento secuencial de nucleósidos de 3' a 5' usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Por consiguiente, si se desea un grupo conjugado en el extremo 3', se puede (1) unir el grupo conjugado al nucleósido terminal 3' y unir ese nucleósido conjugado al soporte sólido para la preparación posterior del oligonucleótido o (2) unir el grupo conjugado al nucleósido 3' terminal de un oligonucleótido completado después de la síntesis. Ninguno de estos enfoques es muy eficiente y, por lo tanto, ambos son costosos. En particular, la unión del nucleósido conjugado al soporte sólido, aunque se demuestra en los Ejemplos de este documento, es un proceso ineficiente. En ciertas realizaciones, unir un grupo conjugado al nucleósido 5' terminal es sintéticamente más fácil que el acoplamiento en el extremo 3'. Uno puede unir un nucleósido terminal 3' no conjugado al soporte sólido y preparar el oligonucleótido usando reacciones estándar y bien caracterizadas. Entonces, solo se necesita unir un nucleósido 5' que tenga un grupo conjugado en la etapa de acoplamiento final. En ciertas realizaciones, esto es más eficaz que unir un nucleósido conjugado directamente al soporte sólido como se hace típicamente para

preparar un oligonucleótido conjugado en 3'. Los ejemplos en este documento demuestran el apego en el extremo 5'. Además, ciertos grupos conjugados tienen ventajas sintéticas. Por ejemplo, ciertos grupos conjugados que comprenden grupos de enlace de fósforo son sintéticamente más simples y más eficientemente preparados que otros grupos conjuntivos, incluidos los grupos conjugados informados anteriormente (por ejemplo, WO/2012/037254).

[0231] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido conjugados se administran a un sujeto. En dichas formas de realización, los compuestos antisentido que comprenden uno o más grupos de espumas descritos en el presente documento tienen mayor actividad y/o potencia y/o tolerabilidad en comparación con un compuesto antisentido original que carece de uno o más grupos conjugados. Sin estar limitado por el mecanismo, se cree que el grupo conjugado ayuda con la distribución, el suministro y/o la absorción en una célula o tejido objetivo. En ciertas realizaciones, una vez dentro de la célula o tejido objetivo, es deseable que todo o parte del grupo conjugado se escinda para liberar el oligonucleo activo. En ciertas realizaciones, no es necesario que todo el grupo conjugado se escinda del oligonucleo. Por ejemplo, en el Ejemplo 20 se administró un oligonucleo conjugado a ratones y se detectaron varias especies químicas diferentes, cada una de las cuales comprende una porción diferente del grupo conjugado que permanece en el oligonucleo (Tabla 10a). Este compuesto antisentido conjugado demostró una buena potencia (Tabla 10). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, dicho perfil de metabolito de escisión parcial múltiple del grupo conjugado no interfiere con la actividad/potencia. Sin embargo, en ciertas realizaciones, es deseable que un profármaco (oligonucleo conjugado) produzca un único compuesto activo. En ciertos casos, si se encuentran múltiples formas del compuesto activo, puede ser necesario determinar las cantidades relativas y las actividades para cada uno. En ciertas realizaciones donde se requiere una revisión regulatoria (por ejemplo, USFDA o contraparte) es deseable tener una sola especie activa (o predominantemente única). En ciertas de tales realizaciones, es deseable que tales especies activas únicas sean el oligonucleo antisentido que carezca de cualquier porción del grupo conjugado. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados en el extremo 5' tienen más probabilidades de dar como resultado un metabolismo completo del grupo conjugado. Sin estar limitado por el mecanismo, puede ser que las enzimas endógenas responsables del metabolismo en el extremo 5' (por ejemplo, las nucleasas 5') sean más activas/eficientes que las contrapartes 3'. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados específicos son más susceptibles al metabolismo de una sola especie activa. En ciertas realizaciones, ciertos grupos conjugados son más susceptibles al metabolismo del oligonucleo.

D. Antisentido

[0232] En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación son compuestos antisentido. En tales realizaciones, el compuesto oligomérico es complementario a un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico diana es un ARN. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico diana es un ARN no codificante. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico diana codifica una proteína. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico diana se selecciona de un mRNA, un pre mRNA, un microRNA, un RNA no codificante, incluyendo un RNA pequeño no codificante, y un RNA dirigido por un promotor. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son al menos parcialmente complementarios con más de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, los compuestos oligoméricos pueden ser imitadores de microARN, que típicamente se unen a múltiples dianas.

[0233] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden una porción que tiene una secuencia de nucleobases al menos en un 70% complementaria a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden una porción que tiene una secuencia de nucleobases al menos 80% complementaria a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden una porción que tiene una secuencia de nucleobases al menos 90% complementaria a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden una porción que tiene una secuencia de nucleobases al menos 95% complementaria a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden una porción que tiene una secuencia de nucleobases al menos 98% complementaria a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden una porción que tiene una secuencia de nucleobases que es 100% complementaria a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 100% complementarios a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico diana en toda la longitud del compuesto antisentido.

[0234] Los mecanismos antisentido incluyen cualquier mecanismo que implique la hibridación de un compuesto oligomérico con ácido nucleico diana, en el que la hibridación da como resultado un efecto biológico. En ciertas realizaciones, dicha hibridación da como resultado una degradación u ocupación del ácido nucleico diana con la inhibición o estimulación concomitante de la maquinaria celular que implica, por ejemplo, traducción, transcripción o poliadenilación del ácido nucleico diana o de un ácido nucleico con el que el nucleico diana de lo contrario el ácido puede interactuar.

[0235] Un tipo de mecanismo antisentido que implica la degradación del ARN diana es el antisentido mediado por la RNasa H. RNasa H es una endonucleasa celular que corta la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Se sabe en la técnica que los compuestos antisentido monocatenarios que son "similares a ADN" provocan la actividad de la

ARNasa H en células de mamíferos. La activación de la ARNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana del ARN, lo que mejora considerablemente la eficacia de la inhibición de la expresión génica mediada por oligonucleótidos similar al ADN.

5 **[0236]** Los mecanismos antisentido también incluyen, sin limitación, mecanismos de ARNi, que utilizan la ruta RISC. Dichos mecanismos de ARNi incluyen, sin limitación, mecanismos de ARNip, ssRNA y microRNA. Tales mecanismos incluyen la creación de un imitador de microARN y/o un anti-microARN.

10 **[0237]** Los mecanismos antisentido también incluyen, sin limitación, mecanismos que hibridan o imitan ARN no codificante distinto de microARN o ARNm. Dicho ARN no codificante incluye, pero no se limita a, ARN dirigido por promotor y ARN corto y largo que efectúa la transcripción o traducción de uno o más ácidos nucleicos.

15 **[0238]** En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos que comprenden conjugados descritos en el presente documento son compuestos de ARNi. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos oligoméricos que comprenden conjugados descritos en el presente documento son compuestos de ARNbc. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos que comprenden conjugados descritos en el presente documento se emparejan con un segundo compuesto oligomérico para formar un ARNip. En ciertas de tales realizaciones, el segundo compuesto oligomérico también comprende un conjugado. En ciertas realizaciones, el segundo compuesto oligomérico es cualquier ácido nucleico modificado o no modificado. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos que comprenden conjugados descritos en el presente documento son la cadena antisentido en un compuesto de ARNsi. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos que comprenden conjugados descritos en el presente documento son la cadena con sentido en un compuesto de ARNsi. En realizaciones en las que el compuesto oligomérico conjugado es siRNA de doble cadena, el conjugado puede estar en la cadena de sentido, la cadena antisentido o tanto la cadena de sentido como la cadena antisentido.

25 **D. Ácidos nucleicos, regiones y segmentos diana**

30 **[0239]** En ciertas realizaciones de la divulgación, los compuestos antisentido conjugados se dirigen a cualquier ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico diana codifica una proteína diana que es clínicamente relevante. En tales realizaciones, la modulación del ácido nucleico diana da como resultado un beneficio clínico. El ácido nucleico diana de la presente invención se ilustra en la Tabla 1.

Tabla 1: Ciertos ácidos nucleicos diana

Diana	Especies	GENBANK® N° de acceso	SEQ ID NO
HBV	Humanos	U95551.1	1

40 **[0240]** El proceso de direccionamiento generalmente incluye la determinación de al menos una región, segmento o sitio diana dentro del ácido nucleico diana para que se produzca la interacción antisentido de manera que se produzca el efecto deseado.

45 **[0241]** En ciertas realizaciones, una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de este tipo, una región diana puede abarcar una UTR 3', una UTR 5', un exón, un intrón, una región codificante, una región de iniciación de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región del ácido nucleico definido o segmento diana.

50 **[0242]** En ciertas realizaciones, un segmento diana es al menos aproximadamente una porción de 8 nucleobases de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido conjugado. Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos 8 nucleobases consecutivas del término 5' de uno de los segmentos diana (las nucleobases restantes son un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente corriente arriba del término 5' del segmento diana y continuando hasta que el ADN o ARN comprenda de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 nucleobases). Los segmentos diana también están representados por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos 8 nucleobases consecutivas del extremo 3' de uno de los segmentos diana (las nucleobases restantes son un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente después del término 3' del segmento diana y continúa hasta que el ADN o el ARN comprende aproximadamente 8 a aproximadamente 30 nucleobases). Los segmentos diana también pueden representarse por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos 8 nucleobases consecutivas de una parte interna de la secuencia de un segmento diana, y pueden extenderse en una o ambas direcciones hasta que el compuesto antisentido conjugado comprende aproximadamente 8 a aproximadamente 30 nucleobases.

65 **[0243]** En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos al ácido nucleico listado en la Tabla 1 pueden modificarse como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido pueden tener un resto de azúcar modificado, un resto de azúcar no modificado o una mezcla de restos de azúcar modificado y no modificado como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, los compuestos

antisentido pueden tener un enlace internucleósido modificado, un enlace internucleósido no modificado o una mezcla de enlaces internucleósido modificados y no modificados como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido pueden tener una nucleobase modificada, una nucleobase no modificada o una mezcla de nucleobases modificadas y no modificadas como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido pueden tener un motivo como se describe en el presente documento.

[0244] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos al ácido nucleico listado en la Tabla 1 pueden conjugarse como se describe en el presente documento.

1. Hepatitis B (VHB)

[0245] La hepatitis B es una enfermedad viral transmitida por vía parenteral por material contaminado como sangre y productos sanguíneos, agujas contaminadas, sexual y verticalmente de madres infectadas o portadoras a su descendencia. La Organización Mundial de la Salud estima que más de 2 mil millones de personas han sido infectadas en todo el mundo, con aproximadamente 4 millones casos por año, 1 millón de muertes por año y 350-400 millones de portadores crónicos (Organización Mundial de la Salud: Prevalencia geográfica de prevalencia de hepatitis B, 2004, <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm>).

[0246] El virus, el VHB, es un virus hepatotrópico de doble cadena que infecta solo a humanos y primates no humanos. La replicación viral tiene lugar predominantemente en el hígado y, en menor medida, en los riñones, el páncreas, la médula ósea y el bazo (biología del virus de la hepatitis B. Microbiol Mol Biol Rev. 64: 2000; 51-68). Los marcadores víricos e inmunitarios son detectables en la sangre y los patrones característicos de antígeno-anticuerpo evolucionan con el tiempo. El primer marcador viral detectable es el HBsAg, seguido del antígeno de la hepatitis B e (HBeAg) y el ADN del VHB. Los títulos pueden ser altos durante el período de incubación, pero los niveles de ADN y HBeAg del VHB comienzan a disminuir al comienzo de la enfermedad y pueden ser indetectables en el momento de la enfermedad clínica máxima (infección natural por el virus de la hepatitis B y sus consecuencias clínicas. N Engl J Med. 350: 2004; 1118-1129). HBeAg es un marcador viral detectable en la sangre y se correlaciona con la replicación viral activa y, por lo tanto, con alta carga viral e infectividad (el antígeno de la hepatitis B es el peligroso juego final de la hepatitis B. N Engl J Med. 347: 2002; 208-210). La presencia de anti-HBsAb y anti-HBcAb (IgG) indica recuperación e inmunidad en un individuo previamente infectado.

[0247] Actualmente, las terapias recomendadas para la infección crónica por VHB por parte de la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD) y la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) incluyen interferón alfa (INF α), interferón pegilado alfa-2a (Peg-IFN2a), entecavir y tenofovir. Las terapias de nucleósidos y nucleobases, entecavir y tenofovir, tienen éxito para reducir la carga viral, pero las tasas de seroconversión de HBeAg y la pérdida de HBsAg son incluso más bajas que las obtenidas con la terapia con INF α . También se utilizan otras terapias similares, que incluyen lamivudina (3TC), telbivudina (LdT) y adefovir, pero para las terapias de nucleósidos/nucleobases en general, la aparición de resistencia limita la eficacia terapéutica.

[0248] Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de descubrir y desarrollar nuevas terapias antivirales. Además, existe la necesidad de nuevas terapias contra el VHB capaces de aumentar las tasas de seroconversión de HBeAg y HBsAg. Investigaciones clínicas recientes han encontrado una correlación entre la seroconversión y las reducciones de HBeAg (Fried et al (2008) Hepatology 47: 428) y las reducciones de HBsAg (Moucari et al (2009) Hepatology 49: 1151). Las reducciones en los niveles de antígenos pudieron haber permitido el control inmunológico de la infección por VHB porque se cree que los niveles altos de antígenos inducen tolerancia inmunológica. Las terapias actuales de nucleósidos para el VHB son capaces de reducciones drásticas en los niveles séricos del VHB, pero tienen poco impacto en los niveles de HBeAg y HBsAg.

[0249] Los compuestos antisentido dirigidos contra el VHB se han descrito previamente en los documentos WO2011/047312, WO2012/145674 y WO2012/145697. Se planifican estudios clínicos para evaluar el efecto de los compuestos antisentido dirigidos al VHB en pacientes. Sin embargo, todavía existe la necesidad de proporcionar a los pacientes opciones de tratamiento adicionales y más potentes.

Ciertos compuestos antisentido conjugados dirigidos a un ácido nucleico del VHB

[0250] En ciertas realizaciones de la presente divulgación, los compuestos antisentido conjugados se dirigen a un ácido nucleico del VHB que tiene la secuencia del N° de Acceso U95551.1 de GENBANK®, incorporado aquí como SEQ ID NO: 1. En ciertas tales realizaciones, un conjugado el compuesto antisentido dirigido a la SEQ ID NO: 1 es al menos el 90%, al menos el 95%, o el 100% complementario a la SEQ ID NO: 1.

[0251] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una Secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 3.

[0252] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al

menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una Secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 4.

5 **[0253]** En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 5. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una Secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 5.

10 **[0254]** En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 6. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una Secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 6.

15 **[0255]** En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 7. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una Secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 7.

[0256] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una Secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 8.

20 **[0257]** En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 9. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una Secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 9.

25 **[0258]** En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 10. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 10.

30 **[0259]** En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende al menos 8 secuencias de nucleobases consecutivas de la SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 comprende una Secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 11.

Tabla 2: Compuestos antisentido dirigidos a HBV SEQ ID NO: 1

ISIS Nº	Sitio de inicio diana	Secuencia (5'-3')	Motivo	SEQ ID NO
35 505358	1583	GCAGAGGTGAAGCGAAGTGC	eeeeeddddddddeeeee	3
509934	1780	CCAATTTATGCCTACAGCCT	eeeeeddddddddeeeee	4
510100	411	GGCATAGCAGCAGGATG	eeddddddddeeeee	5
552023	1266	AGGAGTTCGCGAGTATGGAT	eeeeeddddddddeeeee	6
40 552024	1577	GTGAAGCGAAGTGCACACGG	eeeeeddddddddeeeee	7
552032	1585	GTGCAGAGGTGAAGCGAAGT	eeeeeddddddddeeeee	8
552859	1583	AGGTGAAGCGAAGTGC	ekkkdddddddkke	9
552925	1264	TCCGCGAGTATGGATCG	ekkkddddddkkeke	10
45 577119	1780	AATTTATGCCTACAGCCT	kdkkdddddddeeeee	11

[0260] En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 505358 y un grupo conjugado. ISIS 505358 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: Ges mCes Aes Ges Aes Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Aes Ges Tes Ges mCe, en donde,

50 A = una adenina,

mC = una 5'-metilcitosina

55 G = una guanina,

T = una timina,

e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

60 d = un 2'-desoxinucleósido, y

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

65 **[0261]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 509934 y un grupo conjugado. ISIS 509934 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: mCes mCes Aes Aes Tes Tds Tds Ads Tds Gds

mCds mCds Tds Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, en donde

A = una adenina,

5 mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

10 T = una timina,

e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

d = un 2'-desoxinucleósido, y

15 s = un enlace internucleósido fosforotioato.

[0262] En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 510100 y un grupo conjugado. ISIS 510100 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: Ges Ges mCes Ads Tds Ads Gds mCds Ads Gds mCds Ads Gds Ges Aes Tes Ge, en donde,

20 A = una adenina,

mC = una 5'-metilcitosina

25 G = una guanina,

T = una timina,

30 e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

d = un 2'-desoxinucleósido, y

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

35 **[0263]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 552023 y un grupo conjugado. ISIS 552023 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: Aes Ges Ges Aes Ges Tes Tds mCds mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Ges Ges Ges Aes Te, en donde,

40 A = una adenina,

mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

45 T = una timina,

e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

50 d = un 2'-desoxinucleósido, y

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

[0264] En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 552024 y un grupo conjugado. ISIS 552024 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: Ges Tes Ges Aes Aes Ges mCds Gds Ads Ads Gds Tds Gds mCds Ads mCds Aes mCes Ges Ge, en donde,

60 A = una adenina,

mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

T = una timina,

65 e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

d = un 2'-desoxinucleósido, y

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

5 **[0265]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 552032 y un grupo conjugado. ISIS 552032 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: Ges Tes Ges mCes Aes Ges Ads Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Aes Aes Ges Te, en donde,

A = una adenina,

10 mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

15 T = una timina,

e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

20 d = un 2'-desoxinucleósido, y

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

25 **[0266]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 552859 y un grupo conjugado. ISIS 552859 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: Aes Gks Gks Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Ads Gds Tks Gks mCe, en donde,

A = una adenina,

30 mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

T = una timina,

35 e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

k = un nucleósido modificado cEt,

40 d = un 2'-desoxinucleósido, y

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

45 **[0267]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 552925 y un grupo conjugado. ISIS 552925 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: Tes mCks mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Gds Gds Aks Tes mCks Ge, en donde

A = una adenina,

50 mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

T = una timina,

55 e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

k = un nucleósido modificado cEt,

60 d = un 2'-desoxinucleósido, y

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

65 **[0268]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 577119 y un grupo conjugado. ISIS 577119 es un oligonucleótido modificado que tiene la fórmula: Aks Ads Tks Tds Tks Ads Tds Gds mCds mCds Tds

Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, en donde,

A = una adenina,

5 mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

T = una timina,

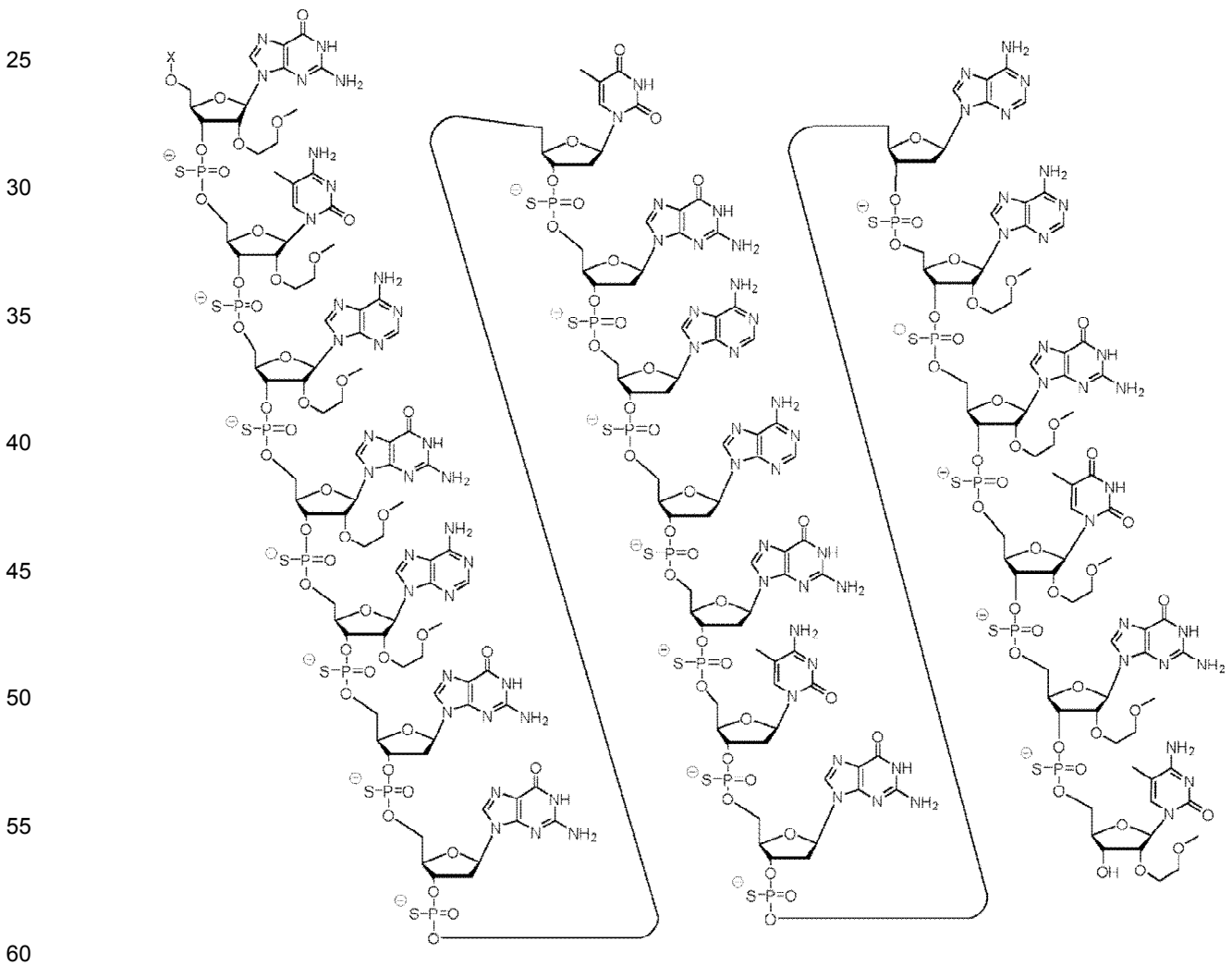
10 e = un nucleósido modificado con 2'-O-metoxietilo,

k = un nucleósido modificado cEt,

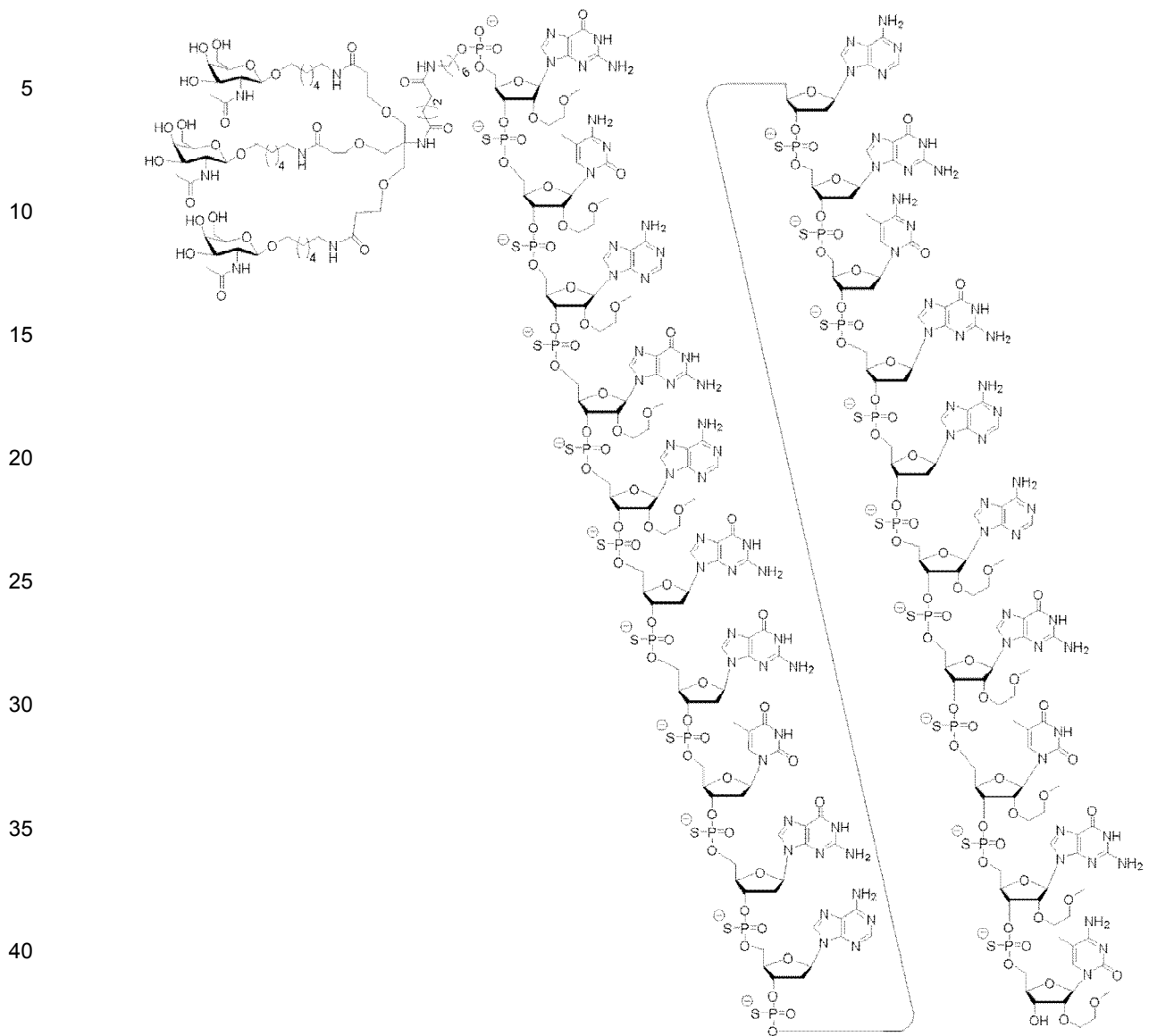
15 d = un 2'-desoxinucleósido, y

s = un enlace internucleósido fosforotioato.

20 **[0269]** En ciertas realizaciones, un compuesto que tiene la siguiente estructura química comprende o consiste en ISIS 505358 con un 5'-X, en donde X es un grupo conjugado como se define en las reivindicaciones:



65 **[0270]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 712408 que tiene la siguiente estructura química:



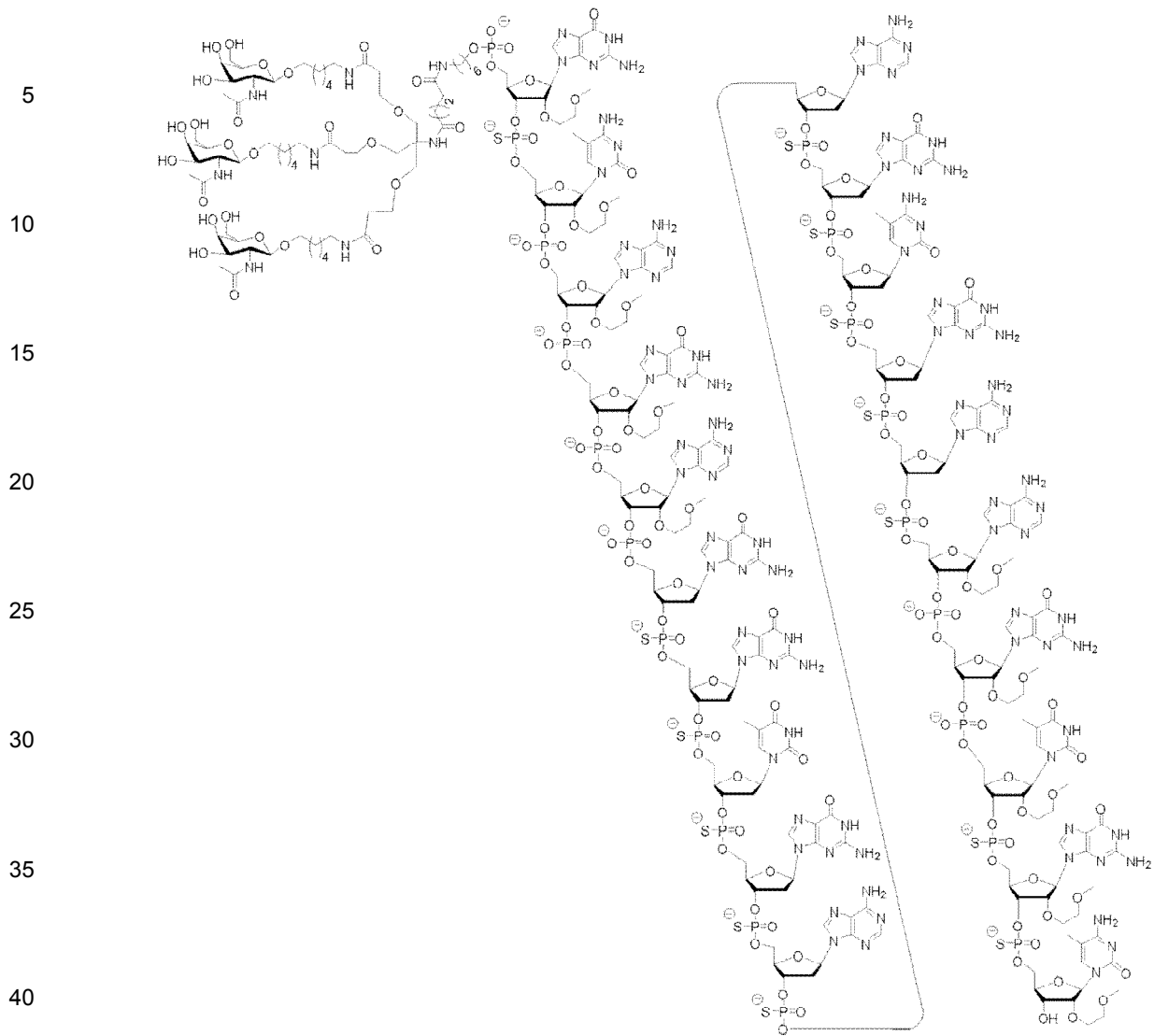
45 **[0271]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en ISIS 695324 que tiene la siguiente estructura química:

50

55

60

65



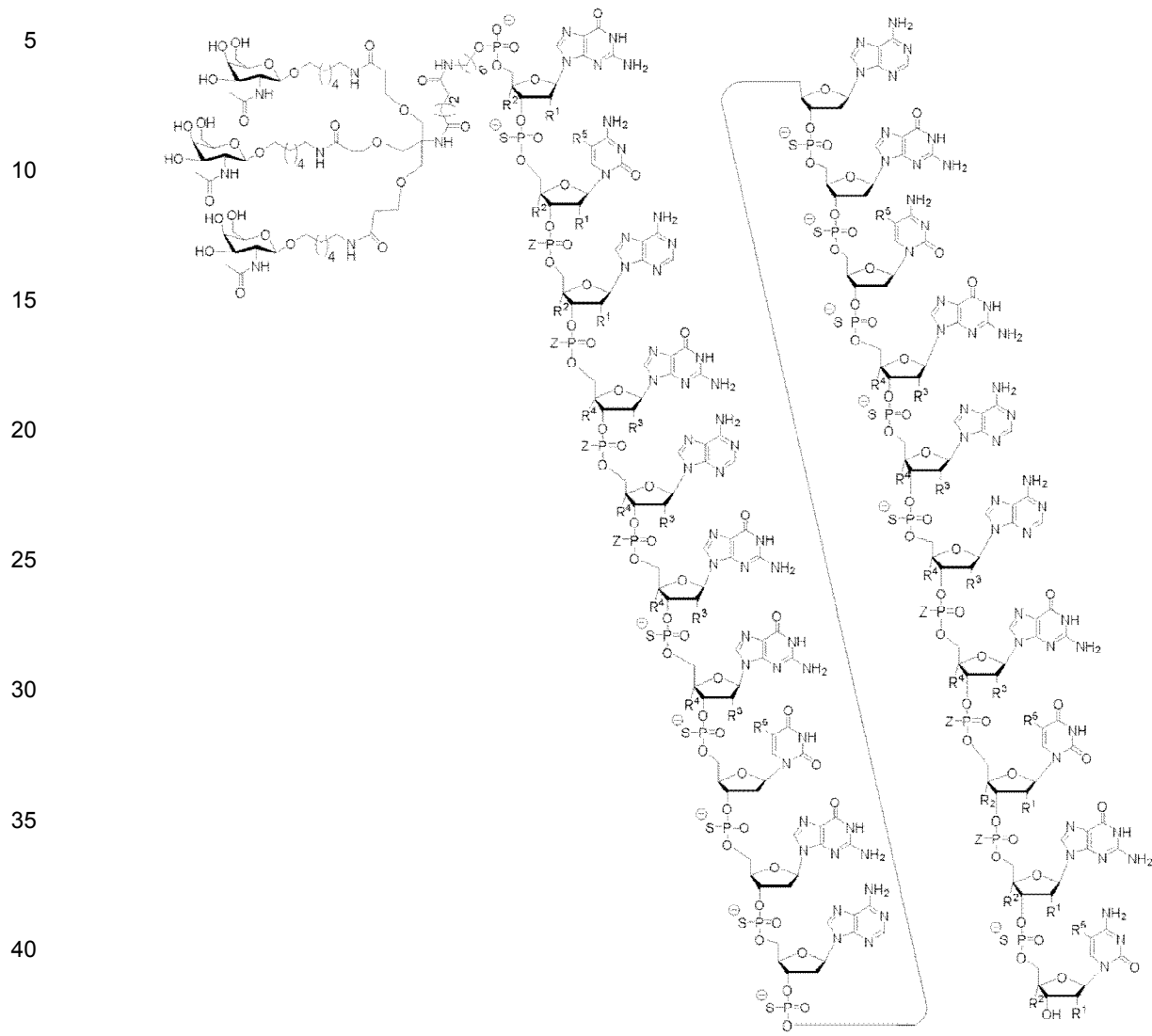
45 **[0272]** En ciertas realizaciones, un compuesto comprende o consiste en la SEQ ID NO: 3, 5'-GalNAc, y modificaciones químicas representadas por la siguiente estructura química:

50

55

60

65



45 en donde R¹ es -OCH₂CH₂OCH₃ (MOE) y R² es H; o R¹ y R² juntos forman un puente, en donde R¹ es -O- y R² es -CH₂-, -CH(CH₃)-, o -CH₂CH₂-, y R¹ y R² están conectados directamente de manera que el puente resultante se selecciona de: -O-CH₂-, -O-CH(CH₃)-, y -O-CH₂CH₂-;

50 y para cada par de R³ y R⁴ en el mismo anillo, independientemente de cada anillo: R³ se selecciona de H y -OCH₂CH₂OCH₃ y R⁴ es H; o R³ y R⁴ juntos forman un puente, en donde R³ es -O-, y R⁴ es -CH₂-, -CH(CH₃)-, o -CH₂CH₂- y R³ y R⁴ están conectados directamente de tal manera que el puente resultante se selecciona de: -O-CH₂-, -O-CH(CH₃)-, y -O-CH₂CH₂-;

55 y R⁵ se selecciona de H y -CH₃;

y Z se selecciona de S- y O-.

Indicaciones terapéuticas de HB V

60 **[0273]** En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para usar un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico de HBV para modular la expresión de HBV en un sujeto. En ciertas realizaciones, se reduce la expresión de VHB.

65 **[0274]** En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para usar un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico de VHB en una composición farmacéutica para tratar a un sujeto. En ciertas

realizaciones, el sujeto tiene una afección relacionada con el VHB. En ciertas realizaciones, la afección relacionada con el VHB incluye, pero no se limita a, infección crónica por VHB, inflamación, fibrosis, cirrosis, cáncer de hígado, hepatitis sérica, ictericia, cáncer de hígado, inflamación del hígado, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática. Enfermedad inflamatoria hepatocelular difusa, síndrome hemofagocítico, hepatitis sérica y viremia por VHB. En ciertas realizaciones, la afección relacionada con el VHB puede tener síntomas que pueden incluir cualquiera o todos los siguientes: enfermedad similar a la gripe, debilidad, dolores, dolor de cabeza, fiebre, pérdida de apetito, diarrea, ictericia, náuseas y vómitos, dolor sobre la área del hígado del cuerpo, heces de color arcilla o gris, picor en todo el cuerpo, y orina de color oscuro, cuando se combina con una prueba positiva de la presencia de un virus de la hepatitis B, un antígeno viral de la hepatitis B o una prueba positiva para la presencia de un anticuerpo específico para un antígeno viral de la hepatitis B. En ciertas realizaciones, el sujeto está en riesgo de una afección relacionada con el VHB. Esto incluye a los sujetos que tienen uno o más factores de riesgo para desarrollar una afección relacionada con el VHB, incluida la exposición sexual a un individuo infectado con el virus de la hepatitis B, que viven en la misma casa que un individuo con una infección por el virus de la hepatitis B de por vida, la exposición a sangre humana infectada con el virus de la hepatitis B, la inyección de drogas ilícitas, ser una persona que tiene hemofilia y visitar un área donde la hepatitis B es común. En ciertas realizaciones, el sujeto ha sido identificado como necesitado de tratamiento para una afección relacionada con el VHB.

[0275] Ciertas realizaciones de la presente divulgación proporcionan un método para reducir los niveles de antígeno de VHB ADN y/o VHB en un animal infectado con VHB que comprende administrar al animal un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico de VHB. En ciertas realizaciones, el antígeno es HBsAG o HBeAG. En ciertas realizaciones, la cantidad de antígeno de HBV puede reducirse suficientemente para dar como resultado la seroconversión.

[0276] En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para usar un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico de HBV en la preparación de un medicamento.

[0277] En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico del VHB, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.

[0278] Ciertas realizaciones de la presente divulgación proporcionan un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico del VHB para su uso en el tratamiento de una afección relacionada con el VHB. La afección relacionada con el VHB incluye, pero no se limita a, infección crónica por VHB, inflamación, fibrosis, cirrosis, cáncer de hígado, hepatitis sérica, ictericia, cáncer de hígado, inflamación del hígado, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, enfermedad inflamatoria hepatocelular difusa, síndrome hemofagocítico, hepatitis sérica y viremia por VHB.

[0279] Ciertas realizaciones de la presente divulgación proporcionan un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico del VHB para su uso en la reducción de los niveles de antígeno VHB ADN y/o VHB en un animal infectado con VHB que comprende administrar al animal un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico del VHB. En ciertas realizaciones, el antígeno es HBsAG o HBeAG. En ciertas realizaciones, la cantidad de antígeno de HBV puede reducirse suficientemente para dar como resultado la seroconversión.

[0280] Se entenderá que cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento se puede usar en los métodos y usos mencionados anteriormente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la presente divulgación, un compuesto antisentido conjugado dirigido a un ácido nucleico del VHB en los métodos y usos mencionados anteriormente puede incluir, pero no se limita a, un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 que comprende al menos un 8 secuencias de nucleobases consecutivas de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-11; un compuesto antisentido conjugado dirigido a la SEQ ID NO: 1 que comprende una secuencia de nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-11; un compuesto que comprende o consiste en ISIS 505358, ISIS 509934, ISIS 510100, ISIS 552023, ISIS 552024, ISIS 552032, ISIS 552859, ISIS 552925 o ISIS 577119 y un grupo conjugado.

E. Ciertas composiciones farmacéuticas

[0281] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos antisentido de acuerdo con la invención. En ciertas realizaciones, dicha composición farmacéutica comprende un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende una solución salina estéril y uno o más compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, dicha composición farmacéutica consiste en una solución salina estéril y uno o más compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, la solución salina estéril es solución salina de calidad farmacéutica. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende uno o más compuestos antisentido y agua estéril. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica consiste en uno o más compuestos antisentido y agua estéril. En ciertas realizaciones, la solución salina estéril es agua de calidad farmacéutica. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende uno o más compuestos antisentido y solución salina tamponada con fosfato (PBS). En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica consiste en uno o más compuestos antisentido y solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS). En ciertas realizaciones, la solución salina estéril es PBS de grado farmacéutico.

5 **[0282]** En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido pueden mezclarse con sustancias activas y/o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas depende de una serie de criterios, que incluyen, entre otros, la vía de administración, el grado de la enfermedad o la dosis que se administrará.

10 **[0283]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualesquiera sales, ésteres o sales farmacéuticamente aceptables de tales ésteres. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido comprenden uno o más oligonucleótidos que, tras la administración a un animal, incluido un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la descripción también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio y potasio.

15 **[0284]** Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un oligonucleótido que se escinden por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el oligonucleótido antisentido activo.

20 **[0285]** Los restos de lípidos se han usado en terapias de ácidos nucleicos en una variedad de métodos. En ciertos de tales métodos, el ácido nucleico se introduce en liposomas preformados o lipoplexas hechas de mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. En ciertos métodos, los complejos de ADN con lípidos mono- o policatiónicos se forman sin la presencia de un lípido neutro. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a una célula o tejido particular. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico al tejido graso. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico al tejido muscular.

25 **[0286]** En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento comprenden uno o más oligo-nucleótidos modificados y uno o más excipientes. En ciertas de tales realizaciones, los excipientes se seleccionan de agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

30 **[0287]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende un sistema de administración. Los ejemplos de sistemas de administración incluyen, pero no se limitan a, liposomas y emulsiones. Ciertos sistemas de administración son útiles para preparar ciertas composiciones farmacéuticas que incluyen aquellas que comprenden compuestos hidrófobos. En ciertas realizaciones, se usan ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido.

35 **[0288]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende una o más moléculas de administración específicas de tejido diseñadas para administrar el uno o más agentes farmacéuticos de la presente divulgación a tejidos específicos o tipos de células. Por ejemplo. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas recubiertos con un anticuerpo específico de tejido.

40 **[0289]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende un sistema de co-disolvente. Algunos de tales sistemas de co-disolventes comprenden, por ejemplo, alcohol bencílico, un tensoactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. En ciertas realizaciones, tales sistemas de co-disolventes se utilizan para compuestos hidrófobos. Un ejemplo no limitativo de tal sistema de co-solvente es el sistema de co-solvente de VPD, que es una solución de etanol absoluto que contiene 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del agente tensoactivo no polar Polisorbato 80TM y 65% p/v polietilenglicol 300. Las proporciones de tales sistemas de co-solventes pueden variar considerablemente sin alterar significativamente sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes del co-disolvente puede variar: por ejemplo, se pueden usar otros agentes en lugar de Polisorbato 80TM; el tamaño de la fracción de polietilenglicol puede variar; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, por ejemplo, polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir la dextrosa.

45 **[0290]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento se prepara para administración oral. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración bucal.

50 **[0291]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica se prepara para la administración por inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En algunas de tales realizaciones, una composición farmacéutica comprende un portador y se formula en una solución acuosa, tal como agua o tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. En ciertas realizaciones, se incluyen otros ingredientes (por ejemplo, ingredientes que ayudan en la solubilidad o sirven como conservantes). En ciertas realizaciones, las suspensiones inyectables se preparan usando vehículos líquidos

apropiados, agentes de suspensión y similares. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección se presentan en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Ciertos disolventes adecuados para uso en composiciones farmacéuticas para inyección incluyen, pero no se limitan a, disolventes lipófilos y aceites grasos, tales como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etil o triglicéridos, y liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, dichas suspensiones también pueden contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los agentes farmacéuticos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

[0292] En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica se prepara para administración transmucosa. En algunas de tales realizaciones, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

[0293] En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende un oligonucleótido en una cantidad terapéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

[0294] En ciertas realizaciones, uno o más oligonucleótidos modificados proporcionados en el presente documento se formulan como un profármaco. En ciertas realizaciones, tras la administración in vivo, un profármaco se convierte químicamente en la forma más activa biológica, farmacéutica o terapéuticamente de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, los profármacos son útiles porque son más fáciles de administrar que la forma activa correspondiente. Por ejemplo, en ciertos casos, un profármaco puede estar más biodisponible (por ejemplo, a través de la administración oral) que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, un profármaco puede tener una solubilidad mejorada en comparación con la forma activa correspondiente. En ciertas realizaciones, los profármacos son menos solubles en agua que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, tales profármacos poseen una transmisión superior a través de las membranas celulares, donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad. En ciertas realizaciones, un profármaco es un éster. En ciertas de tales realizaciones, el éster se hidroliza metabólicamente a ácido carboxílico tras la administración. En ciertos casos, el compuesto que contiene ácido carboxílico es la forma activa correspondiente. En ciertas realizaciones, un profármaco comprende un péptido corto (poliaminoácido) unido a un grupo ácido. En algunas de tales realizaciones, el péptido se escinde tras la administración para formar la forma activa correspondiente.

[0295] En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones y métodos para reducir la cantidad o actividad de un ácido nucleico diana en una célula. En ciertas realizaciones, la célula está en un animal. En ciertas realizaciones, el animal es un mamífero. En ciertas realizaciones, el animal es un roedor. En ciertas realizaciones, el animal es un primate. En ciertas realizaciones, el animal es un primate no humano. En ciertas realizaciones, el animal es un humano.

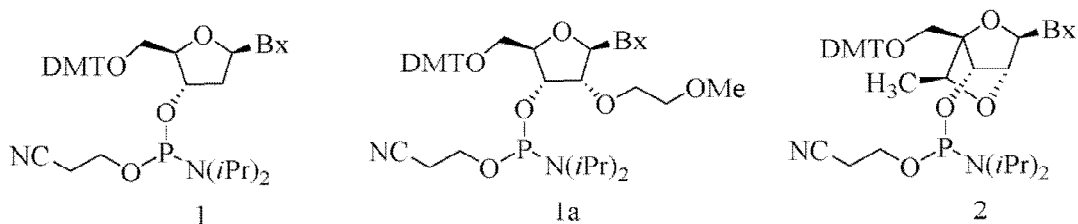
[0296] En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para administrar una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de la presente divulgación a un animal. Las vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a, oral, rectal, transmucosa, intestinal, enteral, tópica, supositorio, por inhalación, intratecal, intracerebroventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intratumoral y parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intramedular, y subcutáneo). En ciertas realizaciones, los fármacos intratecales se administran para lograr exposiciones locales en lugar de sistémicas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden inyectarse directamente en el área del efecto deseado (por ejemplo, en el hígado).

EJEMPLOS

[0297] Los siguientes ejemplos ilustran ciertas realizaciones de la presente divulgación y no son limitantes. Además, cuando se proporcionan realizaciones específicas, los inventores han contemplado la aplicación genérica de esas realizaciones específicas. Por ejemplo, la divulgación de un oligonucleótido que tiene un motivo particular proporciona un soporte razonable para oligonucleótidos adicionales que tienen el mismo motivo o similar. Y, por ejemplo, cuando una modificación particular de alta afinidad aparece en una posición particular, otras modificaciones de alta afinidad en la misma posición se consideran adecuadas, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1: Método general para la preparación de fosforamiditas, compuestos 1, 1a y 2

[0298]

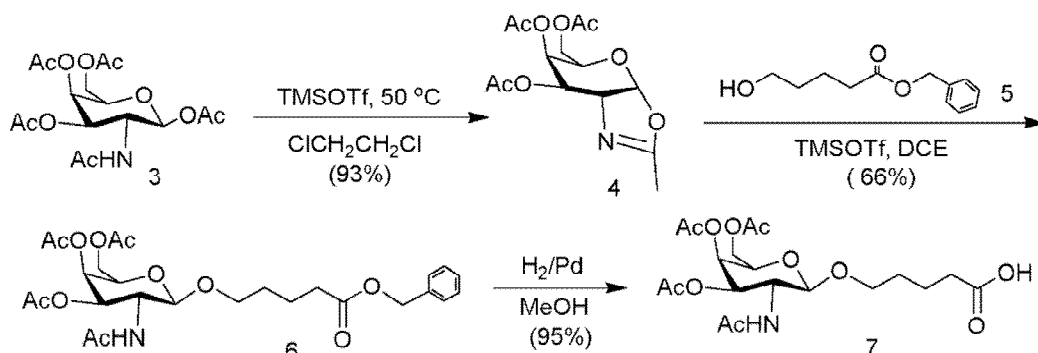


Bx es una base heterocíclica;

[0299] Los compuestos 1, 1a y 2 se prepararon según los procedimientos bien conocidos en la técnica tal como se describe en la memoria descriptiva del presente documento (ver Seth et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 21 (4), 1122-1125, *J. Org. Chem.*, 2010, 75 (5), 1569-1581, *Nucleic Acids Symposium Series*, 2008, 52 (1), 553-554); y también ver las Solicitudes internacionales PCT publicadas (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO2010/036698, WO2009/143369, WO 2009/006478, y WO 2007/090071), y la patente de EE.UU. 7,569,686).

Ejemplo 2: Preparación del compuesto 7

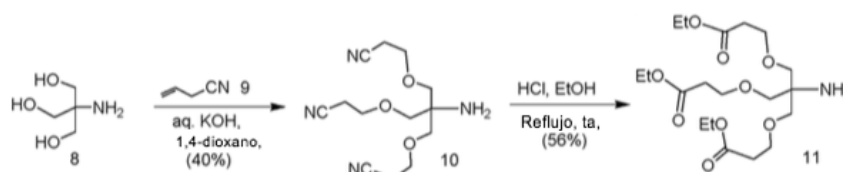
[0300]



[0301] Los compuestos 3 (2-acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-deoxi- β -Dgalactopiranososa o galactosamina pentaacetato) están disponibles comercialmente. El compuesto 5 se preparó de acuerdo con procedimientos publicados (Weber y col., *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 2692).

Ejemplo 3: Preparación del compuesto 11

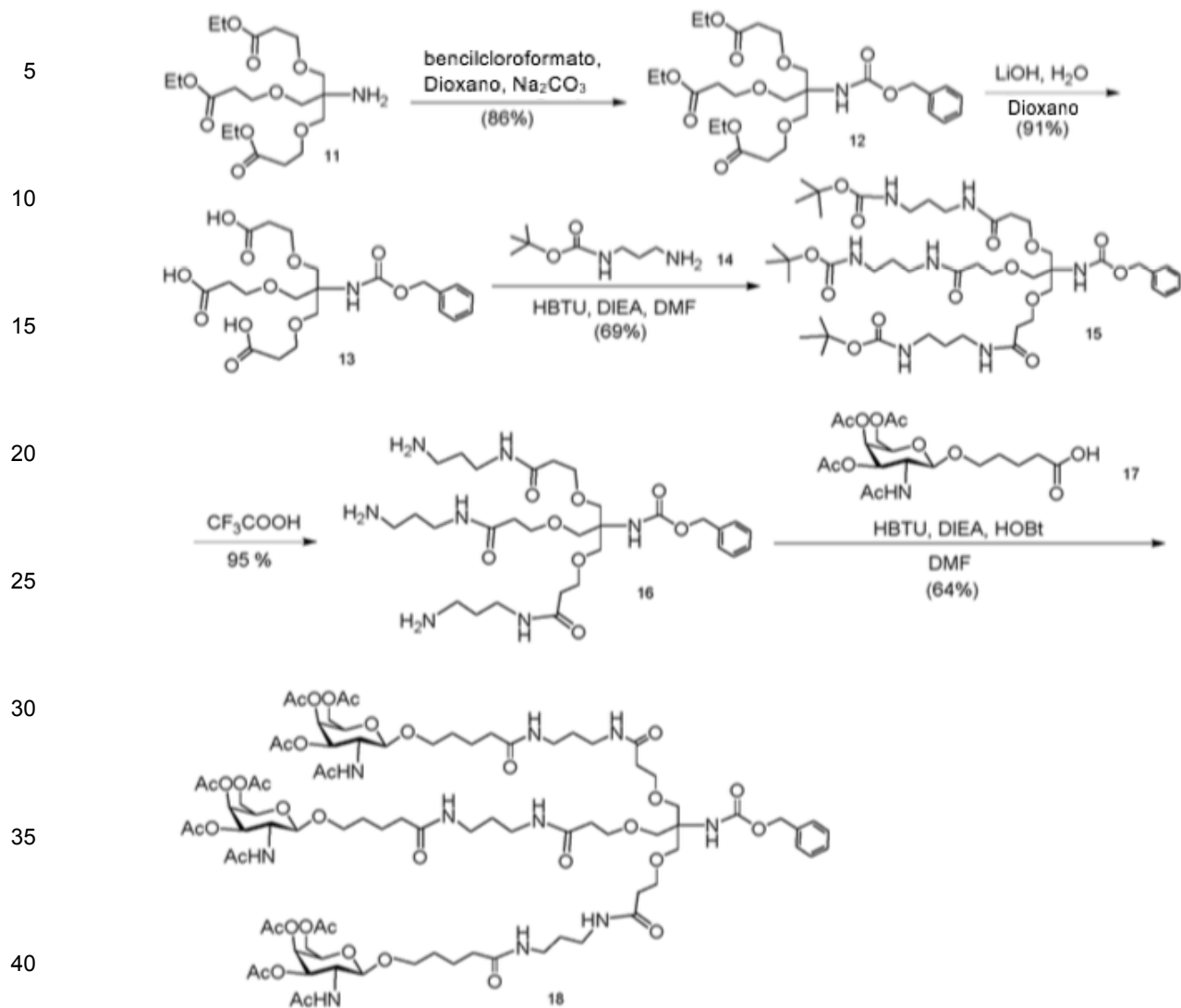
[0302]



[0303] Los compuestos 8 y 9 están disponibles comercialmente.

Ejemplo 4: Preparación del compuesto 18

[0304]



45 [0305] El Compuesto 11 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 3, El Compuesto 14 está disponible comercialmente. El compuesto 17 se preparó usando procedimientos similares informados por Rensen et al., J. Med. Chem., 2004, 47, 5798-5808,

50 **Ejemplo 39: Método general para la preparación del compuesto oligomérico 83h que comprende un conjugado GalNAc3-3 en el término 5' (GalNAc3-1 modificado para la unión del extremo 5') a través del soporte sólido**

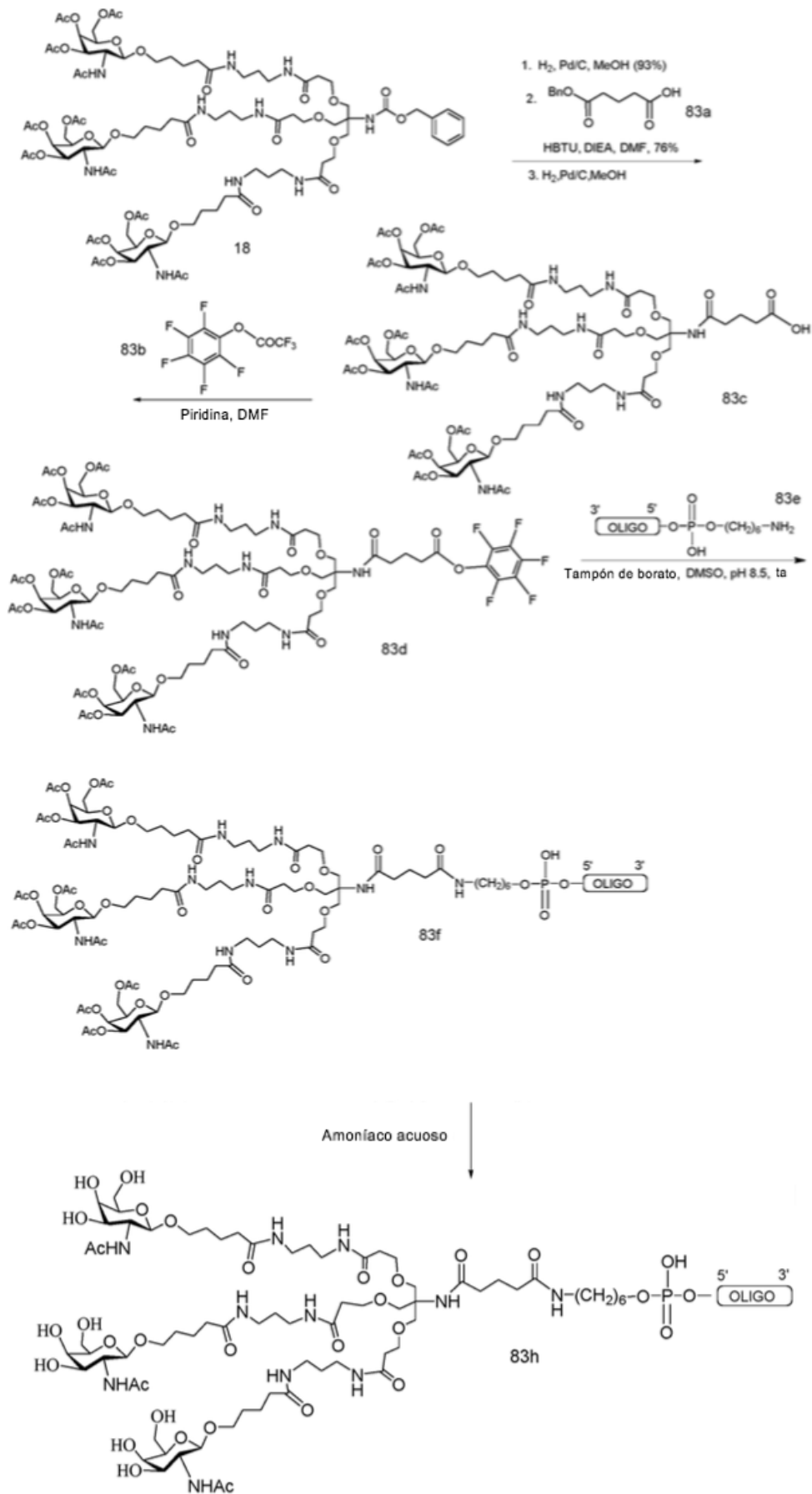
55 [0306]

60

65

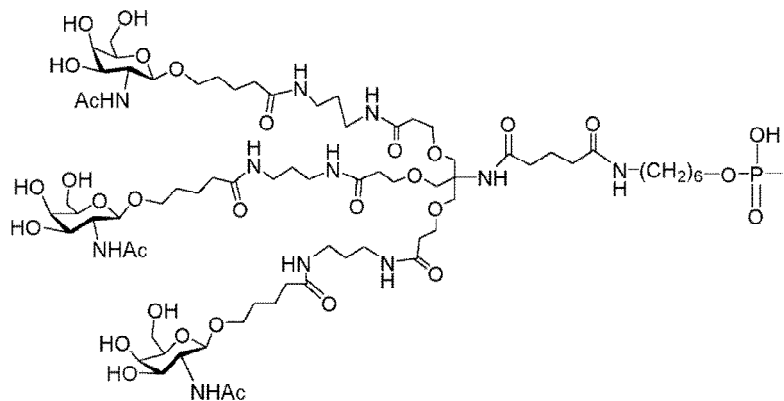
70

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

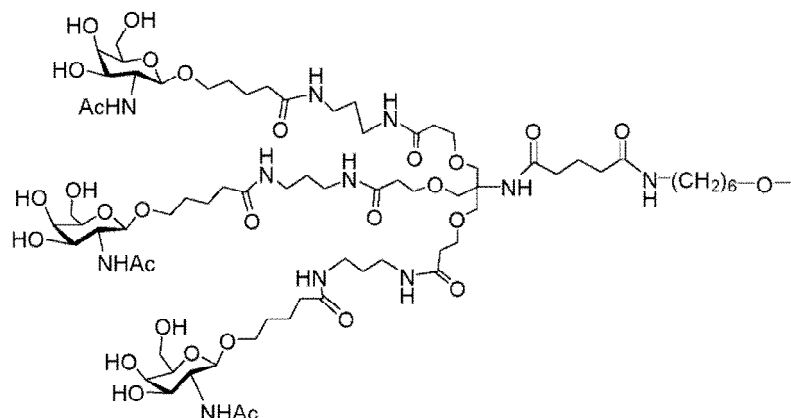


[0307] El compuesto 18 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 4. Los compuestos 83a y 83b están disponibles comercialmente. El compuesto oligomérico 83e que comprende una hexilamina unida a fosfodiéster se preparó usando procedimientos de síntesis de oligonucleótidos estándar. El tratamiento del compuesto oligomérico protegido con amoníaco acuoso proporcionó el compuesto oligomérico conjugado 5'-GalNAc3-3 (83h).

[0308] En donde GalNAc3-3 tiene la estructura:



[0309] La porción del grupo GalNAc3 del grupo conjugado GalNAc3-3 (GalNAc3-3a) se puede combinar con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. Donde GalNAc3-3a tiene la fórmula:



Ejemplo 44: Efecto de los enlaces PO/PS en la inhibición antisentido de los ASO que comprenden el conjugado GalNAc3-1 (ver Ejemplo 9) en el extremo 3' dirigido a SRB-1

[0310] Los ISIS 655861 y 655862 que comprenden un conjugado GalNAc3-1 en el extremo 3', dirigidos a cada **SRB-1** dirigido, se ensayaron en un estudio de administración única para determinar su capacidad para inhibir la **SRB-1** en ratones. El compuesto no conjugado original, ISIS 353382 se incluyó en el estudio para comparación.

[0311] Los ASO son separadores espaciales 5-10-5 MOE, en donde la región de intervalo comprende diez 2'-desoxirribonucleósidos y cada región de ala comprende cinco nucleósidos modificados en 2'-MOE. Los ASO se prepararon utilizando métodos similares a los ilustrados anteriormente en el Ejemplo 19 y se describen en la Tabla 23, a continuación.

Tabla 23

ASO modificados que comprenden el conjugado GalNAc ₃ -1 en el extremo 3' que se dirigen a SRB-1			
ISIS N°	Secuencia (5' a 3')	Química	SEQ ID N°
353382 (padre)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS completo sin conjugado	28
655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} ^m -GalNAc ₃ -1 _a	PS completo con GalNAc ₃ -1 conjugado	29
655862	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} ^m -GalNAc ₃ -1 _a	PS/PO mezclado con GalNAc ₃ -1 conjugado	29

[0312] Subíndices: "e" indica nucleósido modificado en 2'-MOE; "d" indica β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica enlaces internucleosídicos de fosforitoato (PS); "o" indica enlaces internucleosídicos fosfodiéster (PO); y "o" indica OP(=O)(OH)-. El superíndice "m" indica 5-metilcitosinas. La estructura de "GalNAc3-1" se muestra en el Ejemplo 9,

Tratamiento

[0313] Se inyectaron por vía subcutánea ratones Balb/c macho de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez a la dosis mostrada a continuación con ISIS 353382, 655861, 655862 o con control tratado con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Antes del tratamiento y después de la última dosis, se extrajo sangre de cada ratón y se analizaron muestras de plasma. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 del hígado utilizando PCR en tiempo real y reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de ARNm de SRB-1 se determinaron en relación con el ARN total (usando Ribogreen), antes de la normalización al control tratado con PBS. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizado para el control tratado con PBS y se denota como "% de PBS". Los ED₅₀ se midieron utilizando métodos similares a los descritos anteriormente y se describen a continuación.

[0314] Como se ilustra en la Tabla 24, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una manera dependiente de la dosis en comparación con el control tratado con PBS. De hecho, los oligonucleótidos antisentido que comprenden el conjugado GalNAc3-1 en el extremo 3' (ISIS 655861 y 655862) mostraron una mejora sustancial en la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 353382). Además, el ISIS 655862 con enlaces PS/PO mixtos mostró una mejora en la potencia en relación con el PS completo (ISIS 655861).

Tabla 24

Efecto de enlaces PO/PS en la inhibición antisentido de ASO que comprenden GalNAc ₃ -1 conjugado en el extremo 3' dirigido a SRB-1					
ISIS N°	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 niveles mRNA (% PBS)	ED ₅₀ (mg/kg)	Química	SEQ ID NO
PBS	0	100	--	--	
353382 (padre)	3	76,65	10,4	PS completo sin conjugado	28
	10	52,40			
	30	24,95			
655861	0,5	81,22	2,2	PS completo con GalNAc ₃ -1 conjugado	29
	1,5	63,51			
	5	24,61			
	15	14,80			
655862	0,5	69,57	1,3	PS/PO mezclado con GalNAc ₃ -1 conjugado	29
	1,5	45,78			
	5	19,70			
	15	12,90			

[0315] Los niveles de transaminasas hepáticas, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), en suero, se midieron en relación con ratones inyectados con solución salina utilizando protocolos estándar. También se evaluaron los pesos de los órganos. Los resultados demostraron que no se observó una elevación en los niveles de transaminasas (Tabla 25) o en los pesos de los órganos (datos no mostrados) en ratones tratados con ASO en comparación con el control de PBS. Además, la ASO con enlaces PS/PO mixtos (ISIS 655862) mostró niveles de transaminasas similares en comparación con el PS completo (ISIS 655861).

Tabla 25

Table 25

Efecto de enlaces PO/PS en niveles de transaminasa de ASO que comprenden GalNAc₃-1 conjugado en el extremo 3' dirigido a SRB-1					
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Química	SEQ ID NO
PBS	0	28,5	65	--	
353382 (padre)	3	50,25	89	PS completo sin conjugado	28
	10	27,5	79,3		
	30	27,3	97		
655861	0,5	28	55,7	PS completo con GalNAc₃-1	29
	1,5	30	78		
	5	29	63,5		
	15	28,8	67,8		
655862	0,5	50	75,5	PS/PO mezclado con GalNAc₃-1	29
	1,5	21,7	58,5		
	5	29,3	69		
	15	22	61		

Ejemplo 45: Preparación de éster de PFP, compuesto 110a

[0316]

5

10

15

20

25

30

35

40

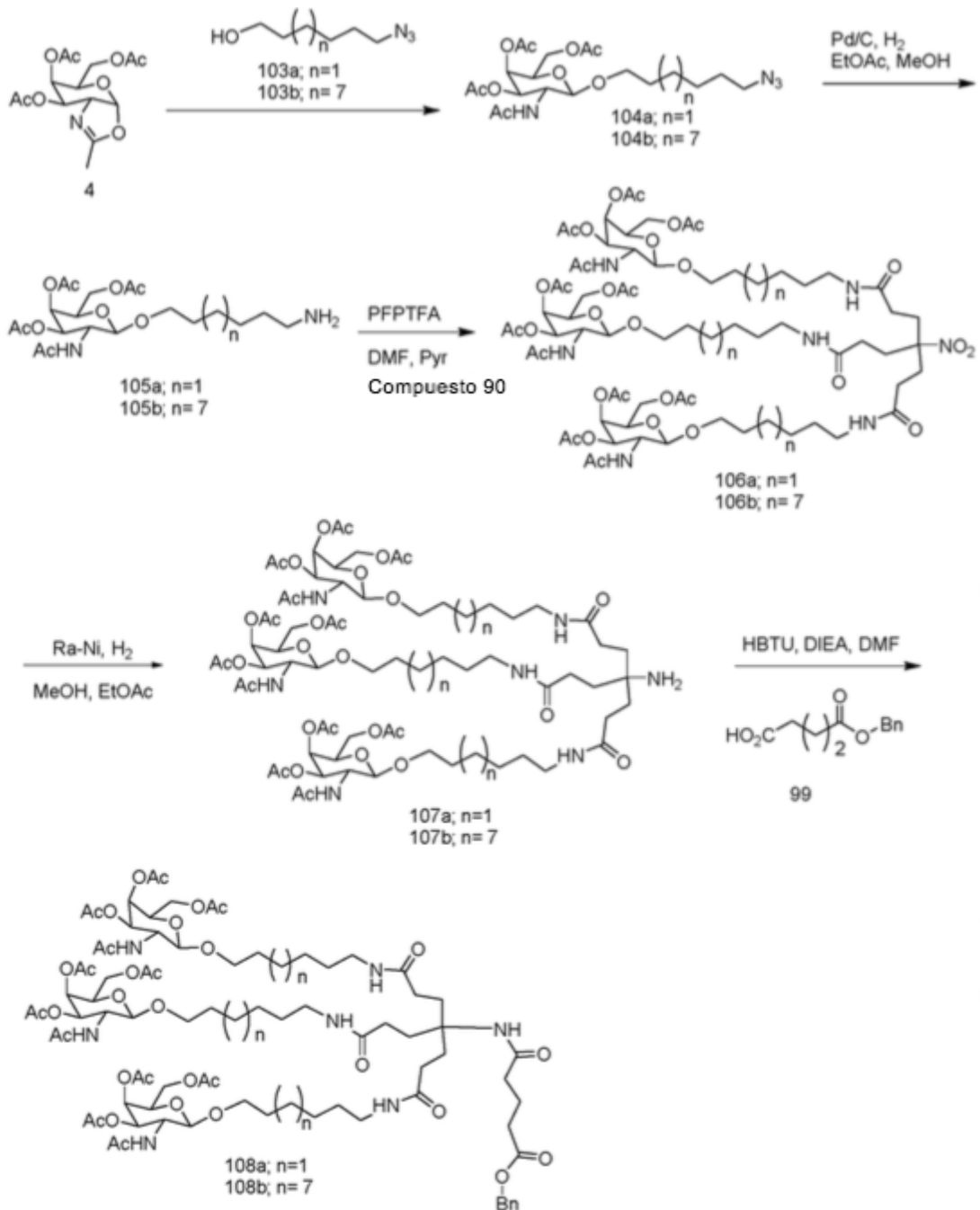
45

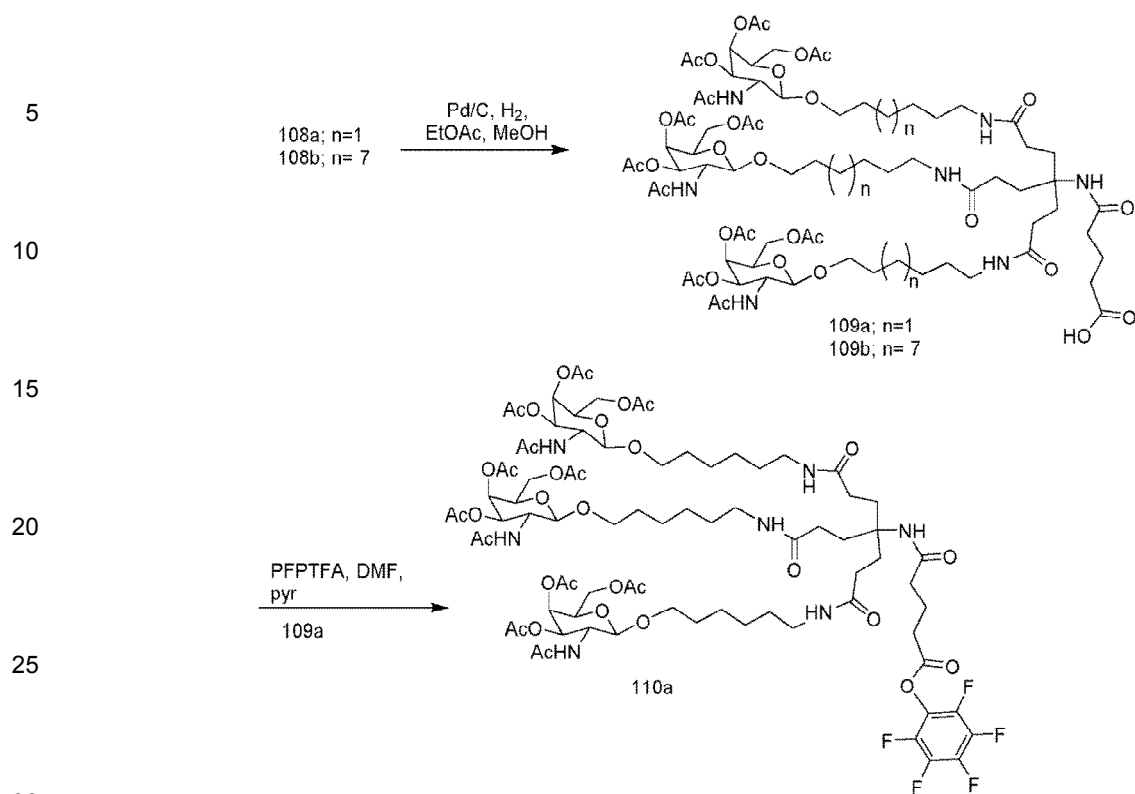
50

55

60

65





35

[0317] El compuesto 4 (9,5 g, 28,8 mmoles) se trató con el compuesto 103a o 103b (38 mmoles), individualmente, y TMSOTf (0,5 eq.) y tamices moleculares en diclorometano (200 ml), y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. En ese momento, la capa orgánica se filtró a través de celite, luego se lavó con bicarbonato de sodio, agua y salmuera. La capa orgánica se separó luego y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se redujo a presión reducida. El aceite resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (2% -> 10% de metanol/diclorometano) para dar los compuestos 104a y 104b con un rendimiento >80%. La LCMS y la RMN de protones fueron consistentes con la estructura.

40

[0318] Los compuestos 104a y 104b se trataron en las mismas condiciones que para los compuestos 100a-d (Ejemplo 47), para dar los compuestos 105a y 105b con un rendimiento > 90%. La LCMS y la RMN de protones fueron consistentes con la estructura.

45

[0319] Los compuestos 105a y 105b se trataron, individualmente, con el compuesto 90 en las mismas condiciones que para los compuestos 901a-d, para dar los compuestos 106a (80%) y 106b (20%). La LCMS y la RMN de protones fueron consistentes con la estructura.

50

[0320] Los compuestos 106a y 106b se trataron en las mismas condiciones que para los compuestos 96a-d (Ejemplo 47), para dar 107a (60%) y 107b (20%). La LCMS y la RMN de protones fueron consistentes con la estructura.

55

[0321] Los compuestos 107a y 107b se trataron en las mismas condiciones que para los compuestos 97a-d (Ejemplo 47), para dar los compuestos 108a y 108b con un rendimiento del 40-60%. La LCMS y la RMN de protones fueron consistentes con la estructura.

60

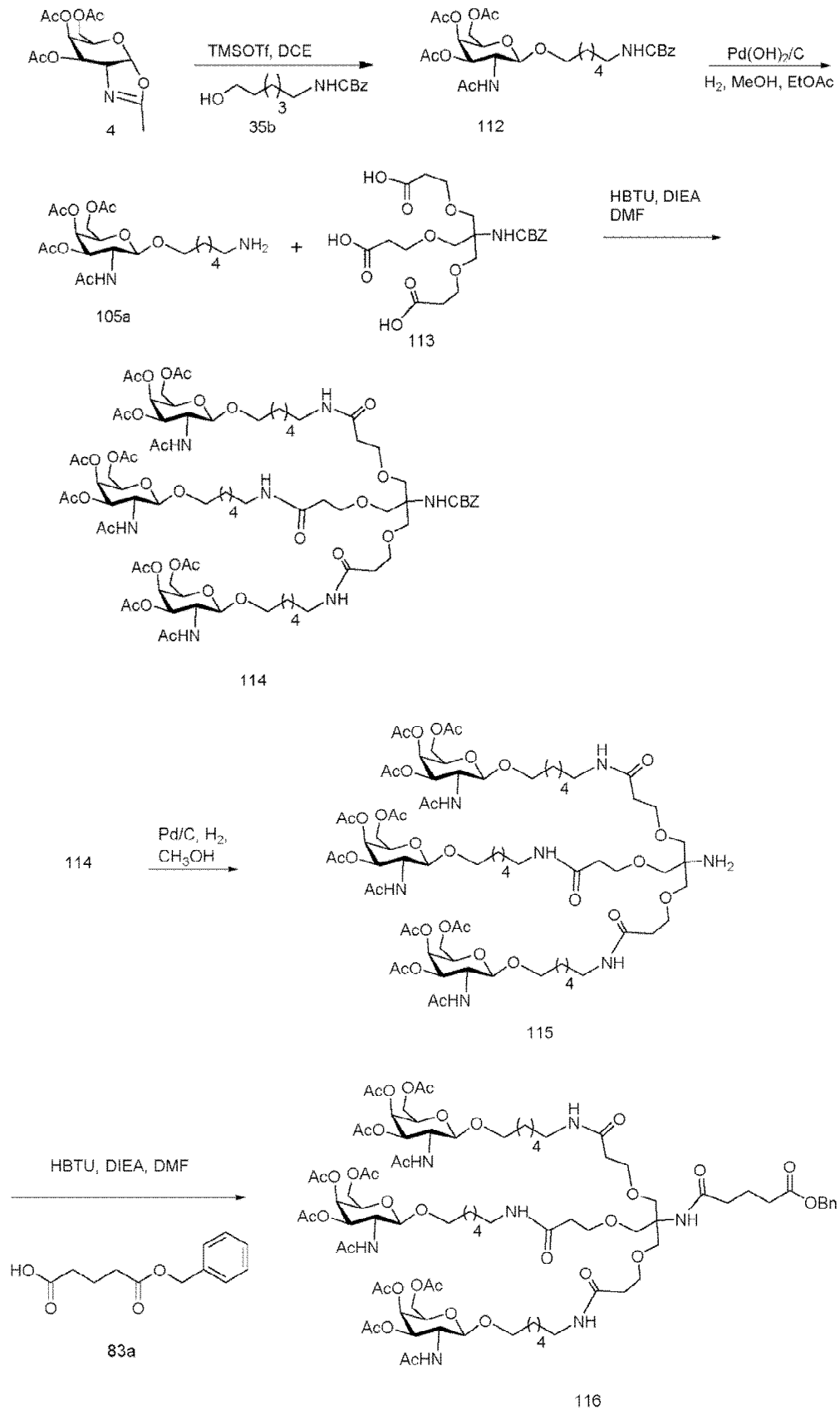
[0322] Los compuestos 108a (60%) y 108b (40%) se trataron en las mismas condiciones que para los compuestos 100a-d (Ejemplo 47), para dar los compuestos 109a y 109b con >80% de rendimiento. La LCMS y la RMN de protones fueron consistentes con la estructura. El Compuesto 109a se trató en las mismas condiciones que para los compuestos 101a-d (Ejemplo 47), para dar el Compuesto 110a con un rendimiento de 30-60%. La LCMS y la RMN de protones fueron consistentes con la estructura. Alternativamente, el Compuesto 110b se puede preparar de una manera similar a partir del Compuesto 109b.

Ejemplo 48: Preparación del oligonucleótido 119 que comprende GalNAc₃₋₇

65

[0324]

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



[0325] El compuesto 112 se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (J. Med. Chem. 2004, 47, 5798-5808).

5 **[0326]** El compuesto 112 (5 g, 8,6 mmol) se disolvió en 1:1 metanol/acetato de etil (22 ml/22 ml). Se añadió hidróxido de paladio sobre carbono (0,5 g). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo hidrógeno durante 12 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y se lavó la almohadilla con 1:1 de metanol/acetato de etil. El filtrado y los lavados se combinaron y se concentraron a sequedad para producir el Compuesto 105a (cuantitativo). La estructura fue confirmada por LCMS.

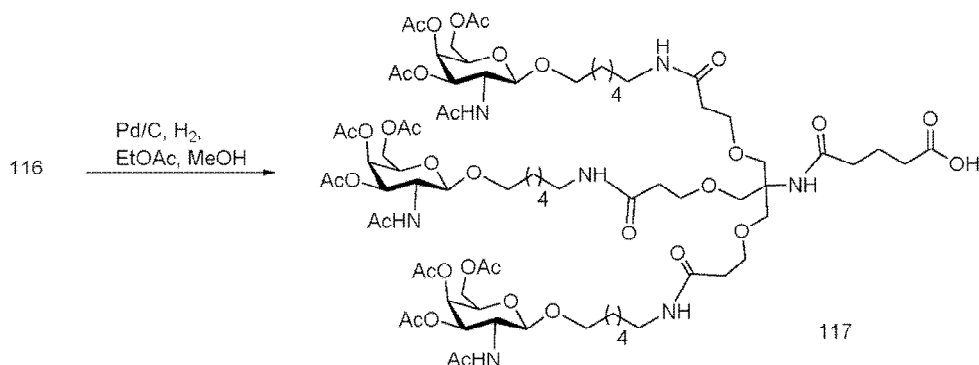
10 **[0327]** El compuesto 113 (1,25 g, 2,7 mmol), HBTU (3,2 g, 8,4 mmol) y DIEA (2,8 ml, 16,2 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (17 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. A esto se añadió una solución de Compuesto 105a (3,77 g, 8,4 mmol) en DMF anhidro (20 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener un aceite. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (100 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (100 ml) y salmuera (100 ml). La fase orgánica se separó, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con 10 a 20% de MeOH en diclorometano para producir el Compuesto 114 (1,45 g, 30%). La estructura se confirmó mediante análisis por LCMS y ^1H RMN.

20 **[0328]** El compuesto 114 (1,43 g, 0,8 mmol) se disolvió en 1:1 metanol/acetato de etil (4 ml/4 ml). Se añadió paladio sobre carbono (húmedo, 0,14 g). La mezcla de reacción se lavó con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente bajo hidrógeno durante 12 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una capa de celite. La almohadilla de celite se lavó con metanol/acetato de etil (1: 1). El filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron a presión reducida para producir el Compuesto 115 (cuantitativo). La estructura se confirmó mediante análisis por LCMS y ^1H RMN.

25 **[0329]** El compuesto 83a (0,17 g, 0,75 mmol), HBTU (0,31 g, 0,83 mmol) y DIEA (0,26 ml, 1,5 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. A esto se añadió una solución de Compuesto 115 (1,22 g, 0,75 mmol) en DMF anhidro y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 . La capa orgánica se lavó en solución acuosa saturada de NaHCO_3 y salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró. La capa orgánica se concentró a sequedad y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice y se eluyó con 3 a 15% de MeOH en diclorometano para producir el Compuesto 116 (0,84 g, 61%). La estructura fue confirmada por LC MS y análisis por ^1H RMN.

35

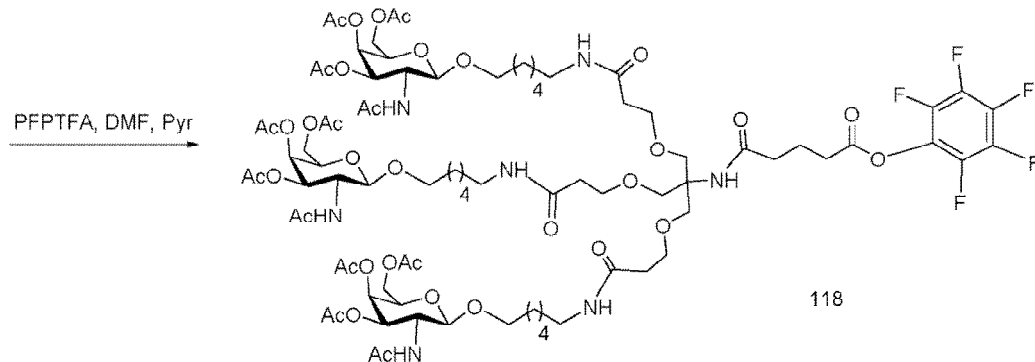
40



45

50

55



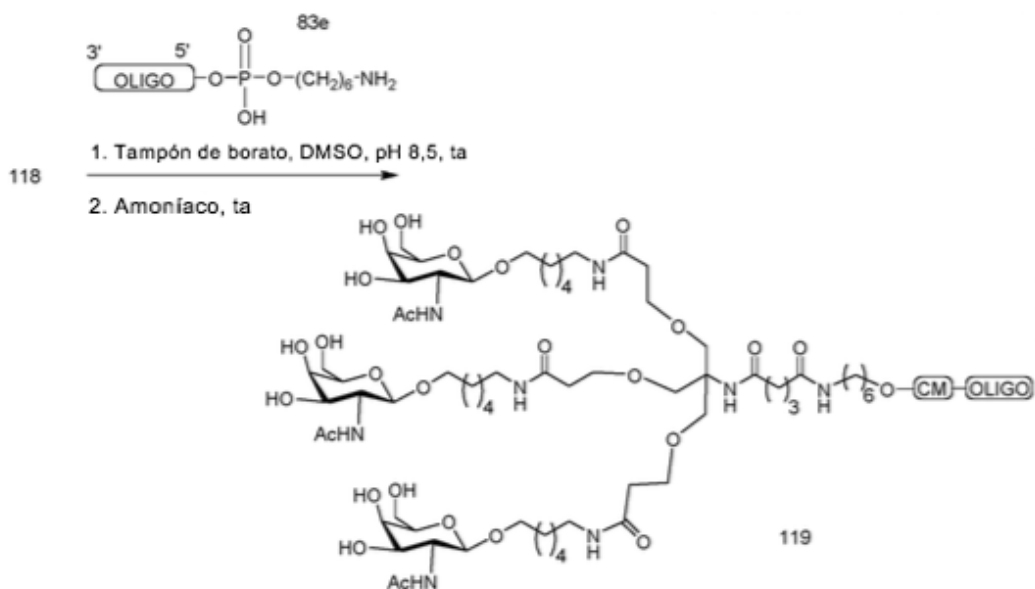
60

65

[0330] El compuesto 116 (0,74 g, 0,4 mmol) se disolvió en 1:1 metanol/acetato de etil (5 ml/5 ml). Se añadió paladio

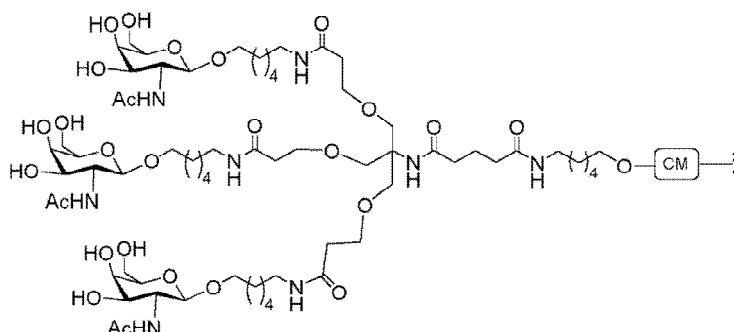
sobre carbono (húmedo, 0,074 g). La mezcla de reacción se lavó con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente bajo hidrógeno durante 12 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una capa de celite. La almohadilla de celite se lavó con metanol/acetato de etil (1: 1). El filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron a presión reducida para producir el compuesto 117 (0,73 g, 98%). La estructura se confirmó mediante análisis por LCMS y ^1H RMN.

[0331] El compuesto 117 (0,63 g, 0,36 mmol) se disolvió en DMF anhidro (3 ml). A esta solución se agregaron N,N-diisopropiletilamina (70 ml, 0,4 mmol) y trifluoroacetato de pentafluorofenilo (72 ml, 0,42 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h y se vertió en una solución acuosa saturada de NaHCO_3 . La mezcla se extrajo con diclorometano, se lavó con salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La solución de diclorometano se concentró a sequedad y se purificó con cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con 5 a 10% de MeOH en diclorometano para producir el compuesto 118 (0,51 g, 79%). La estructura se confirmó mediante LCMS y ^1H y ^{19}F RMN.



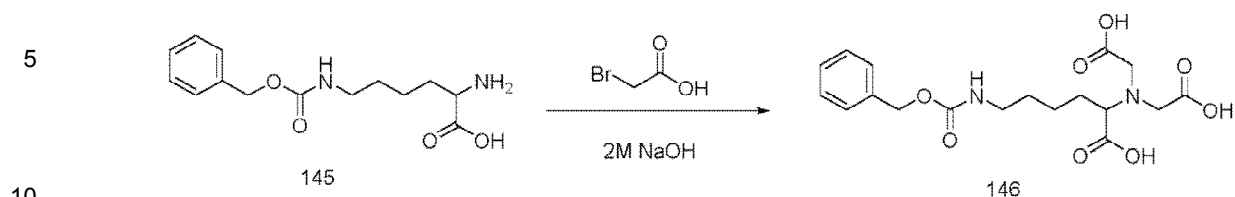
[0332] El Compuesto oligomérico 119, que comprende un grupo conjugado GalNAc_{3-7} , se preparó usando los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La porción del grupo GalNAc_3 del grupo conjugado GalNAc_{3-7} (GalNAc_{3-7a}) se puede combinar con cualquier escindible resto para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En ciertas realizaciones, el resto escindible es $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{Ad}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$.

[0333] La estructura de GalNAc_{3-7} ($\text{GalNAc}_{3-7a}\text{-CM-}$) se muestra a continuación:



Ejemplo 51: Preparación de oligonucleótido 155 que comprende GalNAc_{3-6}

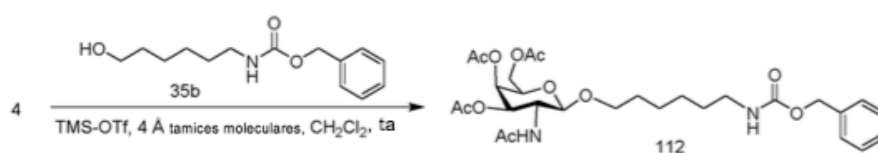
[0334]



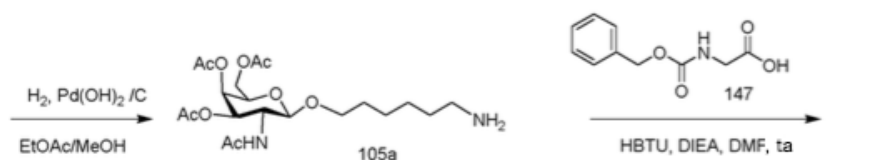
[0335] El compuesto 146 se sintetizó como se describe en la literatura (Analytical Biochemistry 1995, 229, 54-60).

15

20

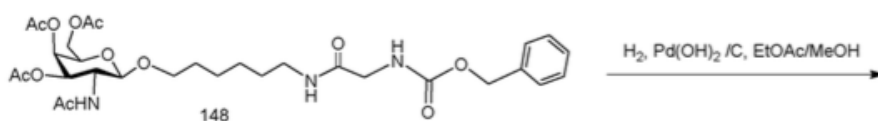


25



30

35



40

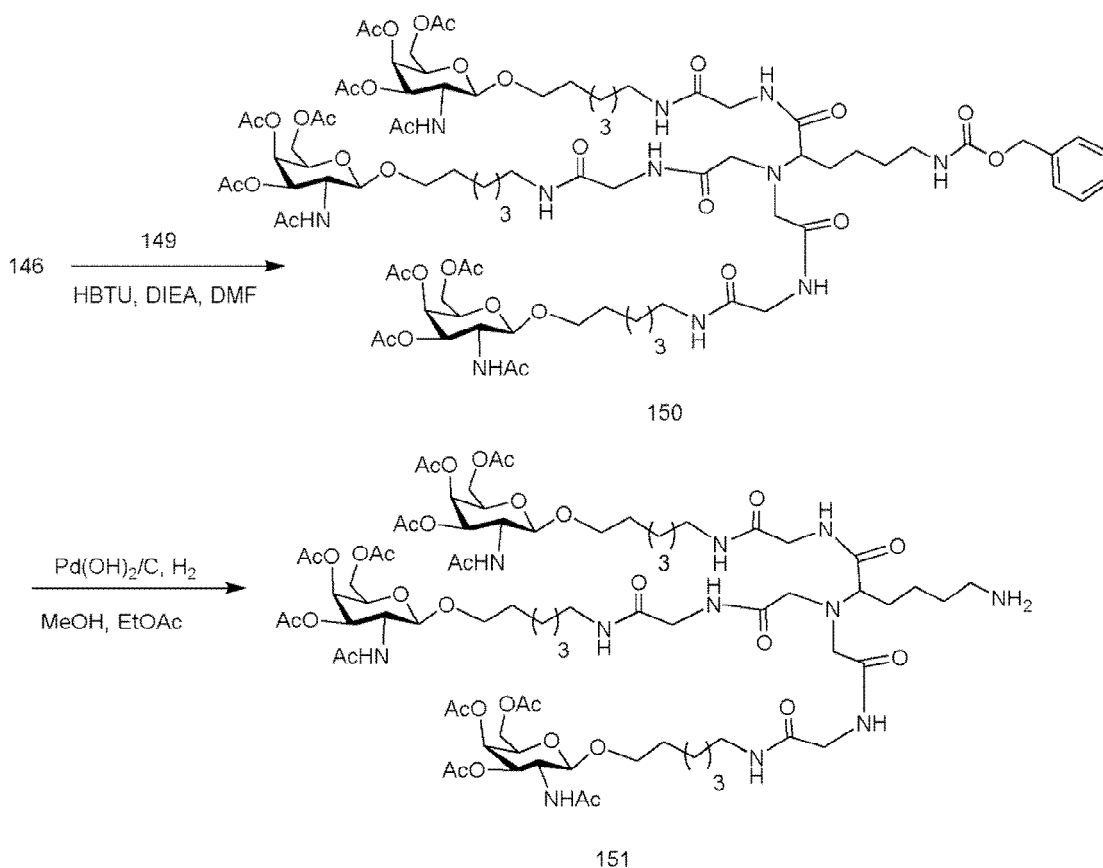
[0336] El compuesto 4 (15 g, 45,55 mmol) y el compuesto 35b (14,3 gramos, 57 mmol) se disolvieron en CH_2Cl_2 (200 ml). Se añadieron tamices moleculares activados (4 Å, 2 g, en polvo) y la reacción se dejó agitar durante 30 minutos en atmósfera de nitrógeno. Se añadió TMS-OTf (4,1 ml, 22,77 mmol) y la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. Una vez completada, la reacción se detuvo vertiendo en una solución de NaHCO_3 acuoso saturado (500 ml) y hielo triturado (~ 150 g). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró hasta un aceite naranja a presión reducida. El material bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con 2-10% de MeOH en CH_2Cl_2 para producir el Compuesto 112 (16,53 g, 63%). LCMS y ^1H RMN fueron consistentes con el compuesto esperado.

[0337] El compuesto 112 (4,27 g, 7,35 mmol) se disolvió en MeOH/EtOAc 1:1 (40 ml). La mezcla de reacción se purgó burbujeando una corriente de argón a través de la solución durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Pearlman (hidróxido de paladio sobre carbono, 400 mg) y se burbujeó gas hidrógeno a través de la solución durante 30 minutos. Al finalizar (TLC MeOH al 10% en CH_2Cl_2 y LCMS), el catalizador se eliminó por filtración a través de una capa de celite. El filtrado se concentró por evaporación rotatoria y se secó brevemente a alto vacío para producir el Compuesto 105a (3,28 g). LCMS y ^1H RMN fueron consistentes con el producto deseado.

[0338] El compuesto 147 (2,31 g, 11 mmol) se disolvió en DMF anhidra (100 ml). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (DIEA, 3,9 ml, 22 mmol), seguido de HBTU (4 g, 10,5 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar durante aproximadamente 15 minutos bajo nitrógeno. A esto, se añadió una solución del compuesto 105a (3,3 g, 7,4 mmol) en DMF seco y se agitó durante 2 h en atmósfera de nitrógeno. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró hasta obtener un jarabe de naranja. El material bruto se purificó por cromatografía en columna con MeOH al 2-5% en CH_2Cl_2 para producir el Compuesto 148 (3,44 g, 73%). LCMS y ^1H RMN fueron consistentes con el producto

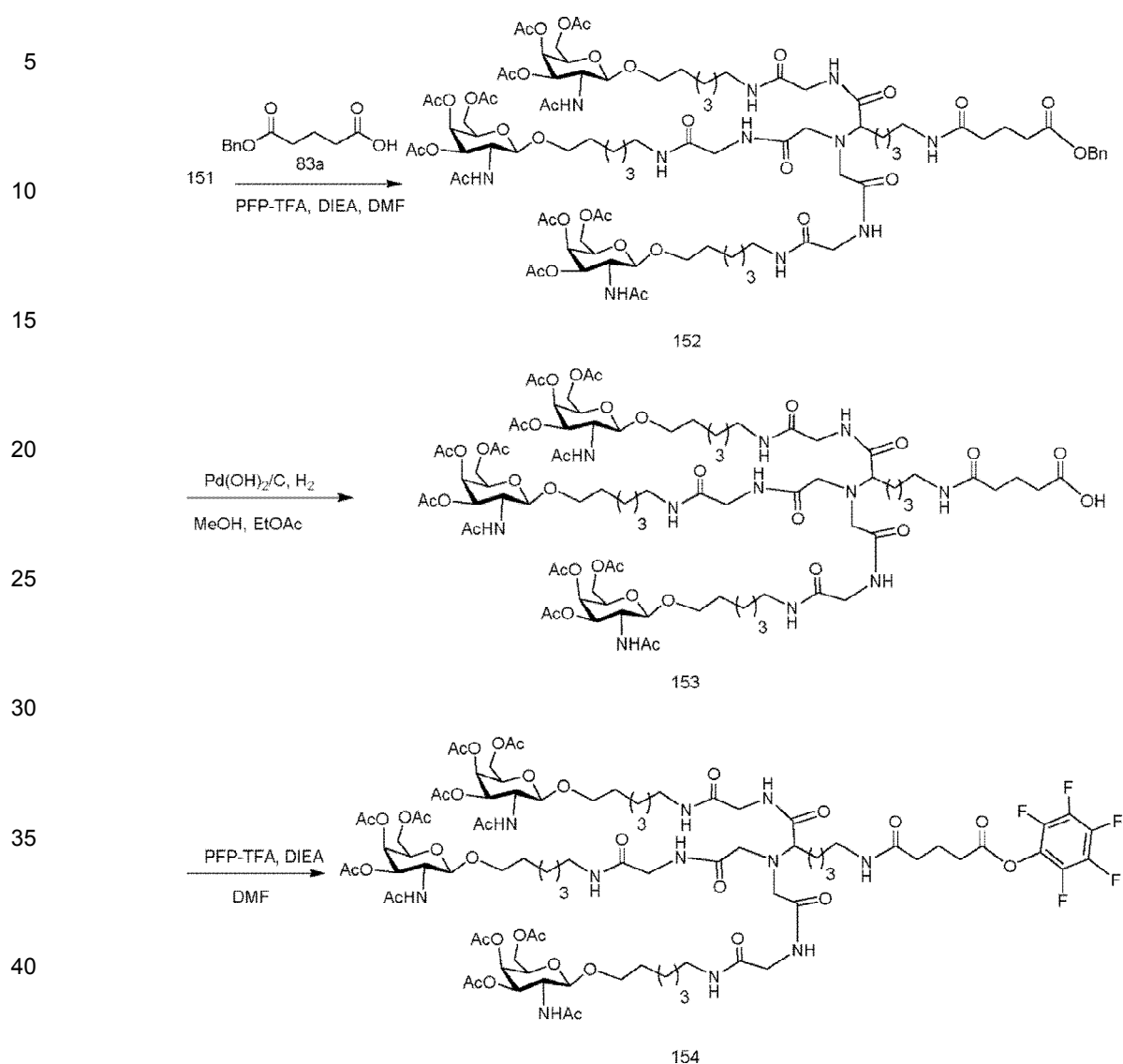
esperado.

[0339] El Compuesto 148 (3,3 g, 5,2 mmol) se disolvió en MeOH/EtOAc 1:1 (75 ml). La mezcla de reacción se purgó burbujeando una corriente de argón a través de la solución durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Pearlman (hidróxido de paladio sobre carbono) (350 mg). Se burbujeó gas hidrógeno a través de la solución durante 30 minutos. Una vez completado (TLC MeOH al 10% en DCM y LCMS), el catalizador se eliminó por filtración a través de una capa de celite. El filtrado se concentró por evaporación rotatoria y se secó brevemente a alto vacío para producir el Compuesto 149 (2,6 g). LCMS fue consistente con el producto deseado. El residuo se disolvió en DMF seco (10 ml) se usó inmediatamente en la siguiente etapa.



[0340] El compuesto 146 (0,68 g, 1,73 mmol) se disolvió en DMF seco (20 ml). A esto se agregaron DIEA (450 ml, 2,6 mmol, 1,5 eq.) y HBTU (1,96 g, 0,5,2 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió una solución del compuesto 149 (2,6 g) en DMF anhidra (10 ml). El pH de la reacción se ajustó a pH = 9-10 mediante la adición de DIEA (si es necesario). La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 2 h. Una vez completada, la reacción se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado acuoso, seguido de salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con 2-10% de MeOH en CH₂Cl₂ para producir el Compuesto 150 (0,62 g, 20%). LCMS y ¹H RMN fueron consistentes con el producto deseado.

[0341] El compuesto 150 (0,62 g) se disolvió en MeOH/EtOAc 1:1 (5 l). La mezcla de reacción se purgó burbujeando una corriente de argón a través de la solución durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Pearlman (hidróxido de paladio sobre carbono) (60 mg). Se burbujeó gas hidrógeno a través de la solución durante 30 minutos. Al finalizar (TLC MeOH al 10% en DCM y LCMS), el catalizador se eliminó por filtración (filtro de teflón con punta de jeringa, 0,45 mm). El filtrado se concentró por evaporación rotatoria y se secó brevemente a alto vacío para producir el Compuesto 151 (0,57 g). La LCMS fue consistente con el producto deseado. El producto se disolvió en 4 ml de DMF seco y se usó inmediatamente en la siguiente etapa.

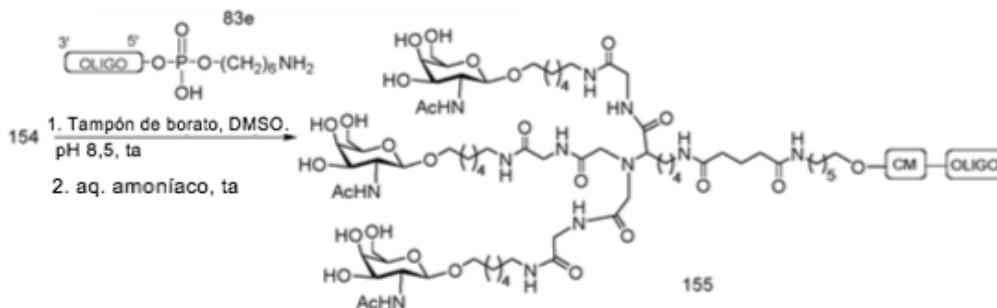


[0342] El compuesto 83a (0,11 g, 0,33 mmol) se disolvió en DMF anhidro (5 ml) y se añadieron N,N-diisopropiletilamina (75 μ l, 1 mmol) y se añadió PFP-TFA (90 μ l, 0,76 mmol). La mezcla de reacción se volvió magenta al contacto y gradualmente se volvió naranja durante los siguientes 30 minutos. El progreso de la reacción se controló mediante TLC y LCMS. Una vez completada (formación del éster de PFP), se añadió una solución del compuesto 151 (0,57 g, 0,33 mmol) en DMF. El pH de la reacción se ajustó a pH = 9-10 mediante la adición de N,N-diisopropiletilamina (si es necesario). La mezcla de reacción se agitó bajo nitrógeno durante ~ 30 min. Al finalizar, la mayor parte del disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ saturado acuoso, seguido de salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró hasta obtener un jarabe de naranja. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (2-10% de MeOH en CH₂Cl₂) para producir el Compuesto 152 (0,35 g, 55%). LCMS y ¹H RMN fueron consistentes con el producto deseado.

[0343] El compuesto 152 (0,35 g, 0,182 mmol) se disolvió en MeOH/EtOAc 1:1 (10 ml). La mezcla de reacción se purgó burbujeando una corriente de argón a través de la solución durante 15 minutos. Se añadió catalizador de Pearlman (hidróxido de paladio sobre carbono) (35 mg). Se burbujeó gas hidrógeno a través de la solución durante 30 minutos. Al finalizar (TLC MeOH al 10% en DCM y LCMS), el catalizador se eliminó por filtración (filtro de teflón con punta de jeringa, 0,45 mm). El filtrado se concentró por evaporación rotatoria y se secó brevemente a alto vacío para producir el Compuesto 153 (0,33 g, cuantitativo). La LCMS fue consistente con el producto deseado.

[0344] El compuesto 153 (0,33 g, 0,18 mmol) se disolvió en DMF anhidro (5 ml) con agitación bajo nitrógeno. A esto se agregaron N,N-diisopropiletilamina (65 μ l, 0,37 mmol) y PFP-TFA (35 μ l, 0,28 mmol). La mezcla de reacción se

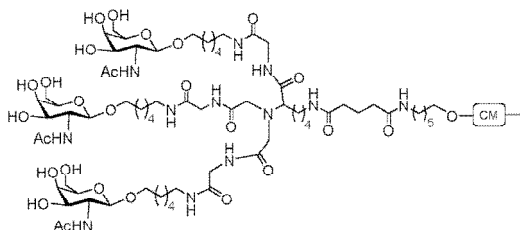
agitó bajo nitrógeno durante ~ 30 min. La mezcla de reacción se volvió magenta al contacto y gradualmente se volvió naranja. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a pH = 9-10 al agregar más *N*,*N*-Diisopropiletilamina. El progreso de la reacción se controló por TLC y LCMS. Al finalizar, la mayor parte del disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml) y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado, seguido de salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró hasta obtener un jarabe de naranja. El residuo se purificó por cromatografía en columna y se eluyó con 2-10% de MeOH en CH₂Cl₂ para producir el Compuesto 154 (0,29 g, 79%). LCMS y ¹H RMN fueron consistentes con el producto deseado.



25

[0345] El Compuesto Oligomérico 155, que comprende un grupo conjugado GalNAC₃-6, se preparó usando los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La porción del grupo GalNAC₃ del grupo conjugado GalNAC₃-6 (GalNAC₃-6a) se puede combinar con cualquier cleable resto para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En ciertas realizaciones, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-.

[0346] La estructura de GalNAC₃-6 (GalNAC₃-6_a-CM-) se muestra a continuación:



40

Ejemplo 56: Estudio dependiente de la dosis de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado 3' o 5' (comparación de GalNAC₃-1, 2, 3, 5, 6, 7 y 10) dirigidos a SRB-1 in vivo

45

[0347] Los oligonucleótidos enumerados a continuación se ensayaron en un estudio dependiente de la dosis para la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones. ISIS 353382 no conjugado se incluyó como estándar. Cada uno de los diversos grupos conjugados de GalNAC₃ se unió al extremo 5' del oligonucleótido respectivo mediante un nucleósido de 2'-desoxiadenosina unido a fosfodiéster (resto escindible) excepto ISIS 655861 que tenía el grupo conjugado de GalNAC₃ unido en el extremo 3'.

Tabla 29

ASO modificado dirigido a SRB-1				
ASO	Secuencia (5' a 3')	Motivo	Conjugado	SEQ ID NO
5 ISIS 353382 (padre)	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAC ₃ -1	28
10 ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e0} A_{d0} \text{-GalNAC}_3\text{-1}_a$	5/10/5	GalNAC ₃ -1	29
15 ISIS 664507	GalNAC₃-2_a-o'-A_{d0} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAC ₃ -1	30
15 ISIS 661161	GalNAC₃-3_a-o'-A_{d0} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAC ₃ -1	30
20 ISIS 666224	GalNAC₃-5_a-o'-A_{d0} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAC ₃ -1	30
20 ISIS 666961	GalNAC₃-6_a-o'-A_{d0} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAC ₃ -1	30
25 ISIS 666981	GalNAC₃-7_a-o'-A_{d0} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAC ₃ -1	30
30 ISIS 666881	GalNAC₃-10_a-o'-A_{d0} $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAC ₃ -1	30

[0348] Las letras mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^mC indica una 5-metil citosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido modificado en 2'-MOE; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica un enlace internucleosídico de fosforotioato (PS); "o" indica un enlace internucleosídico fosfodiéster (PO); y "o" indica O- P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

[0349] La estructura de GalNAC₃-1_a se mostró previamente en el Ejemplo 9. La estructura de GalNAC₃-2_a se mostró previamente en el Ejemplo 37. La estructura de GalNAC₃-3_a se mostró previamente en el Ejemplo 39. La estructura de GalNAC₃-5_a se mostró previamente en el Ejemplo 49. La estructura de GalNAC₃-6_a se mostró previamente en el Ejemplo 51. La estructura de GalNAC₃-7_a se mostró previamente en el Ejemplo 48. La estructura de GalNAC₃-10_a se mostró previamente en el Ejemplo 46.

Tratamiento

[0350] Se inyectaron por vía subcutánea ratones Balb/c macho de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez a la dosis mostrada a continuación con ISIS 353382, 655861, 664507, 661161, 666224, 666961, 666981, 666881 o salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm SRB-1 del hígado utilizando PCR en tiempo real y reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizado para el control de solución salina.

[0351] Como se ilustra en la Tabla 30, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una manera dependiente de la dosis. De hecho, los oligonucleótidos antisentido conjugados mostraron una mejora sustancial en la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 353382). Los oligonucleótidos antisentido conjugados en 5' mostraron un ligero aumento en la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido conjugado en 3'.

Tabla 30

ISIS N°	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% Salina)	Conjugado
Salina	n/a	100,0	
353382	3	96,0	ninguno
	10	73,1	
	30	36,1	
655861	0,5	99,4	GalNac ₃ -1 (3')
	1,5	81,2	
	5	33,9	
	15	15,2	
664507	0,5	102,0	GalNac ₃ -2 (5')
	1,5	73,2	
	5	31,3	
	15	10,8	
661161	0,5	90,7	GalNac ₃ -3 (5')
	1,5	67,6	
	5	24,3	
	15	11,5	
666224	0,5	96,1	GalNac ₃ -5 (5')
	1,5	61,6	
	5	25,6	
	15	11,7	
666961	0,5	85,5	GalNac ₃ -6 (5')
	1,5	56,3	
	5	34,2	
	15	13,1	
666981	0,5	84,7	GalNac ₃ -7 (5')
	1,5	59,9	
	5	24,9	
	15	8,5	
666881	0,5	100,0	GalNac ₃ -10 (5')
	1,5	65,8	
	5	26,0	
	15	13,0	

[0352] Los niveles de transaminasas hepáticas, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), en suero, se midieron en relación con los ratones inyectados con solución salina utilizando protocolos estándar. También se evaluaron la bilirrubina total y el BUN. El cambio en los pesos corporales se evaluó sin un cambio significativo en el grupo de solución salina. Los valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la Tabla 31 a continuación.

Tabla 31

ISIS N°	Dosificación mg/kg	ALT	AST	Bilirubina Total	BUN	Conjugado
Salina		26	57	0,2	27	
353382	3	25	92	0,2	27	ninguno
	10	23	40	0,2	25	
	30	29	54	0,1	28	

	ISIS N°	Dosificación mg/kg	ALT	AST	Bilirubina Total	BUN	Conjugado
5	655861	0,5	25	71	0,2	34	GalNac ₃ -1 (3')
		1,5	28	60	0,2	26	
		5	26	63	0,2	28	
		15	25	61	0,2	28	
10	664507	0,5	25	62	0,2	25	GalNac ₃ -2 (5')
		1,5	24	49	0,2	26	
		5	21	50	0,2	26	
		15	59	84	0,1	22	
15	661161	0,5	20	42	0,2	29	GalNac ₃ -3 (5')
		1,5 g	37	74	0,2	25	
		5g	28	61	0,2	29	
		15	21	41	0,2	25	
20	666224	0,5	34	48	0,2	21	GalNac ₃ -5 (5')
		1,5	23	46	0,2	26	
		5	24	47	0,2	23	
		15	32	49	0,1	26	
25	666961	0,5	17	63	0,2	26	GalNac ₃ -6 (5')
		1,5	23	68	0,2	26	
		5	25	66	0,2	26	
		15	29	107	0,2	28	
30	666981	0,5	24	48	0,2	26	GalNac ₃ -7 (5')
		1,5	30	55	0,2	24	
		5	46	74	0,1	24	
		15	29	58	0,1	26	
35	666881	0,5	20	65	0,2	27	GalNac ₃ -10 (5')
		1,5	23	59	0,2	24	
		5	45	70	0,2	26	
		15	21	57	0,2	24	

Ejemplo 60: Efectos de ASO conjugados dirigidos a SRB-1 in vitro

40 **[0353]** Los oligonucleótidos enumerados a continuación se ensayaron en un estudio de dosis múltiple para la inhibición antisentido de **SRB-1** en hepatocitos primarios de ratón. ISIS 353382 fue incluido como un estándar no conjugado. Cada uno de los grupos conjugados se unió al extremo 3' o 5' del oligonucleótido respectivo mediante un resto escindible con nucleósido 2'-desoxiadenosilado unido por fosfodiéster.

45

50

55

60

65

Tabla 39

ASO modificado dirigido a SRB-1				
ASO	Secuencia (5' a 3')	Motivo	Conjugado	SEQ ID NO
5 ISIS 353382	G ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅	5/10/5	ninguno	28
10 ISIS 655861	G ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ A ₅ ^m -GalNAc ₃ -1 _a	5/10/5	GalNAc ₃ -1	29
15 ISIS 655862	G ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ A ₅ ^m -GalNAc ₃ -1 _a	5/10/5	GalNAc ₃ -1	29
15 ISIS 661161	GalNAc₃-3_a ^m A ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅	5/10/5	GalNAc ₃ -3	30
20 ISIS 665001	GalNAc₃-8_a ^m A ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅	5/10/5	GalNAc ₃ -8	30
20 ISIS 664078	G ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ A ₅ ^m -GalNAc ₃ -9 _a	5/10/5	GalNAc ₃ -9	29
25 ISIS 666961	GalNAc₃-6_a ^m A ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅	5/10/5	GalNAc ₃ -6	30
25 ISIS 664507	GalNAc₃-2_a ^m A ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅	5/10/5	GalNAc ₃ -2	30
30 ISIS 666881	GalNAc₃-10_a ^m A ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅	5/10/5	GalNAc ₃ -10	30
30 ISIS 666224	GalNAc₃-5_a ^m A ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅	5/10/5	GalNAc ₃ -5	30
35 ISIS 666981	GalNAc₃-7_a ^m A ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ G ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ G ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅	5/10/5	GalNAc ₃ -7	30

[0354] Las letras mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^mC indica una 5-metil citosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido modificado en 2'-MOE; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica un enlace internucleosídico de fosforotioato (PS); "o" indica un enlace internucleosídico fosfodiéster (PO); y "o" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

[0355] La estructura de GalNAc₃-1_a se mostró previamente en el Ejemplo 9, La estructura de GalNAc₃-3_a se mostró previamente en el Ejemplo 39. La estructura de GalNAc₃-8_a se mostró previamente en el Ejemplo 47. La estructura de GalNAc₃-9_a se mostró previamente en el Ejemplo 52. La estructura de GalNAc₃-6_a se mostró previamente en el Ejemplo 51. La estructura de GalNAc₃-2_a se mostró previamente en el Ejemplo 37. La estructura de GalNAc₃-10_a se mostró previamente en el Ejemplo 46. La estructura de GalNAc₃-5_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 49. La estructura de GalNAc₃-7_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48.

Tratamiento

[0356] Los oligonucleótidos enumerados anteriormente se ensayaron in vitro en células de hepatocitos primarios de ratón plaqueadas a una densidad de 25.000 células por pocillo y se trataron con 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 o 20 nM de oligonucleótido modificado. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real y los niveles de ARNm de SRB-1 se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, según lo medido por RIBOGREEN®.

[0357] La CI₅₀ se calculó utilizando métodos estándar y los resultados se presentan en la Tabla 40. Los resultados muestran que, en condiciones de libre absorción en las que no se utilizan reactivos o técnicas de electroporación para promover artificialmente la entrada de los oligonucleótidos en las células, los oligonucleótidos comprenden un conjugado de GalNAc fue significativamente más potente en los hepatocitos que el oligonucleótido parental (ISIS 353382) que no comprende un conjugado de GalNAc.

Tabla 40

ASO	Cl ₅₀ (nM)	Enlaces internucleosídicos	Conjugado	SEQ ID NO
ISIS 353382	190 ^a	PS	ninguno	28
ISIS 655861	11 ^a	PS	GalNAc ₃ -1	29
ISIS 655862	3	PO/PS	GalNAc ₃ -1	29
ISIS 661161	15 ^a	PS	GalNAc ₃ -3	30
ISIS 665001	20	PS	GalNAc ₃ -8	30
ISIS 664078	55	PS	GalNAc ₃ -9	29
ISIS 666961	22 ^a	PS	GalNAc ₃ -6	30
ISIS 664507	30	PS	GalNAc ₃ -2	30
ISIS 666881	30	PS	GalNAc ₃ -10	30
ISIS 666224	30 ^a	PS	GalNAc ₃ -5	30
ISIS 666981	40	PS	GalNAc ₃ -7	30

^aPromedio de ejecuciones múltiples.

Ejemplo 79: Duración de la acción in vivo de oligonucleótidos dirigidos a APOC-III que comprende un conjugado de GalNAc₃

[0358] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 57 a continuación se analizaron en un estudio de dosis única para determinar la duración de la acción en ratones.

Tabla 57

ASO modificado dirigido a APOC-III				
ISIS NO	Secuencias (5' a 3')	Grupo de GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
304801	A _n G _n "C _n T _n T _n "C _n T _n T _n G _n T _n "C _n "C _n A _n G _n "C _n T _n T _n T _n A _n T _n	n/a	n/a	20
647535	A _n G _n "C _n T _n T _n "C _n T _n T _n G _n T _n "C _n "C _n A _n G _n "C _n T _n T _n T _n A _n T _n A _n -GalNAc ₃ -1 _a	GalNA ₃ -1a	A _d	21
663083	GalNAc ₃ -3 _a -A _n A _n G _n "C _n T _n T _n "C _n T _n T _n G _n T _n "C _n "C _n A _n G _n "C _n T _n T _n T _n A _n T _n	GalNA ₃ -3a	A _d	36
674449	GalNAc ₃ -7 _a -A _n A _n G _n "C _n T _n T _n "C _n T _n T _n G _n T _n "C _n "C _n A _n G _n "C _n T _n T _n T _n A _n T _n	GalNA ₃ -7a	A _d	36
674450	GalNAc ₃ -10 _a -A _n A _n G _n "C _n T _n T _n "C _n T _n T _n G _n T _n "C _n "C _n A _n G _n "C _n T _n T _n T _n A _n T _n	GalNA ₃ -10a	A _d	36
674451	GalNAc ₃ -13 _a -A _n A _n G _n "C _n T _n T _n "C _n T _n T _n G _n T _n "C _n "C _n A _n G _n "C _n T _n T _n T _n A _n T _n	GalNA ₃ -13a	A _d	36

La estructura de GalNAc₃-1a se mostró previamente en el Ejemplo 9, GalNAc₃-3a se mostró en el Ejemplo 39. GalNAc₃-7a se mostró en el Ejemplo 48, GalNAc₃-10a se mostró en el Ejemplo 46, y GalNAc₃-13a se mostró en el Ejemplo 62.

Tratamiento

[0359] Los ratones transgénicos de seis a ocho semanas de edad que expresan APOC-III humano se inyectaron cada uno por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido listado en la Tabla 57 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 3 animales. Se extrajo sangre antes de la dosis para determinar la línea base y a las 72 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas y 6 semanas después de la dosis. Los niveles de triglicéridos en plasma y proteínas APOC-III se midieron como se describe en el Ejemplo 20. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de triglicéridos en plasma y niveles de APOC-III para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles iniciales, lo que muestra que los oligonucleótidos que comprenden un grupo de conjugado GalNAc exhibieron una duración de acción más prolongada que el oligonucleótido original sin un grupo conjugado (ISIS 304801) incluso aunque la dosis del progenitor fue tres veces la dosis de los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc.

Tabla 58

Triglicérido de plasma y niveles de proteína de APOC-III en ratones transgénicos							
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	Punto temporal (días post-dosis)	Triglicéridos (% línea de base)	Proteína APOC-III (%línea de base)	Grupo GalNac ₃	CM	
5 10	PBS	n/a	3	97	102	n/a	n/a
			7	101	98		
			14	108	98		
			21	107	107		
			28	94	91		
			35	88	90		
			42	91	105		
15 20	304801	30	3	40	34	n/a	n/a
			7	41	37		
			14	50	57		
			21	50	50		
			28	57	73		
			35	68	70		
			42	75	93		
25 30	647535	10	3	36	37	GalNac ₃ -1a	A _d
			7	39	47		
			14	40	45		
			21	41	41		
			28	42	62		
			35	69	69		
			42	85	102		
35 40	663083	10	3	24	18	GalNac ₃ -3a	A _d
			7	28	23		
			14	25	27		
			21	28	28		
			28	37	44		
			35	55	57		
			42	60	78		

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Triglicérido de plasma y niveles de proteína de APOC-III en ratones transgénicos						
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	Punto temporal (días post-dosis)	Triglicéridos (% línea de base)	Proteína APOC-III (% línea de base)	Grupo GalNAC ₃	CM
674449	10	3	29	26	GalNAC ₃ -7a	A _d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
674450	10	3	33	30	GalNAC ₃ -10a	A _d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
674451	10	3	35	33	GalNAC ₃ -13a	A _d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

Ejemplo 80: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos a alfa-1 antitripsina (A1AT) que comprende un conjugado GalNAC₃

[0360] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 59 a continuación se ensayaron en un estudio para determinar la inhibición dependiente de la dosis de A1AT en ratones.

Tabla 59

ASO modificados dirigidos a A1AT				
ISIS N°	Secuencias (5' a 3')	Grupo de GalNAC ₃	CM	SEQ ID NO
476366	A ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅	n/a	n/a	37
656326	A ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ -GalNAC ₃ -1a	GalNAC ₃ -1a	A _d	38
678381	GalNAC ₃ -3 _a -A ₁₅ A ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅	GalNAC ₃ -3a	A _d	39
678382	GalNAC ₃ -7 _a -A ₁₅ A ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅	GalNAC ₃ -7a	A _d	39
678383	GalNAC ₃ -10 _a -A ₁₅ A ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅	GalNAC ₃ -10a	A _d	39
678384	GalNAC ₃ -13 _a -A ₁₅ A ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ C ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ A ₁₅	GalNAC ₃ -13a	A _d	39

La estructura de GalNAC₃-1a se mostró previamente en el Ejemplo 9, GalNAC₃-3a se mostró en el Ejemplo 39, GalNAC₃-7a se mostró en el Ejemplo 48, GalNAC₃-10a se mostró en el Ejemplo 46, y GalNAC₃-13a se mostró en el Ejemplo 62.

Tratamiento

[0361] Se inyectaron subcutáneamente ratones machos C57BL/6 de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez por semana a la dosis que se muestra a continuación, para un total de tres dosis, con un oligonucleótido listado en la Tabla 59 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración final. Los niveles de ARNm hepático de A1AT se determinaron utilizando PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de proteína plasmática A1AT se determinaron utilizando el ELISA Alfa-1-Antitripsina de ratón (catálogo # 41-A1AMS-E01, Alpco, Salem, NH). Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de ARNm de hígado A1AT y niveles de proteínas plasmáticas para cada grupo de tratamiento, normalizado para el control de PBS.

[0362] Como se ilustra en la Tabla 60, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido redujo los niveles de proteínas plasmáticas del ARNm del hígado A1AT y de la proteína plasmática A1AT de una manera dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos que comprenden un conjugado de GalNAc fueron significativamente más potentes que el progenitor (ISIS 476366).

Tabla 60

A1AT hígado mRNA y niveles de proteína de plasma					
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	A1AT hígado mRNA (% PBS)	Proteína de plasma A1AT (% PBS)	Grupo GalNAc ₃	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
476366	5	86	78	n/a	n/a
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0.6	99	90	GalNAc ₃ -1a	A _d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0.6	105	90	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0.6	90	79	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0.6	94	84	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0.6	106	91	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

[0363] Los niveles de transaminasas hepáticas y BUN en plasma se midieron en el momento del sacrificio utilizando protocolos estándar. También se midieron los pesos corporales y los pesos de los órganos. Los resultados se muestran en la Tabla 61 a continuación. El peso corporal se muestra como % relativo a la línea de base. Los pesos de los órganos se muestran como % del peso corporal en relación con el grupo de control de PBS.

Tabla 61

ISIS NO	Dosis (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Peso corporal (% línea de base)	Peso de hígado (Rel % BW)	Peso de riñón (Rel % BW)	Peso de bazo (Rel % BW)
PBS	n/a	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0,6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
678381	0,6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0,6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
678383	0,6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0,6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

Ejemplo 81: Duración de la acción in vivo de oligonucleótidos dirigidos a A1AT que comprende un grupo de GalNAc₃

[0364] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 59 se ensayaron en un estudio de dosis única para determinar la duración de la acción en ratones.

Tratamiento

[0365] Se inyectaron ratones C57BL/6 machos de seis semanas de edad cada uno por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido listado en la Tabla 59 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. La sangre se extrajo el día antes de la dosis para determinar la línea base y a los 5, 12, 19 y 25 días después de la dosis. Los niveles de proteína A1AT en plasma se midieron mediante ELISA (ver Ejemplo 80). Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de proteína A1AT en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado de GalNAc fueron más potentes y tuvieron una duración de acción más prolongada que el parental que carece de un conjugado de GalNAc (ISIS 476366). Además, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado 5'-GalNAc (ISIS 678381, 678382, 678383 y 678384) fueron en general incluso más potentes con una duración de acción aún mayor que el oligonucleótido que comprende un conjugado 3'-GalNAc (ISIS 656326).

Tabla 62

Niveles de proteína A1AT de plasma en ratones					
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	Punto de tiempo (días post-dosis)	A1AT (% línea de base)	Grupo GalNAc ₃	CM
PBS	n/a	5	93	n/a	n/a
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	n/a	n/a
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	GalNAc ₃ -3a	A _d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	GalNAc ₃ -7a	A _d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	GalNAc ₃ -10a	A _d
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	GalNAc ₃ -13a	A _d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

Ejemplo 82: Inhibición antisentido in vitro por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprende un conjugado de GalNAc₃

[0366] Se sembraron hepatocitos de hígado de ratón primarios en placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo 2 horas antes del tratamiento. Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 63 se agregaron a 2, 10, 50 o 250 nM en medio Williams E y las células se incubaron durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%. Las células se lisaron 16 horas después de la adición de oligonucleótidos y el ARN total se purificó utilizando RNease 3000 BioRobot (Qiagen). Los niveles de ARNm de SRB-1 se determinaron utilizando PCR en tiempo real y reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los valores de CI₅₀ se determinaron utilizando el software Prism 4 (GraphPad). Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden una variedad de diferentes grupos de conjugados de GalNAc y una variedad de diferentes restos escindibles son significativamente más potentes en un experimento de captación libre in vitro que los oligonucleótidos originales que carecen de un grupo de conjugados de GalNAc (ISIS 353382 y 666841).

Tabla 63

Inhibición de expresión SRB-1 <i>in vitro</i>							
ISIS Nº	Secuencia (5' a 3')	Enlaces	Grupo CalNac	CM	Cl ₅₀ (nM)	SEQ ID NO	
5	353382	G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	n/a	n/a	250	28
10	655861	G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m A ^m -GalNac>1 _a	PS	GalNac 3-1 _a	A _d	40	29
	661161	GalNac>3 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-3 _a	A _d	40	30
15	661162	GalNac>3 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PO/PS	GalNac 3-3 _a	A _d	8	30
	664078	G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m A ^m -GalNac>9 _a	PS	GalNac 3-9 _a	A _d	20	29
20	665001	GalNac>8 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-8 _a	A _d	70	30
	666224	GalNac>5 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-5 _a	A _d	80	30
25	666841	G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PO/PS	n/a	n/a	>25 0	28
	666881	GalNac>10 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-10 _a	A _d	30	30
	666904	GalNac>3 _a -G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-3 _a	PO	9	28
30	666924	GalNac>3 _a -T ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-3 _a	T _d	15	33
	666961	GalNac>6 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-6 _a	A _d	150	30
35	666981	GalNac>7 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-7 _a	A _d	20	30
	670061	GalNac>13 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-13 _a	A _d	30	30
40	670699	GalNac>3 _a -T ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PO/PS	GalNac 3-3 _a	T _d	15	33
	670700	GalNac>3 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PO/PS	GalNac 3-3 _a	A _d	30	30
45	670701	GalNac>3 _a -T ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PO/PS	GalNac 3-3 _a	T _e	25	33
	671144	GalNac>12 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-12 _a	A _d	40	30
50	671165	GalNac>13 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PO/PS	GalNac 3-13 _a	A _d	8	30
	671261	GalNac>14 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-14 _a	A _d	>25 0	30
55	671262	GalNac>15 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PS	GalNac 3-15 _a	A _d	>25 0	30
60	673501	GalNac>7 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PO/PS	GalNac 3-7 _a	A _d	30	30
	673502	GalNac>10 _a -A ^m G ^m C ^m T ^m T ^m C ^m A ^m G ^m T ^m C ^m A ^m T ^m G ^m A ^m C ^m T ^m T ^m C ^m C ^m T ^m T ^m	PO/PS	GalNac 3-10 _a	A _d	8	30

65

675441	GalNAc ₃ -17 _{r-v} :A ₄₀ G ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅	PS	GalNAc ₃ -17 _a	A _d	30	30
675442	GalNAc ₃ -18 _{r-v} :A ₄₀ G ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅	PS	GalNAc ₃ -18 _a	A _d	20	30
677841	G ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ A ₄₀ -GalNAc ₃ -19 _a	PS	GalNAc ₃ -19 _a	A _d	40	29
677842	G ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ A ₄₀ -GalNAc ₃ -20 _a	PS	GalNAc ₃ -20 _a	A _d	30	29
677843	GalNAc ₃ -23 _{r-v} :A ₄₀ G ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅	PS	GalNAc ₃ -23 _a	A _d	40	30

La estructura de GalNAc₃-1_a se mostró previamente en el Ejemplo 9, GalNAc₃-3_a se mostró en el Ejemplo 39, GalNAc₃-5_a se mostró en el Ejemplo 49, GalNAc₃-6_a se mostró en el Ejemplo 51, GalNAc₃-7_a se mostró en el Ejemplo 48, GalNAc₃-8_a se mostró en el Ejemplo 47, GalNAc₃-9_a se mostró en el Ejemplo 52, GalNAc₃-10_a se mostró en el Ejemplo 46, GalNAc₃-12_a se mostró en el Ejemplo 61, GalNAc₃-13_a se mostró en el Ejemplo 62, se mostró GalNAc₃-14_a en Ejemplo 63, GalNAc₃-15_a se mostró en el Ejemplo 64, GalNAc₃-17_a se mostró en el Ejemplo 68, GalNAc₃-18_a se mostró en el Ejemplo 69, GalNAc₃-19_a se mostró en el Ejemplo 70, GalNAc₃-20_a se mostró en el Ejemplo 71 y GalNAc₃-23_a se mostró en el Ejemplo 76.

Ejemplo 83: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos al Factor XI que comprende un grupo de GalNAc₃

[0367] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 64 a continuación se analizaron en un estudio para determinar la inhibición dependiente de la dosis del Factor XI en ratones.

Tabla 64

Oligonucleótidos modificados dirigidos al Factor XI				
ISIS N°	Secuencia (5' a 3')	Grupo GalNAc	CM	SEQ ID NO
404071	T ₀₅ G ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ A ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ G ₀₅	n/a	n/a	31
656173	T ₀₅ G ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ A ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ G ₀₅ A ₄₀ -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	32
663086	GalNAc ₃ -3 _{r-v} :A ₄₀ T ₀₅ G ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ A ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ G ₀₅	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	40
678347	GalNAc ₃ -7 _{r-v} :A ₄₀ T ₀₅ G ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ A ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ G ₀₅	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	40
678348	GalNAc ₃ -10 _{r-v} :A ₄₀ T ₀₅ G ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ A ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ G ₀₅	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	40
678349	GalNAc ₃ -13 _{r-v} :A ₄₀ T ₀₅ G ₀₅ G ₀₅ T ₀₅ A ₀₅ A ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ ¹³ C ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ T ₀₅ ¹³ C ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ A ₀₅ G ₀₅ G ₀₅	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	40

La estructura de GalNAc₃-1_a se mostró previamente en el Ejemplo 9, GalNAc₃-3_a se mostró en el Ejemplo 39, GalNAc₃-7_a se mostró en el Ejemplo 48, GalNAc₃-10_a se mostró en el Ejemplo 46, y GalNAc₃-13_a se mostró en el Ejemplo 62.

Tratamiento

[0368] Los ratones de seis a ocho semanas de edad se inyectaron cada uno por vía subcutánea una vez por semana a una dosis que se muestra a continuación, para un total de tres dosis, con un oligonucleótido listado a continuación o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la dosis final. Los niveles de ARNm hepático del factor XI se midieron mediante PCR en tiempo real y se normalizaron a ciclofilina de acuerdo con los protocolos estándar. También se midieron las transaminasas de hígado, BUN y bilirrubina. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio para cada grupo de tratamiento, normalizado para el control de PBS.

[0369] Como se ilustra en la Tabla 65, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó el ARNm de hígado del Factor XI de una manera dependiente de la dosis. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado de GalNAc eran más potentes que el progenitor que carece de un conjugado de GalNAc (ISIS 404071). Además, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado 5'-GalNAc (ISIS 663086, 678347, 678348 y 678349) eran incluso más potentes que el oligonucleótido que comprende un conjugado 3'-GalNAc (ISIS 656173).

Tabla 65

Factor XI hígado mRNA, transaminasa hepática, BUN y niveles de bilirrubina								
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	Factor XI mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Bilirrubina (mg/dL)	Grupo GalNAc ₃	SEQ ID No.
PBS	n/a	100	63	70	21	0,18	n/a	n/a
404071	3	65	41	58	21	0,15	n/a	31
	10	33	49	53	23	0,15		
	30	17	43	57	22	0,14		
656173	0,7	43	90	89	21	0,16	GalNAc ₃ -1a	32
	2	9	36	58	26	0,17		
	6	3	50	63	25	0,15		
663086	0,7	33	91	169	25	0,16	GalNAc ₃ -3a	40
	2	7	38	55	21	0,16		
	6	1	34	40	23	0,14		
678347	0,7	35	28	49	20	0,14	GalNAc ₃ -7a	40
	2	10	180	149	21	0,18		
	6	1	44	76	19	0,15		
678348	0,7	39	43	54	21	0,16	GalNAc ₃ -10a	40
	2	5	38	55	22	0,17		
	6	2	25	38	20	0,14		
678349	0,7	34	39	46	20	0,16	GalNAc ₃ -13a	40
	2	8	43	63	21	0,14		
	6	2	28	41	20	0,14		

Ejemplo 84: Duración de la acción in vivo de oligonucleótidos dirigidos al Factor XI que comprende un conjugado GalNAc₃

[0370] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 64 se ensayaron en un estudio de dosis única para determinar la duración de la acción en ratones.

Tratamiento

[0371] Los ratones de seis a ocho semanas de edad se inyectaron cada uno por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido listado en la Tabla 64 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. La sangre se extrajo por sangrado de la cola el día antes de la dosis para determinar la línea base y a los 3, 10 y 17 días después de la dosis. Los niveles de proteína del Factor XI en plasma se midieron mediante ELISA utilizando la captura del Factor XI y los anticuerpos de detección biotinilados de R & D Systems, Minneapolis, MN (número de catálogo AF2460 y número BAF2460, respectivamente) y el conjunto de reactivos OptEIA B (número de catálogo 550534, BD Biosciences, San José, CA). Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles plasmáticos de Factor XI para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado de GalNAc fueron más potentes con una duración de acción más prolongada que el parental que carece de un conjugado de GalNAc (ISIS 404071). Además, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado 5'-GalNAc (ISIS 663086, 678347, 678348 y 678349) eran aún más potentes con una acción de duración incluso más larga que el oligonucleótido que comprende un conjugado 3'-GalNAc (ISIS 656173).

Tabla 66

Niveles de proteína del factor XI en plasma en ratones						
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	Punto de tiempo (days post- dose)	Factor XI (% línea de base)	Grupo GalNAC ₃	CM	SEQ ID No.
5 PBS	n/a	3	123	n/a	n/a	n/a
		10	56			
		17	100			
10 404071	30	3	11	n/a	n/a	31
		10	47			
		17	52			
15 656173	6	3	1	GalNAC ₃ -1a	A _d	32
		10	3			
		17	21			
20 663086	6	3	1	GalNAC ₃ -3a	A _d	40
		10	2			
		17	9			
25 678347	6	3	1	GalNAC ₃ -7a	A _d	40
		10	1			
		17	8			
30 678348	6	3	1	GalNAC ₃ -10a	A _d	40
		10	1			
		17	6			
30 678349	6	3	1	GalNAC ₃ -13a	A _d	40
		10	1			
		17	5			

35 **Ejemplo 85: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprende un conjugado de GalNAC₃**

40 [0372] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 63 se ensayaron en un estudio dependiente de la dosis para la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

40 *Tratamiento*

45 [0373] Se inyectaron ratones C57BL/6 de seis a ocho semanas de edad cada uno por vía subcutánea una vez por semana a la dosis que se muestra a continuación, para un total de tres dosis, con un oligonucleótido incluido en la Tabla 63 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 48 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 utilizando PCR en tiempo real y reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado para cada grupo de tratamiento, normalizado para el control de solución salina.

50 [0374] Como se ilustra en las Tablas 67 y 68, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una manera dependiente de la dosis.

55

60

65

Tabla 67

SRB-1 mRNA en hígado				
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% Salina)	Grupo GalNAC ₃	CM
Salina	n/a	100	n/a	n/a
655861	0,1	94	GalNAC ₃ -1a	A _d
	0,3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0,1	120	GalNAC ₃ -3a	A _d
	0,3	107		
	1	68		
	3	26		

SRB-1 mRNA en hígado				
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% Salina)	Grupo GalNAC ₃	CM
666881	0,1	107	GalNAC ₃ -10a	A _d
	0,3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0,1	120	GalNAC ₃ -7a	A _d
	0,3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0,1	118	GalNAC ₃ -13a	A _d
	0,3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0,1	119	GalNAC ₃ -20a	A _d
	0,3	96		
	1	65		
	3	23		

Tabla 68

SRB-1 mRNA en hígado				
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% Salina)	Grupo GalNAC ₃	CM
661161	0,1	107	GalNAC ₃ -3a	A _d
	0,3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0,1	110	GalNAC ₃ -19a	A _d
	0,3	88		
	1	52		
	3	25		

[0375] Niveles de transaminasa de hígado, bilirubina total, BUN, y pesos corporales también se midieron usando protocolos estándar. Valores medios para cada grupo de tratamiento se mostraron en Tabla 69 a continuación.

Tabla 69

ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirubina (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Peso corporal (% línea de base)	Grupo GaINAc ₃	CM	
5	Salina	n/a	19	39	0,17	26	118	n/a	n/a
10	655861	0,1	25	47	0,17	27	114	GaINAc ₃ - 1a	A _d
		0,3	29	56	0,15	27	118		
		1	20	32	0,14	24	112		
		3	27	54	0,14	24	115		
15	661161	0,1	35	83	0,13	24	113	GaINAc ₃ - 3a	A _d
		0,3	42	61	0,15	23	117		
		1	34	60	0,18	22	116		
		3	29	52	0,13	25	117		
20	666881	0,1	30	51	0,15	23	118	GaINAc ₃ - 10a	A _d
		0,3	49	82	0,16	25	119		
		1	23	45	0,14	24	117		
		3	20	38	0,15	21	112		
25	666981	0,1	21	41	0,14	22	113	GaINAc ₃ - 7a	A _d
		0,3	29	49	0,16	24	112		
		1	19	34	0,15	22	111		
		3	77	78	0,18	25	115		
30	670061	0,1	20	63	0,18	24	111	GaINAc ₃ - 13a	A _d
		0,3	20	57	0,15	21	115		
		1	20	35	0,14	20	115		
		3	27	42	0,12	20	116		
35	677842	0,1	20	38	0,17	24	114	GaINAc ₃ - 20a	A _d
		0,3	31	46	0,17	21	117		
		1	22	34	0,15	21	119		
		3	41	57	0,14	23	118		

Ejemplo 86: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos a TTR que comprende un grupo de GaINAc₃

[0376] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 70 a continuación se analizaron en un estudio dependiente de la dosis para determinar la inhibición antisentido de transtiretina humana (TTR) en ratones transgénicos que expresan el gen TTR humano.

Tratamiento

[0377] Se inyectaron ratones transgénicos TTR de ocho semanas de edad cada uno por vía subcutánea una vez por semana durante tres semanas, para un total de tres dosis, con un oligonucleótido y una dosis enumerados en las tablas a continuación o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración final. Los sangrados de la cola se realizaron en varios puntos temporales a lo largo del experimento, y los niveles de proteína TTR en plasma, ALT y AST se midieron y se informaron en las Tablas 72-74. Después de sacrificar a los animales, se midieron los niveles plasmáticos de ALT, AST y TTR humana, al igual que el peso corporal, el peso de los órganos y los niveles de ARNm de TTR hepático humano. Los niveles de proteína TTR se midieron utilizando un analizador clínico (AU480, Beckman Coulter, CA). La PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) se utilizaron de acuerdo con los protocolos estándar para determinar los niveles de ARNm de TTR en el hígado humano. Los resultados presentados en las Tablas 71-74 son los valores promedio para cada grupo de tratamiento. Los niveles de ARNm son los valores promedio en relación con el promedio para el grupo de PBS. Los niveles de proteína plasmática son los valores promedio en relación con el valor promedio para el grupo de PBS al inicio del estudio. Los pesos corporales son el porcentaje promedio de cambio de peso desde la línea de base hasta el sacrificio por cada grupo de tratamiento individual. Los pesos de órganos mostrados se normalizan al peso corporal del animal, y el peso de órganos normalizado promedio para cada grupo de tratamiento se presenta en relación con el peso de órganos normalizado promedio para el grupo de PBS.

[0378] En las Tablas 71-74, "BL" indica la línea de base, mediciones que se tomaron justo antes de la primera dosis.

Como se ilustra en las Tablas 71 y 72, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de expresión de TTR de una manera dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos que comprenden un conjugado de GalNAc eran más potentes que el progenitor que carecía de un conjugado de GalNAc (ISIS 420915). Además, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado de GalNAc y enlaces mixtos de internucleótidos PS/PO eran incluso más potentes que el oligonucleótido que comprende un conjugado de GalNAc y enlaces completos de PS.

Tabla 70

ISIS N°	Secuencia 5' a 3'	Enlaces	Grupo GalNAc	CM	SEQ ID NO
420915	T ₀₀ ^m C ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ G ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ A ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀	PS	n/a	n/a	41
660261	T ₀₀ ^m C ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ G ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ A ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ -GalNAc ₃ -1 _a	PS	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	42
682883	GalNAc ₃ -3 _a -T ₀₀ ^m C ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ G ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ A ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀	PS/PO	GalNAc ₃ -3 _a	PO	74
682884	GalNAc ₃ -7 _a -T ₀₀ ^m C ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ G ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ A ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀	PS/PO	GalNAc ₃ -7 _a	PO	41
682885	GalNAc ₃ -10 _a -T ₀₀ ^m C ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ G ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ A ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀	PS/PO	GalNAc ₃ -10 _a	PO	41
682886	GalNAc ₃ -13 _a -T ₀₀ ^m C ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ G ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ A ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀	PS/PO	GalNAc ₃ -13 _a	PO	41
684057	T ₀₀ ^m C ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ G ₀₀ T ₀₀ T ₀₀ A ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ G ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ A ₀₀ T ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ ^m C ₀₀ A ₀₀ -GalNAc ₃ -19 _a	PS/PO	GalNAc ₃ -19 _a	A _d	42

[0379] La leyenda de la Tabla 72 se puede encontrar en el Ejemplo 74. La estructura de GalNAc₃-1 se mostró en el Ejemplo 9. La estructura de GalNAc₃-3_a se mostró en el Ejemplo 39. La estructura de GalNAc₃-7_a se mostró en el Ejemplo 48. La estructura de GalNAc₃-10_a se muestra en el Ejemplo 46. La estructura de GalNAc₃-13_a se muestra en el Ejemplo 62. La estructura de GalNAc₃-19_a se muestra en el Ejemplo 70.

Tabla 71

Inhibición antisentido de TTR humano in vivo						
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	Proteína TTR de plasma (% PBS)	Proteína de plasma TTR	CM	SEQ ID No.
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a	
420915	6	99	95	n/a	n/a	41
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0.6	113	87	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	42
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

Tabla 72

Inhibición antisentido de TTR humano in vivo									
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	Proteína TTR de plasma (% PBS at BL)				Grupo GalNAc	CM	SEQ ID NO
			BL	Día 3	Día 10	Día 17 (Después de sac)			
PBS	n/a	100	100	96	90	114	n/a	n/a	
420915	6	74	106	86	76	83	n/a	n/a	41
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0,6	60	88	73	63	68	GalNAc ₃ - 3a	PO	41
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0,6	56	88	78	63	67	GalNAc ₃ - 7a	PO	41
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			
682885	0,6	60	92	77	68	76	GalNAc ₃ - 10a	PO	41
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0,6	57	91	70	64	69	GalNAc ₃ - 13a	PO	41
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0,6	53	80	69	56	62	GalNAc ₃ - 19a	A _d	42
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 73

Niveles de transaminasa, cambios de peso corporal, y pesos de órganos relativos														
Isis No.	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)			AST (U/L)			Cuerpo (% BL)	Hígado (% PBS)	Bazo (% PBS)	Riñón (% PBS)	SEQ ID No.		
		BL	Día 3	Día 10	Día 17	BL	Día 3						Día 10	Día 17
PBS	n/a	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	n/a	
	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	
420915	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	41	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0.6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	42	
660261	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 74

Isis No.	Dosificación (mg/kg)	Niveles de transaminasa, cambios de peso corporal, y pesos de órganos relativos												SEQ ID No.
		ALT (U/L)				AST (U/L)				Cuerpo (% BL)	Hígado (% PBS)	Bazo (% PBS)	Riñón (% PBS)	
		BL	Día 3	Día 10	Día 17	BL	Día 3	Día 10	Día 17					
PBS	n/a	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	n/a
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	41
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
	0.6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	
682883	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	41
	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
	0.6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	
	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
682884	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
	0.6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	
682885	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	41
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
	0.6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
682886	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
	0.6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	
684057	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	42
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

Ejemplo 88: modulación de empalme in vivo por oligonucleótidos dirigidos a SMN que comprende un conjugado de GalNAc3

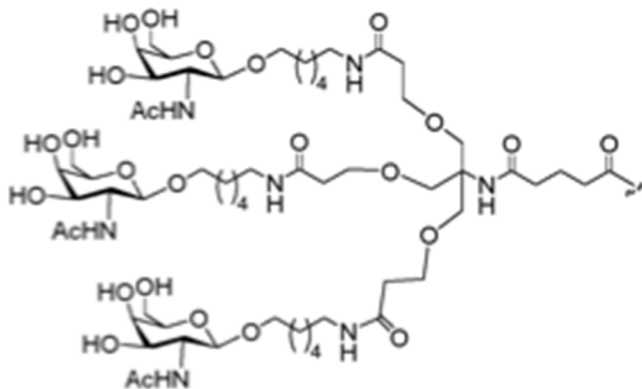
[0380] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 77 se ensayaron para la modulación de empalme de la supervivencia humana de la neurona motora (SMN) en ratones.

Tabla 77

ASO modificados dirigidos a SMN

ISIS No.	Secuencias (5' a 3')	Grupo GAINAc ₂	CM	SEQ ID No.
387954	A ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ A ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ G ₅ ^m G ₅	n/a	n/a	43
699819	GalNAc₃-7_a -A ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ A ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ G ₅ ^m G ₅	GalNAc ₃ -7 _a	PO	43
699821	GalNAc₃-7_a -A ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ A ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ G ₅ ^m G ₅	GalNAc ₃ -7 _a	PO	43
700000	A ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A ₅ T ₅ A ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ G ₅ ^m G ₅ - GalNAc₃-1_a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	44
703421	X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	n/a	n/a	43
703422	GalNAc₃-7_b -X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	GalNAc ₃ -7 _b	n/a	43

La estructura de GalNAc₃-7_a se mostró previamente en el Ejemplo 48. "X" indica una amina primaria 5' generada por Gene Tools (Philomath, OR), y GalNAc₃-7_b indica la estructura de GalNAc₃-7_a que carece de porción -NH-C₆-O del enlazador como se muestra abajo:



Los números ISIS 703421 y 703422 son oligonucleótidos de morfino, en los que cada nucleótido de los dos oligonucleótidos es un nucleótido de morfolino.

Tratamiento

[0381] Los ratones transgénicos de seis semanas de edad que expresan SMN humana se inyectaron por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido listado en la Tabla 78 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 2 hombres y 2 mujeres. Los ratones se sacrificaron 3 días después de la dosis para determinar los niveles de ARNm de SMN humano hepático con y sin el exón 7 usando PCR en tiempo real de acuerdo con los protocolos estándar. El ARN total se midió utilizando el reactivo de Ribogreen. Los niveles de ARNm de SMN se normalizaron con respecto al ARNm total, y se normalizaron aún más a los promedios para el grupo de tratamiento con solución salina. Las proporciones promedio resultantes de ARNm de SMN, incluido el exón 7 y el exón 7 faltante del ARNm de SMN, se muestran en la Tabla 78. Los resultados muestran que los oligonucleótidos completamente modificados que modulan el empalme y comprenden un conjugado de GalNAc son significativamente más potentes para alterar el corte y empalme en el hígado que el progenitor oligonucleótidos que carecen de un conjugado GalNAc. Además, esta tendencia se mantiene para las químicas de modificación múltiple, incluidos los oligonucleótidos modificados con 2'-MOE y morfolino.

5

Tabla 78

10

15

20

Efecto de los oligonucleótidos dirigidos a la SMN humana in vivo					
ISIS NO	Dosis (mg/kg)	+Exon 7 / -Exon 7	Grupo GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
Salina	n/a	1.00	n/a	n/a	n/a
387954	32	1.65	n/a	n/a	43
387954	288	5.00	n/a	n/a	43
699819	32	7.84	GalNAc ₃ -7a	PO	43
699821	32	7.22	GalNAc ₃ -7a	PO	43
700000	32	6.91	GalNAc ₃ -1a	A _d	44
703421	32	1.27	n/a	n/a	43
703422	32	4.12	GalNAc ₃ -7 _b	n/a	43

Ejemplo 89: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos a la apolipoproteína A (Apo (a)) que comprende un conjugado de GalNAc₃

25

[0382] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 79 a continuación se analizaron en un estudio para determinar la inhibición dependiente de la dosis de Apo (a) en ratones transgénicos.

30

Tabla 79

35

ASO modificados dirigidos a Apo(a)				
ISIS N°	Secuencia (5' a 3')	Grupo GalNAc ₃	CM	SEQ ID N°
494372	T ₅ G ₅ T ₅ C ₅ T ₅ C ₅ C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ C ₅	n/a	n/a	53
681257	GalNAc ₃ -7 _a -T ₅ G ₅ T ₅ C ₅ T ₅ C ₅ C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ C ₅	GalNAc ₃ -7a	PO	53

40

[0383] La estructura de GalNAc₃-7_a se muestra en el Ejemplo 48.

Tratamiento

45

50

55

[0384] Se inyectaron subcutáneamente ratones hembra C57BL/6 de ocho semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez por semana a la dosis que se muestra a continuación, para un total de seis dosis, con un oligonucleótido listado en la Tabla 79 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 3-4 animales. Los sangrados de la cola se realizaron el día antes de la primera dosis y semanalmente después de cada dosis para determinar los niveles plasmáticos de proteína Apo(a). Los ratones se sacrificaron dos días después de la administración final. Los niveles de ARNm hepático de Apo(a) se determinaron utilizando PCR en tiempo real y reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de proteína plasmática Apo(a) se determinaron mediante ELISA y se determinaron los niveles de transaminasas hepáticas. Los resultados de ARNm y proteína plasmática en la Tabla 80 se presentan como el porcentaje promedio del grupo de tratamiento en relación con el grupo tratado con PBS. Los niveles de proteína plasmática se normalizaron aún más con respecto al valor de referencia (BL) para el grupo de PBS. Los niveles medios absolutos de transaminasas y los pesos corporales (% en relación con los promedios de referencia) se presentan en la Tabla 81.

60

65

[0385] Como se ilustra en la Tabla 80, el tratamiento con los oligonucleótidos redujo los niveles de mRNA del hígado y proteínas plasmáticas de Apo(a) de una manera dependiente de la dosis. Además, el oligonucleótido que comprende el conjugado GalNAc fue significativamente más potente con una duración de acción más prolongada que el oligonucleótido original que carece de un conjugado GalNAc. Como se ilustra en la Tabla 81, los oligonucleótidos no afectaron los niveles de transaminasas y los pesos corporales, lo que indica que los oligonucleótidos fueron bien tolerados.

Tabla 80

Apo (a) mRNA hepático y niveles de proteínas plasmáticas									
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	Apo(a) mRNA (% PBS)	Apo(a) proteína plasmática (% PBS)						
			BL	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
PBS	n/a	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0.3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

Tabla 81

ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Peso corporal (% línea de base)
PBS	n/a	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0.3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

Ejemplo 90: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos a TTR que comprenden un grupo de GalNAc₃

[0386] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 82 a continuación se analizaron en un estudio dependiente de la dosis para determinar la inhibición antisentido de transtiretina humana (TTR) en ratones transgénicos que expresan el gen TTR humano.

Tratamiento

[0387] Los ratones transgénicos TTR se inyectaron cada uno por vía subcutánea una vez por semana durante tres semanas, durante un total de tres dosis, con un oligonucleótido y una dosis enumerados en la Tabla 83 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Antes de la primera dosis, se realizó un sangrado de la cola para determinar los niveles de proteína TTR en plasma al inicio del estudio (BL). Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración final. Los niveles de proteína TTR se midieron utilizando un analizador clínico (AU480, Beckman Coulter, CA). La PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) se utilizaron de acuerdo con los protocolos estándar para determinar los niveles de ARNm de TTR en el hígado humano. Los resultados presentados en la Tabla 83 son los valores promedio para cada grupo de tratamiento. Los niveles de ARNm son los valores promedio en relación con el promedio para el grupo de PBS. Los niveles de proteína plasmática son los valores promedio en relación con el valor promedio para el grupo de PBS al inicio del estudio. "BL" indica la línea de base, las mediciones que se tomaron justo antes de la primera dosis. Como se ilustra en la Tabla 83, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido redujo los niveles de expresión de TTR de una manera dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos que comprendían un conjugado de GalNAc eran más potentes que el progenitor que carecía de un conjugado de GalNAc (ISIS 420915), y los oligonucleótidos que comprendían un fosfodiéster o un resto escindible de desoxiadenosina mostraron mejoras significativas en la potencia en comparación con el parental carente de conjugado (véanse los números de ISIS 682883 y 666943 vs 420915 y ver los Ejemplos 86 y 87).

Tabla 82

Oligonucleótidos dirigidos a TTR humano					
Isis N°	Secuencia 5' a 3'	Enlaces	Grupo GalNAc	CM	SEQ ID N°
420915	T ₁₅ ^m C ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ A ₁₅ ^m C ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ ^m C _{15^mC_{15^mC₁₅}}	PS	n/a	n/a	41
682883	GalNAc _{3-3a} -T ₁₅ ^m C ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ A ₁₅ ^m C ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ ^m C _{15^mC_{15^mC₁₅}}	PS/PO	GalNAc _{3-3a}	PO	41
666943	GalNAc _{3-3a} -A ₁₅ T ₁₅ ^m C ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ A ₁₅ ^m ^m C ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ ^m C _{15^mC_{15^mC₁₅}}	PS/PO	GalNAc _{3-3a}	A _d	45
682887	GalNAc _{3-7a} -A ₁₅ T ₁₅ ^m C ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ A ₁₅ ^m ^m C ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ ^m C _{15^mC_{15^mC₁₅}}	PS/PO	GalNAc _{3-7a}	A _d	45
682888	GalNAc _{3-10a} -A ₁₅ T ₁₅ ^m C ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ A ₁₅ ^m ^m C ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ ^m C _{15^mC_{15^mC₁₅}}	PS/PO	GalNAc _{3-10a}	A _d	45
682889	GalNAc _{3-13a} -A ₁₅ T ₁₅ ^m C ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ G ₁₅ T ₁₅ T ₁₅ A ₁₅ ^m ^m C ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ G ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ A ₁₅ T ₁₅ ^m C _{15^mC_{15^mC₁₅}}	PS/PO	GalNAc _{3-13a}	A _d	45

La leyenda para la Tabla 82 se puede encontrar en el Ejemplo 74. La estructura de GalNAc_{3-3a} se mostró en el Ejemplo 39. La estructura de GalNAc_{3-7a} se mostró en el Ejemplo 48. La estructura de GalNAc_{3-10a} se mostró en el Ejemplo 46. La estructura de GalNAc_{3-13a} se mostró en el Ejemplo 62.

Tabla 83

Inhibición antisentido de TTR humano in vivo					
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	Proteína TTR (% BL)	Grupo GalNAc	CM
PBS	n/a	100	124	n/a	n/a
420915	6	69	114	n/a	n/a
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0,6	61	73	GalNAc _{3-3a}	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0,6	74	93	GalNAc _{3-3a}	A _d
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0,6	60	97	GalNAc _{3-7a}	A _d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0,6	65	92	GalNAc _{3-10a}	A _d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0,6	72	74	GalNAc _{3-13a}	A _d
	2	38	45		
	6	16	18		

Ejemplo 92: Inhibición antisentido en hepatocitos primarios por oligonucleótidos antisentido dirigidos a Apo-CIII que comprenden un conjugado de GalNAc₃

[0388] Se sembraron hepatocitos primarios de ratón en placas de 96 pocillos a 15.000 células por pocillo, y los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 86, dirigidos a ApoC-III de ratón, se agregaron a 0,46, 1,37, 4,12 o 12,35, 37,04, 111,11, o 333,33 nM o 1,00 mM. Después de la incubación con los oligonucleótidos durante 24 horas, las células se lisaron y el ARN total se purificó utilizando RNeasy (Qiagen). Los niveles de ARNm de ApoC-III se determinaron utilizando PCR en tiempo real y reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes,

Inc.) de acuerdo con los protocolos estándar. Los valores de Cl₅₀ se determinaron utilizando el software Prism 4 (GraphPad). Los resultados muestran que, independientemente de si el resto escindible era un fosfodiéster o una desoxiadenosina unida a fosfodiéster, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado de GalNAc fueron significativamente más potentes que el oligonucleótido original que carece de conjugado.

5

Tabla 86

Inhibición de la expresión de APOC-III de ratón en hepatocitos primarios de ratón				
ISIS N°	Secuencia (5' a 3')	CM	Cl ₅₀ (nM)	SEQ ID N°
440670	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	n/a	13,20	47
661180	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} -GalNAc ₃ -1 _a	A _d	1,40	48
680771	GalNAc₃-3_a ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	0,70	47
680772	GalNAc₃-7_a ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1,70	47
680773	GalNAc₃-10_a ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	2,00	47
680774	GalNAc₃-13_a ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1,50	47
681272	GalNAc₃-3_a ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	< 0,46	47
681273	GalNAc₃-3_a ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	A _d	1,10	49
683733	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} -GalNAc ₃ -19 _a	A _d	2,50	48

La estructura de GalNAc₃-1_a se mostró previamente en el Ejemplo 9, GalNAc₃-3_a se mostró en el Ejemplo 39, GalNAc₃-7_a se mostró en el Ejemplo 48, GalNAc₃-10_a se mostró en el Ejemplo 46, GalNAc₃-13_a se mostró en el Ejemplo 62, y GalNAc₃-19_a se mostró en el Ejemplo 70.

Ejemplo 93: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprende alas mixtas y un conjugado 5'-GalNAc₃

[0389] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 87 se ensayaron en un estudio dependiente de la dosis para la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tabla 87

ISIS N°	Secuencias (5' a 3')	Grupo GalNAc ₃	CM	SEQ ID N°
449093	T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	n/a	n/a	50
699806	GalNAc₃-3_a ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3 _a	PO	50
699807	GalNAc₃-7_a ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	50
699809	GalNAc₃-7_a ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	50
699811	GalNAc₃-7_a ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	50
699813	GalNAc₃-7_a ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	50
699815	GalNAc₃-7_a ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	50

La estructura de GalNAc₃-3_a se mostró previamente en el Ejemplo 39, y la estructura de GalNAc₃-7_a se mostró previamente en el Ejemplo 48, Subíndices: "e" indica nucleósido modificado en 2'-MOE; "d" indica β-D-2'-desoxirribonucleósido; "k" indica 6'-(s)-CH₃ nucleósido bicíclico (cEt); "s" indica enlaces internucleosídicos de fosforotioato (PS); "o" indica los enlaces internucleosídicos fosfodiéster (PO). La superíndice "m" indica 5-metilcitosinas.

Tratamiento

[0390] Se inyectaron por vía subcutánea ratones C57BL/6 de seis a ocho semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez a la dosis que se muestra a continuación con un oligonucleótido listado en la Tabla 87 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración final. Los niveles de ARNm de SRB-1 de hígado se midieron utilizando PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm de SRB-1 se normalizaron a los niveles de ARNm de ciclofilina de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento en relación con el grupo de control de solución salina. Como se ilustra en la Tabla 88, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido redujo los niveles de ARNm de SRB-1 de una manera dependiente de la dosis, y los oligonucleótidos gámpmero que comprenden un conjugado de GalNAc y que tienen alas que eran modificaciones completas de cEt o azúcares mixtas fueron significativamente más potentes que el original oligonucleótido que carece de un conjugado y que comprende alas modificadas con cEt completas.

[0391] Los pesos corporales, las transaminasas hepáticas, la bilirrubina total y el BUN también se midieron, y los valores promedio para cada grupo de tratamiento se muestran en la Tabla 88. El peso corporal se muestra como el porcentaje del peso corporal promedio en relación con el peso corporal inicial (% BL) medido justo antes de la dosis de oligonucleótido.

Tabla 88

SRB-1 mRNA, ALT, AST, BUN y niveles totales de bilirrubina y pesos corporales							
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bil	BUN	Peso corporal (% BL)
PBS	n/a	100	31	84	0,15	28	102
449093	1	111	18	48	0,17	31	104
	3	94	20	43	0,15	26	103
	10	36	19	50	0,12	29	104
699806	0,1	114	23	58	0,13	26	107
	0,3	59	21	45	0,12	27	108
	1	25	30	61	0,12	30	104
699807	0,1	121	19	41	0,14	25	100
	0,3	73	23	56	0,13	26	105
	1	24	22	69	0,14	25	102
699809	0,1	125	23	57	0,14	26	104
	0,3	70	20	49	0,10	25	105
	1	33	34	62	0,17	25	107
699811	0,1	123	48	77	0,14	24	106
	0,3	94	20	45	0,13	25	101
	1	66	57	104	0,14	24	107
699813	0,1	95	20	58	0,13	28	104
	0,3	98	22	61	0,17	28	105
	1	49	19	47	0,11	27	106
699815	0,1	93	30	79	0,17	25	105
	0,3	64	30	61	0,12	26	105
	1	24	18	41	0,14	25	106

Ejemplo 94: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprende modificaciones en 2'-azúcar y un conjugado 5'-GalNAc₃

[0392] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 89 se ensayaron en un estudio dependiente de la dosis para la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tabla 89

ISIS N°	Secuencias (5' a 3')	Grupo GalNAc ₃	CM	SEQ ID N°
353382	G _m ^m C _m T _m T _m ^m C _m A _m G _m T _m ^m C _m A _m T _m G _m A _m ^m C _m T _m T _m ^m C _m T _m ^m C _m T _m ^m C _m T _m ^m	n/a	n/a	28
700989	G _m C _m U _m U _m C _m A _m G _m T _m ^m C _m A _m T _m G _m A _m ^m C _m T _m U _m C _m C _m U _m U _m	n/a	n/a	51
666904	GalNAc₃-3_a -G _m ^m C _m T _m T _m ^m C _m A _m G _m T _m ^m C _m A _m T _m G _m A _m ^m C _m T _m T _m ^m C _m T _m ^m C _m T _m ^m	GalNAc ₃ -3a	PO	28
700991	GalNAc₃-7_a -G _m C _m U _m U _m C _m A _m G _m T _m ^m C _m A _m T _m G _m A _m ^m C _m T _m U _m C _m C _m U _m U _m	GalNAc ₃ -7a	PO	51

El subíndice "m" indica un nucleósido modificado con 2'-O-metilo. Vea el Ejemplo 74 para la leyenda completa de la tabla. La estructura de GalNAc₃-3_a se mostró previamente en el Ejemplo 39, y la estructura de GalNAc₃-7_a se mostró previamente en el Ejemplo 48.

Tratamiento

[0393] El estudio se completó utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 93, Los resultados se muestran en la Tabla 90 a continuación y muestran que los oligonucleótidos modificados en 2'-MOE y 2'-OME que comprenden un conjugado de GalNAc fueron significativamente más potentes que los oligonucleótidos parentales respectivos que carecen de un conjugado. Los resultados de los pesos corporales, las transaminasas hepáticas, la bilirrubina total y las mediciones de BUN indicaron que todos los compuestos fueron bien tolerados.

Tabla 90

SRB-1 mRNA		
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
PBS	n/a	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

Ejemplo 95: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprende nucleósidos bicíclicos y un conjugado 5'-GalNAc₃

[0394] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 91 se ensayaron en un estudio dependiente de la dosis para la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tabla 91

ASO modificados dirigidos a SRB-1		Grupo	CM	SEQ
5	ISIS Secuencias (5' a 3')	GalNAc ₃		ID No
	NO	n/a	n/a	22
	440762 T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k			
	666905 GalNAc_{3-3a} -	GalNAc _{3-3a}	PO	22
10	o,T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k			
	699782 GalNAc_{3-7a} -	GalNAc _{3-7a}	PO	22
	o,T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k			
	699783 GalNAc_{3-3a} -	GalNAc _{3-3a}	PO	22
15	o,T _{Is} ^m C _{Is} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{Is} ^m C _I			
	653621 T _{Is} ^m C _{Is} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{Is} ^m C _I oAdo.-	GalNAc _{3-1a}	A _d	23
	GalNAc_{3-1a}			
20	439879 T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _g	n/a	n/a	22
	699789 GalNAc_{3-3a} -	GalNAc _{3-3a}	PO	22
	o,T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _g			

25 El subíndice "g" indica un nucleósido fluoro-HNA, el subíndice "1" indica un nucleósido bloqueado que comprende un puente 2'-O-CH₂-4'. Vea la leyenda de la tabla del Ejemplo 74 para otras abreviaturas. La estructura de GalNAc_{3-1a} se mostró previamente en el Ejemplo 9, la estructura de GalNAc_{3-3a} se mostró previamente en el Ejemplo 39, y la estructura de GalNAc_{3-7a} se mostró previamente en el Ejemplo 48.

30 *Tratamiento*

35 **[0395]** El estudio se completó utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 93. Los resultados se muestran en la Tabla 92 a continuación y muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado de GalNAc y varias modificaciones de nucleósidos bicíclicos fueron significativamente más potentes que el oligonucleótido original que carece de un conjugado y que comprende modificaciones de nucleósidos bicíclicos. Además, el oligonucleótido que comprende un conjugado de GalNAc y modificaciones de fluoro-HNA fue significativamente más potente que el progenitor que carece de un conjugado y que comprende modificaciones de fluoro-HNA. Los resultados de los pesos corporales, las transaminasas hepáticas, la bilirrubina total y las mediciones de BUN indicaron que todos los

40 compuestos fueron bien tolerados.

Tabla 92

Niveles de SRB-1 mRNA, ALT, AST, BUN y Bilirubina total y pesos corporales		
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
PBS	n/a	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0,1	105
	0,3	56
	1	18
699782	0,1	93
	0,3	63
	1	15
699783	0,1	105
	0,3	53
	1	12
653621	0,1	109
	0,3	82
	1	27

Niveles de SRB-1 mRNA, ALT, AST, BUN y Bilirubina total y pesos corporales		
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0,1	82
	0,3	69
	1	26

15 **Ejemplo 96: Unión a proteínas plasmáticas de oligonucleótidos antisentido que comprenden un grupo conjugado GalNAC₃**

20 **[0396]** Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 57 dirigidos a ApoC-III y los oligonucleótidos en la Tabla 93 dirigidos a Apo(a) fueron ensayados en un ensayo de ultrafiltración para evaluar la unión a proteínas plasmáticas.

Tabla 93
Oligonucleótidos modificados dirigidos a Apo(a)

ISIS N°	Secuencias (5' a 3')	Grupo GalNAC ₃	CM	SEQ ID No
494372	T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ C ₀ C ₀ G ₀ T ₀ T ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ T ₀ G ₀ T ₀ T ₀ C ₀	n/a	n/a	53
693401	T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ C ₀ C ₀ G ₀ T ₀ T ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ T ₀ G ₀ T ₀ T ₀ C ₀	n/a	n/a	53
681251	GalNAC ₃ -7 _{xy} -T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ C ₀ C ₀ G ₀ T ₀ T ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ T ₀ G ₀ T ₀ T ₀ C ₀	GalNAC ₃ -7 _a	PO	53
681257	GalNAC ₃ -7 _{xy} -T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ C ₀ C ₀ G ₀ T ₀ T ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ C ₀ T ₀ T ₀ G ₀ T ₀ T ₀ C ₀	GalNAC ₃ -7 _a	PO	53

25 Vea el Ejemplo 74 para la leyenda de la tabla. La estructura de GalNAC₃-7_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48.

30 **[0397]** Las unidades de ultrafiltración Ultrafree-MC (30.000 NMWL, membrana de celulosa regenerada de baja unión, Millipore, Bedford, MA) se acondicionaron previamente con 300 µl de Tween 80 al 0,5% y se centrifugaron a 2000 g durante 10 minutos, luego con 300 µl de una solución de 300 µg/ml de un oligonucleótido de control en H₂O y se centrifugaron a 2000 g durante 16 minutos. Con el fin de evaluar la unión no específica a los filtros de cada oligonucleótido de prueba de las Tablas 57 y 93 que se usarán en los estudios, se colocaron 300 µl de una solución de oligonucleótido en H₂O a 250 ng/ml a pH 7,4 en el preacondicionado. Filtros y centrifugados a 2000 g durante 16 minutos. Las muestras sin filtrar y filtradas se analizaron mediante un ensayo ELISA para determinar las concentraciones de oligonucleótidos. Se usaron tres réplicas para obtener una concentración promedio para cada muestra. La concentración promedio de la muestra filtrada con respecto a la muestra no filtrada se usa para determinar el porcentaje de oligonucleótido que se recupera a través del filtro en ausencia de plasma (% de recuperación).

40 **[0398]** Las muestras de plasma completo congeladas recogidas en K3-EDTA de voluntarios humanos normales y libres de fármacos, monos cynomolgus y ratones CD-1, se compraron a Bioreclamation LLC (Westbury, NY). Los oligonucleótidos de prueba se agregaron a alícuotas de plasma de 1,2 ml a dos concentraciones (5 y 150 µg/ml). Se colocó una alícuota (300 µl) de cada muestra de plasma enriquecida en una unidad de filtro preacondicionada y se incubó a 37°C durante 30 minutos, seguido inmediatamente de una centrifugación a 2000 g durante 16 minutos. Se analizaron alícuotas de muestras de plasma enriquecidas filtradas y sin filtrar mediante un ELISA para determinar la concentración de oligonucleótido en cada muestra. Se utilizaron tres réplicas por concentración para determinar el porcentaje promedio de oligonucleótido unido y no unido en cada muestra. La concentración promedio de la muestra filtrada con respecto a la concentración de la muestra no filtrada se usa para determinar el porcentaje de oligonucleótido en el plasma que no está unido a proteínas plasmáticas (% no unido). Los valores finales de oligonucleótidos no unidos se corrigen para una unión no específica dividiendo el % no unido por el % de recuperación para cada oligonucleótido. El % final de los valores de oligonucleótidos unidos se determina restando el % final de los valores no unidos de 100. Los resultados se muestran en la Tabla 94 para las dos concentraciones de oligonucleótido analizadas (5 y 150 µg/ml) en cada especie de plasma. Los resultados muestran que los grupos conjugados de GalNAC no tienen un impacto significativo en la unión a proteínas plasmáticas. Además, los oligonucleótidos con enlaces internucleósidos completos de PS y enlaces mixtos de PO/PS se unen a las proteínas plasmáticas, y aquellos con enlaces completos de PS se unen a las proteínas plasmáticas en mayor medida que

aquellos con enlaces mixtos de PO/PS.

Tabla 94

5

10

15

20

Ejemplo 98: Evaluación de los efectos proinflamatorios de los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc en el ensayo de hPMBC

25

[0399] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 96 y se ensayaron para efectos proinflamatorios en un ensayo de hPMBC como se describe en los Ejemplos 23 y 24, (Consulte las Tablas 17, 70, 82 y 95 para las descripciones de los oligonucleótidos). ISIS 353512 es un alto respondedor utilizado como control positivo, y los otros oligonucleótidos se describen en las Tablas 70, 82 y 95, Los resultados mostrados en la Tabla 96 se obtuvieron utilizando sangre de un donante voluntario. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden enlaces internucleósidos PO/PS mixtos produjeron respuestas proinflamatorias significativamente más bajas en comparación con los mismos oligonucleótidos que tienen enlaces PS completos. Además, el grupo conjugado de GalNAc no tuvo un efecto significativo en este ensayo.

30

Tabla 96

35

ISIS NO	E _{max} /CE ₅₀	Grupo GalNAc ₃	Enlaces	CM
353512	3630	n/a	PS	n/a
420915	802	n/a	PS	n/a
682881	1311	GalNAc ₃ -10	PS	A _d
682888	0,26	GalNAc ₃ -10	PO/PS	A _d

40

45

Ejemplo 99: Afinidades de unión de oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc para el receptor de asialoglicoproteína

50

[0400] Las afinidades de unión de los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 97 (ver Tabla 63 para las descripciones de los oligonucleótidos) para el receptor de asialoglicoproteína se ensayaron en un ensayo de unión de receptor competitivo. El ligando competidor, la glicoproteína ácida $\alpha 1$ (AGP), se incubó en un tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 5) con 1 U de neuraminidasa-agarosa durante 16 horas a 37°C, y se confirmó >90% de desialilación mediante un ensayo de ácido siálico. o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se utilizó monoclóruo de yodo para yodar la AGP según el procedimiento de Atsma et al. (ver J Lipid Res. 1991 Jan; 32 (1): 173-81). En este método, se añadió glicoloteína $\alpha 1$ desialilada (de-AGP) a cloruro de yodo 10 mM, Na¹²⁵I y glicina 1 M en 0,25 M NaOH. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se separó la de-AGP marcada con ¹²⁵I de la ¹²⁵I libre concentrando la mezcla dos veces utilizando una columna de centrifugación de 3 KDMWCO. La proteína se ensayó para determinar la eficacia y la pureza del etiquetado en un sistema de HPLC equipado con una columna Agilent SEC-3 (7,8x300 mm) y un contador β -RAM. Los experimentos de competición que utilizaron de-AGP marcado con ¹²⁵I y varios ASO que contenían grupos de GalNAc se realizaron de la siguiente manera. Las células HepG2 humanas (10⁶ células/ml) se colocaron en placas de 6 pocillos en 2 ml de medio de crecimiento apropiado. Se usaron medios MEM suplementados con suero bovino fetal al 10% (FBS), L-glutamina 2 mM y HEPES 10 mM. Las células se incubaron 16-20 horas a 37°C con 5% y 10% de CO₂ respectivamente. Las células se lavaron con medio sin FBS antes del experimento. Las células se incubaron durante 30 min a 37°C con 1 ml de mezcla de competición que contenía medios de crecimiento apropiados con 2% de FBS, 10⁻⁸ M ¹²⁵I marcado con de-AGP y grupo de GalNAc que contenía ASO a concentraciones que oscilaban entre 10⁻¹¹ y 10⁻⁵ M. La unión no específica se determinó en presencia de 10⁻² M de azúcar GalNAc. Las células se lavaron dos veces con medio

55

60

65

sin FBS para eliminar de-AGP marcado con ¹²⁵I no unido y competidor GalNAc ASO. Las células se lisaron utilizando un tampón RLT de Qiagen que contenía 1% de mercaptoetanol. Los lisados se transfirieron a tubos de ensayo de fondo redondo después de un breve ciclo de congelación/descongelación de 10 minutos y se analizaron en un contador γ. La unión no específica se restó antes de dividir los recuentos de proteínas ¹²⁵I por el valor de los recuentos de concentración de GalNAc-ASO más bajos. Las curvas de inhibición se ajustaron de acuerdo con una ecuación de unión de competencia de un solo sitio utilizando un algoritmo de regresión no lineal para calcular las afinidades de unión (K_D).

[0401] Los resultados de la Tabla 97 se obtuvieron de experimentos realizados en cinco días diferentes. Los resultados de los oligonucleótidos marcados con el superíndice "a" son el promedio de los experimentos realizados en dos días diferentes. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado de GalNAc en el extremo 5' se unen al receptor de asialoglicoproteína en células HepG2 humanas con una afinidad de 1,5 a 16 veces mayor que los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado de GalNAc en el extremo 3'.

Tabla 97

Resultados del ensayo de unión al receptor de asialoglicoproteínas			
ISIS NO	Conjugado GalNAc	Oligonucleótido extremo al que se une el conjugado GalNAc	K _D (nM)
661161 ^a	GalNAc ₃ -3	5'	3,7
666881 ^a	GalNAc ₃ -10	5'	7,6
666981	GalNAc ₃ -7	5'	6,0
670061	GalNAc ₃ -13	5'	7,4
655861 ^a	GalNAc ₃ -1	3'	11,6
677841 ^a	GalNAc ₃ -19	3'	60,8

Ejemplo 100: Inhibición antisentido *in vivo* por oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc que apunta a Apo(a) *in vivo*

[0402] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 98a a continuación se ensayaron en un estudio de dosis única para determinar la duración de la acción en ratones.

Tabla 98a

ASO modificado dirigido a APO(a)				
ISIS N°	Secuencias (5' a 3')	Grupo GalNAc ₃	CM	SEQ ID N°
681251	GalNAc ₃ -7 _r r _r ^a T _α G _α ^a C _α T _α ^a C _α ^a C _α G _α T _α T _α G _α G _α T _α G _α ^a C _α T _α T _α G _α T _α T _α ^a C _α	GalNAc ₃ -7 _a	PO	53
681257	GalNAc ₃ -7 _r r _r ^a T _α G _α ^a C _α T _α ^a C _α ^a C _α G _α T _α T _α G _α G _α T _α G _α ^a C _α T _α T _α G _α T _α T _α ^a C _α	GalNAc ₃ -7 _a	PO	53

La estructura de GalNAc₃-7_a se mostró en el Ejemplo 48.

Tratamiento

[0403] Los ratones transgénicos hembras que expresan Apo(a) humano se inyectaron cada uno por vía subcutánea una vez por semana, para un total de 6 dosis, con un oligonucleótido y una dosis enumerados en la Tabla 98b o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 3 animales. Se extrajo sangre el día antes de la dosis para determinar los niveles de referencia de la proteína Apo(a) en plasma y a las 72 horas, 1 semana y 2 semanas después de la primera dosis. Se realizarán extracciones de sangre adicionales a las 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas y 6 semanas después de la primera dosis. Los niveles de proteína Apo(a) en plasma se midieron utilizando un ELISA. Los resultados en la Tabla 98b se presentan como el porcentaje promedio de los niveles plasmáticos de proteína Apo(a) para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia (% BL). Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc mostraron una reducción potente en Apo(a) expresión. Este potente efecto se observó para el oligonucleótido que comprende enlaces internucleósidos de PS completos y el oligonucleótido que comprende enlaces PO y PS mixtos.

Tabla 98b

Niveles de proteína plasmática Apo(a)					
ISIS	Dosificación	Apo(a) a 72 horas (%)	Apo(a) a 1 semana (%)	Apo(a) a 3 semanas (%)	
NO	(mg/kg)	BL	BL	BL	
PBS	n/a	116	104	107	
681251	0,3	97	108	93	
	1,0	85	77	57	
	3,0	54	49	11	
	10,0	23	15	4	

Niveles de proteína plasmática Apo(a)				
ISIS	Dosificación	Apo(a) a 72 horas (%)	Apo(a) a 1 semana (%)	Apo(a) a 3 semanas (%)
NO	(mg/kg)	BL	BL	BL
681257	0,3	114	138	104
	1,0	91	98	54
	3,0	69	40	6
	10,0	30	21	4

Ejemplo 101: Inhibición antisentido por oligonucleótidos que comprenden un grupo de GalNAc unido a través de un resto estable

[0404] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 99 se analizaron para determinar la inhibición de la expresión de APOC-III de ratón in vivo. Los ratones C57B1/6 se inyectaron cada uno por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido listado en la Tabla 99 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Cada ratón tratado con ISIS 440670 recibió una dosis de 2, 6, 20 o 60 mg/kg. Cada ratón tratado con ISIS 680772 o 696847 recibió 0,6, 2, 6 o 20 mg/kg. El grupo conjugado GalNAc de ISIS 696847 está unido a través de un resto estable, un enlace de fosforotioato en lugar de un enlace que contiene fosfodiéster fácilmente escindible. Los animales fueron sacrificados 72 horas después de la dosis. Los niveles de ARNm de APOC-III en el hígado se midieron utilizando PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm de APOC-III se normalizaron a los niveles de ARNm de ciclofilina de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados se presentan en la Tabla 99 como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de APOC-III para cada grupo de tratamiento en relación con el grupo de control de solución salina. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado de GalNAc fueron significativamente más potentes que el oligonucleótido que carece de un grupo conjugado. Además, el oligonucleótido que comprende un grupo conjugado de GalNAc unido al oligonucleótido a través de un resto escindible (ISIS 680772) era incluso más potente que el oligonucleótido que comprende un grupo conjugado de GalNAc unido al oligonucleótido a través de un resto estable (ISIS 696847).

Tabla 99

Oligonucleótidos modificados dirigidos a APOC-III de ratón					
ISIS NO	Secuencias (5' a 3')	CM	Dosificación (mg/kg)	APOC-III mRNA (% PBS)	SEQ ID NO
440670	${}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{10}\text{G}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{T}_{15}\text{T}_{15}\text{T}_{15}\text{A}_{15}\text{T}_{15}\text{A}_{15}$ $\text{G}_{15}\text{G}_{15}\text{G}_{15}\text{A}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{10}\text{G}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{15}$	n/a	2	92	47
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	$\text{GalNAc}_{3-7a}{}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{10}\text{G}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{T}_{15}\text{T}_{15}\text{T}_{15}\text{A}_{15}$ $\text{T}_{15}\text{T}_{15}\text{A}_{15}\text{G}_{15}\text{G}_{15}\text{G}_{15}\text{A}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{10}\text{G}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{15}$	PO	0,6	79	47
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	$\text{GalNAc}_{3-7ae}{}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{10}\text{G}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{T}_{15}\text{T}_{15}\text{T}_{15}\text{A}_{15}$ $\text{T}_{15}\text{A}_{15}\text{G}_{15}\text{G}_{15}\text{G}_{15}\text{A}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{10}\text{G}_{15}{}^{18}\text{C}_{15}\text{A}_{15}$	n/a (PS)	0,6	83	47
			2	73	
			6	40	
			20	28	

La estructura de GalNAc_{3-7a} se mostró en el Ejemplo 48.

Ejemplo 108: Inhibición antisentido in vivo por oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc que apunta a Apo(a) in vivo

[0405] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 105 a continuación se ensayaron en un estudio de dosis única en ratones.

Tabla 105

ASO modificados dirigidos a Apo(a)

ISIS N°	Secuencias (5' a 3')	Grupo de GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
494372	T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅	n/a	n/a	53
681251	GalNAc₃-7_α -T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅	GalNAc ₃ -7a	PO	53
681255	GalNAc₃-3_α -T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅	GalNAc ₃ -3a	PO	53
681256	GalNAc₃-10_α -T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅	GalNAc ₃ -10a	PO	53
681257	GalNAc₃-7_α -T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅	GalNAc ₃ -7a	PO	53
681258	GalNAc₃-13_α -T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅	GalNAc ₃ -13a	PO	53
681260	T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ ^m C ₅ ^m C ₅ G ₅ T ₅ T ₅ G ₅ G ₅ T ₅ G ₅ ^m C ₅ T ₅ T ₅ G ₅ T ₅ T ₅ ^m C ₅ A₅-GalNAc₃-19	GalNAc ₃ -19a	A _d	53

La estructura de GalNAc₃-7_a se mostró en el Ejemplo 48.

Tratamiento

[0406] Los ratones transgénicos machos que expresan Apo(a) humano se inyectaron cada uno por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido y la dosis enumerados en la Tabla 106 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. La sangre se extrajo el día antes de la dosis para determinar los niveles de referencia de la proteína Apo(a) en plasma y en la primera semana después de la primera dosis. Se realizarán extracciones de sangre adicionales semanalmente durante aproximadamente 8 semanas. Los niveles de proteína Apo(a) en plasma se midieron utilizando un ELISA. Los resultados en la Tabla 106 se presentan como el porcentaje promedio de los niveles plasmáticos de proteína Apo(a) para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles iniciales (% BL). Los resultados muestran que los oligonucleótidos antisentido reducen la expresión de la proteína Apo(a). Además, los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc mostraron una reducción aún más potente en la expresión de Apo(a) que el oligonucleótido que no comprende un grupo conjugado.

Tabla 106

Niveles de proteína plasmática Apo(a)		
ISIS NO	Dosificación (mg/kg)	Apo(a) a 1 semana (% BL)
PBS	n/a	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

Ejemplo 113: Oligonucleótidos modificados que comprenden un grupo conjugado de GalNAc que se dirige al virus de las hepatitis B (VHB)

[0407] Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 108 a continuación se diseñaron para dirigirse al VHB. En ciertas realizaciones, el resto escindible es un enlace fosfodiéster.

Tabla 108

	Secuencias (5' a 3')	SEQ ID NO
10	GalNAc₃-3- G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
15	GalNAc₃-3- G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
	GalNAc₃-7- G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
20	GalNAc₃-7- G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
	GalNAc₃-10- G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
25	GalNAc₃-10- G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
	GalNAc₃-13- G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
30	GalNAc₃-13- G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
	G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e - GalNAc₃-19	3
35	G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e - GalNAc₃-19	3
	GalNAc₃-24- G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
40	GalNAc₃-24- G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
	GalNAc₃-25- G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
45	GalNAc₃-25- G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3

50 LISTADO DE SECUENCIAS

[0408]

- 55 <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE HBV Y TTR
- <130> BIOL0248WO
- 60 <150> 61/818,442
- <151> 2013-05-01
- <150> 61/823,826
- 65 <151> 2013-05-15

ES 2 730 015 T3

<150> 61/843,887
<151> 2013-07-08

<150> 61/871,673
<151> 2013-08-29

<150> 61/880,790
<151> 2013-09-20

<150> 61/976,991
<151> 2014-04-08

<150> 61/986,867
<151> 2014-04-30

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 3182
<212> ADN
<213> Hepatitis B virus

<400> 1

30 aattccacaa cctttcacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttcctt 60
gctggtgget ccagttcagg agcagtaaac cctggtccga ctactgcctc tcccttatcg 120
tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc 180
ctaggacccc ttctcgtggt acaggcgggg tttttcttgt tgacaagaat cctcacaata 240
35 ccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctcaattttc tagggggaac taccgtgtgt 300
cttggccaaa attcgcagtc cccaacctcc aatcaactcac caacctcctg tcctccaact 360
40 tgtcctgggt atcgcctggat gtgtctgctg cgttttatca tcttcctctt catcctgctg 420
ctatgcctca tcttcttgtt ggttcttctg gactatcaag gtatgttgcc cgtttgtcct 480
ctaattccag gatcctcaac caccagcacg ggaccatgcc gaacctgcat gactactgct 540
45 caaggaacct ctatgtatcc ctctggttgc tgtaccaaac cttcggacgg aaattgcacc 600
tgtattcca tcccatcatc ctgggctttc ggaaaattcc tatgggagtg ggcctcagcc 660
50 cgtttctcct ggctcagttt actagtgcc tttgttcagt ggttcgtagg gctttcccc 720

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggattggg ggccaagtct gtacagcatc 780
 ttgagtcocct ttttacogct gttaccaatt ttcttttgc tttgggtata catttaaacc 840
 ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc tgaatttat gggttatgtc attggaagtt 900
 atgggtcctt gccacaagaa cacatcatac aaaaaatcaa agaatgtttt agaaaacttc 960
 ctattaacag gcctattgat tggaaaagtat gtcaacgaat tgtgggtcctt ttgggttttg 1020
 ctgccccatt tacacaatgt ggttatcctg cgtaaatgcc cttgtatgca tgtattcaat 1080
 ctaagcaggc tttcactttc tcgccaaactt acaaggcctt tctgtgtaa caatacctga 1140
 accttaacc cgttgcccgg caacggccag gtctgtgcca agtgtttgct gacgcaacc 1200
 ccactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgcgtgcg tggaaccttt tcggctcctc 1260
 tgccgatcca tactgcgaa ctctagccg cttgttttgc tcgcagcagg tctggagcaa 1320
 acattatcgg gactgataac tctgttgc tctccgcaa atatacatog tatccatggc 1380
 tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgtc ctttgtttac gtcccgtcgg 1440
 cgctgaatcc tgcgagcagc ccttctcggg gtgcgttggg actctctcgt cccttctcc 1500
 gtctgccgtt ccgaccgacc acggggcgca cctctcttta cgcgactcc cgtctgtgc 1560
 cttctcatct gccggaccgt gtgcaactog cttcacctct gcacgtcgca tggagaccac 1620
 cgtgaacgcc caccgaatgt tgcccaaggt cttacataag aggactcttg gactctctgc 1680
 aatgtcaacg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaag actgggagga 1740
 gttgggggag gagattagat taaagtcctt tgtactagga ggctgtaggc ataaattggt 1800
 ctgogcacca gcaccatgca actttttcac ctctgcctaa tcctctcttg ttcattctct 1860
 actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggctttggg gcatggacat cgacccttat 1920
 aaagaatttg gagctactgt ggagttactc tcgtttttgc cttctgactt ctttcttca 1980
 gtacgagatc ttctagatc cgcctcagct ctgtatcggg aagccttaga gtctcctgag 2040
 cattgttcac ctcaccatac tgcactcagg caagcaattc tttgctgggg ggaactaatg 2100
 actctagcta cctgggtggg tgtaatttg gaagatccag catctagaga cctagtagtc 2160
 agttatgtca acactaatat gggcctaaag ttcaggcaac tcttgtggtt tcacatttct 2220
 tgtctcactt ttggaagaga aaccgttata gagtatttg tgtctttcgg agtgtggatt 2280
 cgcactcctc cagcttatag accaccaaact gccctatcc tatcaacact tccggaaact 2340
 actgttgta gacgacgagg caggtccctt agaagaagaa ctccctcggc tcgcagacga 2400
 aggtctcaat cgcgcgtgag cagaagatct caatctcggg aacctcaatg ttagtattcc 2460
 ttggactcat aaggtgggga actttactgg tctttattct totactgtac ctgtctttaa 2520
 tctcattgg aaaacaccat cttttcctaa tatacattta caccaagaca ttatcaaaaa 2580
 atgtgaacag tttgtaggcc cacttacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat 2640

ES 2 730 015 T3

5
 gcctgctagg ttttatccaa aggttaccaa atattacca ttggataagg gtattaaacc 2700
 ttattatcca gaacatctag ttaatcatta cttccaaact agacactatt tacacactct 2760
 10 atggaaggcg ggtatattat ataagagaga aacaacacat agcgcctcat tttgtgggtc 2820
 accatattct tgggaacaag atctacagca tggggcagaa tctttccacc agcaatcctc 2880
 15 tgggattcct tcccgaccac cagttggatc cagccttcag agcaaacaca gcaaatccag 2940
 attgggactt caatcccaac aaggacacct ggccagacgc caacaaggta ggagctggag 3000
 cattcgggct gggtttcacc ccaccgcacg gaggcctttt ggggtggagc cctcaggctc 3060
 20 agggcatact acaaactttg ccagcaaatc cgcctcctgc ctccaccaat cgcagacag 3120
 gaaggcagcc taccocgctg tctccacctt tgagaaacac tcatcctcag gccatgcagt 3180
 25 gg 3182

<210> 2
 <211> 938
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 2
 35 gttgactaag tcaataatca gaatcagcag gtttgcagtc agattggcag ggataagcag 60
 cctagctcag gagaagtgag tataaaagcc ccaggctggg agcagccatc acagaagtcc 120
 actcattcct ggcaggatgg cttctcatcg tctgctcctc ctctgccttg ctggactggt 180
 40 atttgtgtct gaggtggcc ctacgggcac cggatgaatcc aagtgtcctc tgatggtcaa 240
 agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg tgttcagaaa 300
 ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt ctggagagct 360
 45 gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata taciaagtgg aaatagacac 420
 caaatcttac tggaaaggcac ttggcatctc ccattccat gagcatgcag aggtggtatt 480
 cacagccaac gactccggcc ccgcgcgcta caccattgcc gccctgctga gccctactc 540
 50 ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc ctccagtgga 600
 cctgaaggac gagggatggg atttcatgta accaagagta ttccattttt actaaagcag 660
 55 tgttttcacc tcatatgcta tgttagaagt ccaggcagag acaataaaac attcctgtga 720
 aaggcacttt tcattccact ttaacttgat tttttaaatt cccttattgt cccttccaaa 780
 aaaaagagaa tcaaaatfff acaaagaatc aaaggaattc tagaaagtat ctgggcagaa 840
 60 cgctaggaga gatccaaatt tccattgtct tgcaagcaaa gcacgtatta aatatgatct 900
 gcagccatta aaaagacaca ttctgtaaaa aaaaaaaa 938

65

5 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 3
 gcagaggtga agcgaagtgc 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 4
 ccaatttatg cctacagcct 20

<210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 5
 ggcatagcag caggatg 17

35 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 6
 aggagttccg cagtatggat 20

45 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 7
 gtgaagcgaa gtgcacacgg 20

55 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 8

gtgcagaggt gaagcgaagt 20

5 <210> 9
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 9
agtggaagcg aagtgc 16

15 <210> 10
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 10
tccgcagtat ggatcg 16

25 <210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 11
aatattatgcc tacagcct 18

35 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 12
tcttggttac atgaaatccc 20

45 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 13
cttggttaca tgaaatccca 20

60 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
 ggaataactct tggttacatg 20

 5 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 15
 tggaataactc ttggttacat 20

 15 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 16
 ttttattgtc tctgcctgga 20
 25
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 17
 gaatgttta ttgtctctgc 20
 35
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 45 <400> 18
 aggaatggtt tattgtctct 20

 <210> 19
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55
 <400> 19
 acaggaatgt ttattgtct 20

 <210> 20
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 20
 agcttctgt ccagcttat 20

5 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 21
 agcttctgt ccagcttat a 21

15 <210> 22
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 22
 tcagtcatga cttc 14

25 <210> 23
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 23
 tcagtcatga ctca 15

35 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 24
 gctgattaga gagagtccc 20

45 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 25
 tcccattca ggagacctgg 20

55 <210> 26
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 26
 atcagtcatg acttc 15
 5
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 27
 cggtgcaagg cttaggaatt 20
 15
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 28
 gcttcagtca tgacttcctt 20
 <210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35
 <400> 29
 gcttcagtca tgacttcctt a 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45
 <400> 30
 agcttcagtc atgacttcct t 21
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 31
 tggtaatcca ctttcagagg 20
 60
 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5

<400> 32
 tggtaatcca ctttcagagg a 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15

<400> 33
 tgcttcagtc atgacttct t 21

<210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25

<400> 34
 cactgatttt tgcccaggat 20

<210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35

<400> 35
 cactgatttt tgcccaggat a 21

40

<210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 36
 aagcttcttg tccagctta t 21

50

<210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 37
 acccaattca gaaggaagga 20

60

<210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 38
 acccaattca gaaggaagga a 21
 <210> 39
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 39
 aaccaattc agaaggaagg a 21
 <210> 40
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 40
 atggaatcc actttcagag g 21
 <210> 41
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 41
 tcttggtac atgaaatccc 20
 <210> 42
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <400> 42
 tcttggtac atgaaatccc a 21
 <210> 43
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 43
 attcacttc ataatgctgg 20
 <210> 44
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 65 <400> 43
 attcacttc ataatgctgg 20
 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5
 <400> 44
 attcactttc ataatgctgg a 21
 <210> 45
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 45
 atcttggtta catgaaatcc c 21
 20 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 46
 30 atgcatggtg atgcttctga 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 47
 40 cagctttatt agggacagca 20
 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 48
 cagctttatt agggacagca a 21
 <210> 49
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60 <400> 49
 acagctttat tagggacagc a 21
 <210> 50
 65 <211> 16

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 50
 ttcagtcatg acttcc 16

 10 <210> 51
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> bases en estas posiciones son ARN

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (15)..(18)
 <223> bases en estas posiciones son ARN

 <400> 51
 30 gcuucagtca tgactucc 18

 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 52
 40 tgctccgttg gtgcttgttc a 21

 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 50 <400> 53
 tgctccgttg gtgcttgttc 20

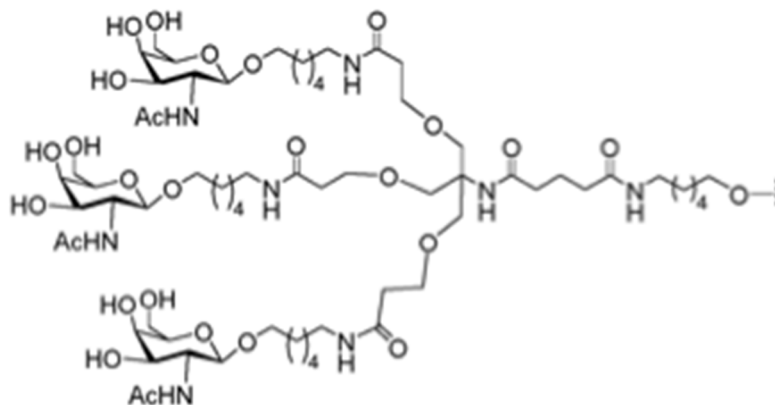
 55

 60

 65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, en donde el oligonucleótido modificado consta de 12 a 30 nucleósidos unidos y tiene una secuencia de nucleobases al menos 85% complementaria a la SEQ ID NO: 1 que codifica el virus de la hepatitis B (VHB), y en donde el grupo conjugado comprende:



2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido modificado comprende al menos un azúcar modificado, opcionalmente en el que

a. al menos un azúcar modificado:

- i. es un azúcar bicíclico; y/o
- ii. comprende un 2'-O-metoxietilo, un etil restringido o un puente 4'-(CH₂)_nO-2', en donde n es 1 o 2;

b. al menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada, opcionalmente en donde la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina;

c. el grupo conjugado está vinculado al oligonucleótido modificado en:

- i. el extremo 5' del oligonucleótido modificado; o
- ii. el extremo 3' del oligonucleótido modificado;

d. cada enlace internucleósido del oligonucleótido modificado se selecciona de un enlace internucleósido fosfodiéster y un enlace internucleósido fosforotioato, opcionalmente en el que el oligonucleótido modificado comprende:

- i. al menos 5 enlaces internucleosídicos fosfodiéster; o
- ii. al menos seis enlaces internucleosídicos de fosforotioato;

e. el oligonucleótido modificado es:

- i. monocatenario o
- ii. doble cadena;

f. el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento hueco que consiste en desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala 5' que consta de nucleósidos unidos;
 un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos;
 en donde el segmento de la brecha se coloca entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo o azúcar etílico restringido, en donde cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato; y en donde cada citosina es una 5-metilcitosina;

g. la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es:

- i. al menos 90% complementario a la SEQ ID NO: 1;
- ii. al menos 95% complementario a la SEQ ID NO: 1; o

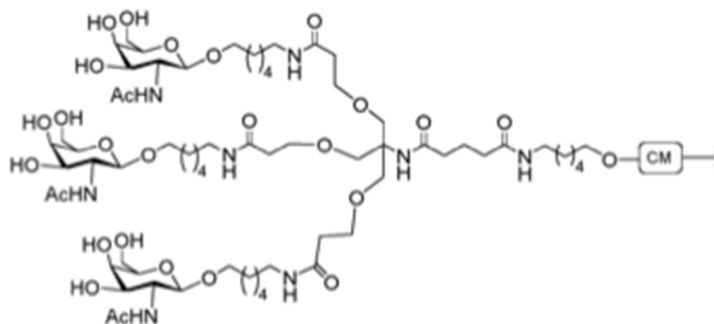
iii. 100% complementario a la SEQ ID NO: 1;

h. el oligonucleótido modificado.

- 5 i. comprende la secuencia de nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-11; o
 ii. consiste en nucleósidos enlazados que consisten en la secuencia de nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-11;

i. el grupo conjugado comprende:

10

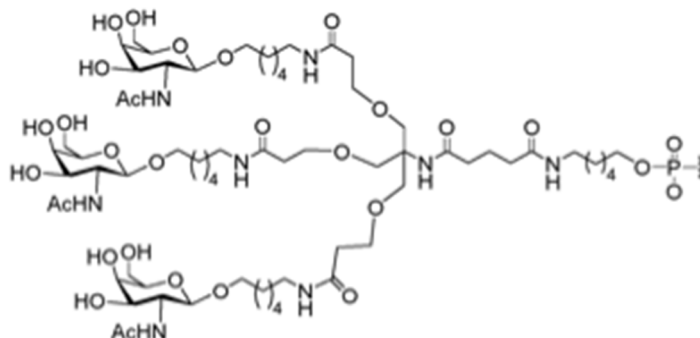


15

20

- 25 en el que el resto escindible (CM) es un enlace o grupo que puede dividirse en condiciones fisiológicas; y/o
 j. el grupo conjugado comprende:

30



35

40

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la SEQ ID NO: 3, y en el que el oligonucleótido modificado comprende:

45

- un segmento hueco que consta de diez desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala 5' que consta de cinco nucleósidos unidos;
 un segmento del ala 3' que consta de cinco nucleósidos unidos;
 en donde el segmento de la brecha se coloca entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, y en donde cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

50

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la SEQ ID NO: 4, y en el que el oligonucleótido modificado comprende:

55

- un segmento hueco que consta de diez desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala 5' que consta de cinco nucleósidos unidos;
 un segmento del ala 3' que consta de cinco nucleósidos unidos;
 en donde el segmento de la brecha se coloca entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, y en el que cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

60

65

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos

que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 6 u 8, y en el que el oligonucleótido modificado comprende:

5 un segmento hueco que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala 5' que consiste en 6 nucleósidos unidos; y
 un segmento del ala 3' que consta de 4 nucleósidos unidos;
 en donde el segmento de la brecha se coloca entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en donde
 cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, y en donde cada residuo de
 10 citosina es una 5-metilcitosina.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 17 nucleósidos unidos
 que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la SEQ ID NO: 5, y en el que el oligonucleótido
 modificado comprende:

15 un segmento hueco que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
 un segmento de ala 5' que consta de 3 nucleósidos unidos; y
 un segmento del ala 3' que consta de 4 nucleósidos unidos;
 en donde el segmento de la brecha se coloca entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en donde
 cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, y en donde cada residuo de
 20 citosina es una 5-metilcitosina.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 16 nucleósidos unidos
 que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la SEQ ID NO: 10, y en el que el oligonucleótido
 modificado comprende:

25 un segmento hueco que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala 5' que consiste en 2 nucleósidos unidos; y
 un segmento del ala 3' que consta de 4 nucleósidos unidos;
 en el que el segmento de separación se coloca entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3'; en donde los
 30 2 nucleósidos enlazados del segmento del ala 5' comprenden un azúcar 2'-O-metoxietilo y un azúcar etílico
 restringido en la dirección 5' a 3'; en donde los 4 nucleósidos enlazados del segmento del ala 3' comprenden un
 azúcar etílico restringido, un azúcar 2'-O-metoxietilo, un azúcar etílico restringido y un azúcar 2'-O-metoxietilo en
 la dirección 5' a 3'; y en el que cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

35 8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 16 nucleósidos unidos
 que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la SEQ ID NO: 9, y en el que el oligonucleótido
 modificado comprende:

40 un segmento hueco que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
 un segmento de ala 5' que consta de 3 nucleósidos unidos; y
 un segmento del ala 3' que consta de 3 nucleósidos unidos;
 en el que el segmento de separación se coloca entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3'; en donde los
 45 3 nucleósidos enlazados del segmento del ala 5' comprenden un azúcar 2'-O-metoxietilo, un azúcar etílico
 restringido y un azúcar etílico restringido en la dirección 5' a 3'; en donde los 3 nucleósidos enlazados del
 segmento del ala 3' comprenden un azúcar etílico restringido, un azúcar etílico restringido y un azúcar 2'-O-
 metoxietilo en la dirección 5' a 3'; y en el que cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

9. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido modificado consiste en 18 nucleósidos unidos
 que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la SEQ ID NO: 11, y en el que el oligonucleótido
 modificado comprende:

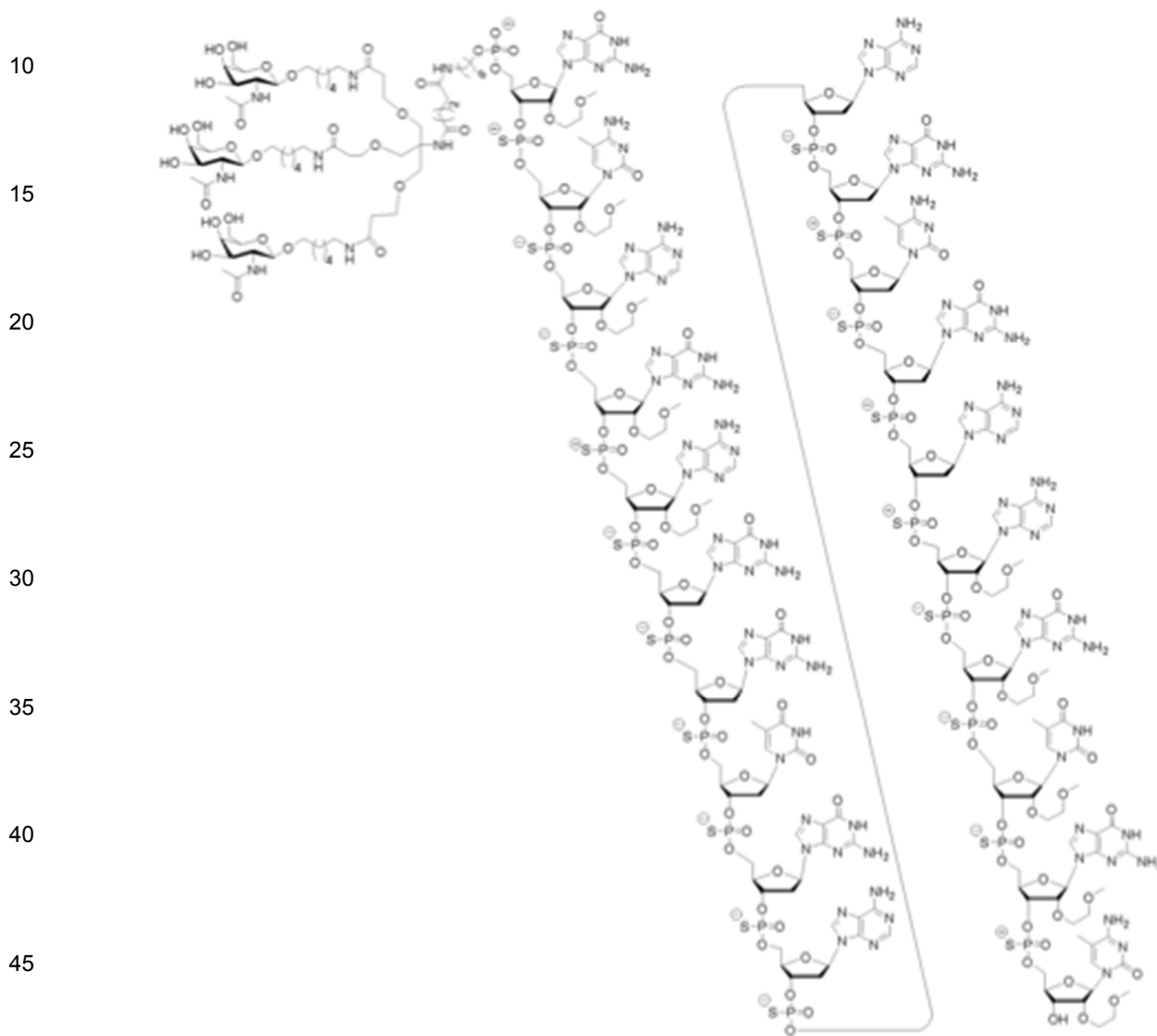
50 un segmento de brecha que consiste en 8 desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala 5' que consta de 5 nucleósidos unidos; y
 un segmento del ala 3' que consta de 5 nucleósidos unidos;
 55 en el que el segmento de separación se coloca entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3'; en donde los
 5 nucleósidos enlazados del segmento del ala 5' comprenden un azúcar etílico restringido, un azúcar desoxi, un
 azúcar etílico restringido, un azúcar desoxi y un azúcar etílico restringido en la dirección 5' a 3'; en donde cada
 uno de los 5 nucleósidos enlazados del segmento del ala 3' comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en el que
 cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

60 10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en el que

- 65 a. cada enlace internucleósido del oligonucleótido modificado es un enlace fosforotioato;
 b. cada enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado se selecciona de un enlace internucleósido
 fosfodiéster y un enlace internucleósido fosforotioato;
 c. el oligonucleótido modificado comprende al menos 2 enlaces internucleosídicos de fosfodiéster;

d. el oligonucleótido modificado comprende menos de 14 enlaces fosforotioato, opcionalmente en el que el oligonucleótido modificado comprende menos de 13 enlaces fosforotioato; o
 e. El oligonucleótido modificado es monocatenario.

5 **11.** El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto consiste en la fórmula:



50 , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

55 **13.** El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o la composición de la reivindicación 12, para uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección relacionada con el VHB, opcionalmente en el que la enfermedad, trastorno o afección es ictericia, inflamación del hígado, fibrosis hepática., inflamación, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, cáncer de hígado, enfermedad inflamatoria hepatocelular difusa, síndrome hemofagocítico, hepatitis sérica, viremia por VHB o trasplante relacionado con enfermedad hepática.

14. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o la composición de la reivindicación 12, para uso en la reducción de los niveles de antígeno de HBV en un sujeto infectado con HBV, opcionalmente en el que el antígeno de HBV es HBsAG o HBeAG.

65