

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 102**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/87** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2015 PCT/EP2015/050685**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2015 E 15700464 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3094731**

54 Título: **Moléculas de ácido nucleico modificadas con sacárido**

30 Prioridad:

**15.01.2014 EP 14151255**

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

**13.02.2020**

73 Titular/es:

**BASECLICK GMBH (100.0%)  
Floriansbogen 2-4  
82061 Neuried, DE**

72 Inventor/es:

**CARELL, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

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

ES 2 742 102 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

Moléculas de ácido nucleico modificadas con sacárido

5 La presente invención se refiere a la transfección *in vitro* de células usando un conjugado que comprende al menos un resto de monosacárido y al menos un componente nucleosídico seleccionado entre ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos. El resto de monosacárido está conectado covalentemente a una nucleobase del componente nucleosídico a través de un enlazador que comprende un grupo cíclico formado mediante una reacción clic. Este conjugado es adecuado para la transfección de células procariotas y eucariotas que tienen proteínas transportadoras de azúcar en la membrana celular, tales como células vegetales o células de mamíferos, incluyendo células humanas con alta eficacia. Por lo tanto, se proporciona un nuevo vehículo de administración de moléculas terapéuticas que incluye transcripciones, ARNm, moléculas no codificantes, moléculas de ARNip, moléculas de miARN, antagomiRs o precursores de dichas moléculas, así como los nucleósidos o nucleótidos terapéuticos. Además, se proporciona una estrategia conveniente para desarrollar nuevas líneas de plantas que presenten determinados rasgos.

15 La interferencia de ARN es una poderosa herramienta que utiliza cadenas dobles de ARN cortas para reprimir la formación de una determinada proteína en una célula (1-3). En la naturaleza, las moléculas de ARN silenciador se producen a partir de transcripciones mayores que son cortadas por el complejo Dicer (4). Para las aplicaciones biotecnológicas, sin embargo, las moléculas de ARN (ARNip) se preparan químicamente y se administran. La idea de usar ARNip como agentes terapéuticos (5) se persiguió intensamente en la última década, pero el obstáculo principal, la baja captación celular de los dúplex de ARN, no se pudo superar (6). Actualmente, los sistemas de administración de ARN tan divergentes como las nanopartículas (7,8), los liposomas (9,10) o los polímeros policatiónicos (11) están sometidos a una investigación intensiva. A pesar del progreso sustancial en el campo, sin embargo, la toxicidad a menudo alta (12-14) y la baja especificidad celular representan problemas que no se resuelven.

25 Más recientemente, la endocitosis mediada por receptores ha evolucionado como una estrategia de administración alternativa (16-25) que permite dirigir el ARNip a tipos de células especiales. El método requiere unir el ARNip a un ligando que se une a un receptor específico del tipo de célula. Esto inicia un proceso de internalización que conduce a la captación del conjugado de ARN-ligando. Actualmente, la estrategia se implementa con mayor éxito con ARN modificado con colesterol (24).

35 El documento PCT/EP2013/064610, describe un conjugado en el que un resto de ácido graso poliinsaturado, tal como un resto de ácido araquidónico, se une covalentemente a un componente nucleosídico. Estos conjugados son particularmente útiles para entrar en contacto con células en las que esté presente un receptor de cannabinoides. En particular, las células neuronales y las células inmunitarias se pueden transfectar usando este conjugado. Sin embargo, todavía existe la necesidad de una estrategia conveniente para transfectar células sensibles y, en particular, aquellas células que, hasta ahora, han sido difíciles de transfectar.

40 Otro artículo de la técnica anterior es *Mol Divers* 15, 2011, 751-7, que desvela la conjugación de glucosa o galactosa a un ARN usando química de fosoramidita, y el uso de dichos conjugados para transfectar células.

45 En la presente invención, se descubrió que las proteínas transportadoras de azúcar presentes en la membrana celular de las células tanto procariotas como eucariotas pueden ser dirigidas eficazmente con oligonucleótidos modificados con monosacáridos. Se puede usar con éxito una estrategia mediada por el receptor correspondiente para transfectar una amplia variedad de células sensibles.

50 Un primer aspecto de la presente invención es el uso *in vitro* de un conjugado que comprende al menos un resto de monosacárido y al menos un componente nucleosídico en la transfección de células que tienen proteínas transportadoras de azúcar en la membrana celular, en el que, en el conjugado, se une covalentemente al menos un resto de monosacárido a al menos un componente nucleosídico a través de un enlazador que comprende un grupo cíclico formado mediante una reacción clic, en particular, un grupo 1,2,3-triazol, formado mediante una reacción clic entre un alquino y una azida, o un grupo formado mediante una reacción clic entre un norborneno y una imina de nitrilo, un óxido de nitrilo o una tetrazina, en el que el componente nucleosídico está conectado al resto de monosacárido a través de una nucleobase, y en el que el componente nucleosídico se selecciona entre ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos.

El término "conjugado" también abarca sales, en particular, sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de adición con ácidos o bases inorgánicos u orgánicos como las conocidas en la técnica.

60 De acuerdo con una invención, el conjugado comprende un resto de monosacárido y está unido covalentemente al menos a un componente nucleosídico.

65 El conjugado para su uso en la presente invención comprende al menos un resto de monosacárido, en particular, de 1 a 10, más particularmente, de 1 a 5 restos de monosacáridos. Aún más particularmente, el conjugado comprende 1 o 2 restos de monosacáridos. Muy particularmente, el conjugado comprende 1 resto de monosacárido. Si el conjugado comprende más de un resto de monosacárido, los restos de monosacáridos pueden ser idénticos o diferentes.

El componente nucleosídico unido al resto de monosacárido se selecciona entre ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos.

- 5 En una realización particular adicional, el componente nucleosídico unido al resto de monosacárido es una molécula de ácido nucleico, más particularmente, una molécula de ARN.

- 10 El conjugado comprende al menos un componente nucleosídico, en particular, de 1 a 25, más particularmente, de 2 a 20 o de 2 a 10, e incluso más particularmente, de 2 a 8, es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 componentes nucleosídicos. Si el conjugado comprende más de un componente nucleosídico, los componentes nucleosídicos pueden ser idénticos o diferentes.

En una realización, el conjugado puede comprender

- 15 (i) un resto de monosacárido y un componente nucleosídico, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico;  
 (ii) múltiples grupos de monosacáridos y un componente nucleosídico, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico;  
 (iii) un resto de monosacárido y múltiples componentes nucleosídicos, por ejemplo, múltiples moléculas de ácido nucleico; o  
 20 (iv) múltiples restos de monosacáridos y múltiples componentes nucleosídicos, por ejemplo, múltiples moléculas de ácido nucleico.

- 25 En una realización particular adicional, el conjugado comprende 1 resto de monosacárido y de 2 a 20, en particular, de 2 a 8, es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 componentes nucleosídicos.

En una realización, el conjugado puede tener una estructura lineal. Por lo tanto, los componentes nucleosídicos se pueden conectar en una cadena lineal, en la que un resto de monosacárido puede estar presente dentro de la cadena, en un extremo de la cadena o en ambos extremos de la cadena.

- 30 En otra realización, el conjugado tiene una estructura ramificada, en la que los componentes nucleosídicos están unidos a un resto de monosacárido a través de un enlazador ramificado, por ejemplo, un enlazador dendrímérico.

- 35 El resto de monosacárido está unido covalentemente al al menos un componente nucleosídico, en el que el resto de monosacárido se une al menos a un componente nucleosídico a través de un enlazador que comprende un grupo cíclico formado mediante una reacción clic. El enlazador puede ser un enlazador lineal o ramificado y, en general, tiene una longitud de cadena de 2 a 50 átomos, incluyendo átomos de carbono y, en particular, heteroátomos tales como S, N y/o átomos de oxígeno.

- 40 Por ejemplo, el enlazador puede ser un enlazador lineal, por ejemplo, un enlazador que comprenda al menos uno, por ejemplo, de 1 a 10, en particular, de 2 a 5 y, más particularmente, 3 grupos de óxido de alquileo  $C_1-C_3$ , en particular, grupos de óxido de etileno.

Como alternativa, el enlazador puede ser ramificado, por ejemplo, enlazador dendrímérico.

- 45 El resto de monosacárido se puede conectar al al menos un componente nucleosídico a través de técnicas de enlace conocidas que implican una reacción clic, por ejemplo, entre una azida y un grupo alquino, entre un alqueno restringido, por ejemplo, un norborneno y una imina de nitrilo, un óxido de nitrilo o una tetrazina, dando lugar así a un grupo cíclico formado mediante la reacción clic, en particular, un grupo 1,2,3-triazol.

- 50 En una realización particular, el conjugado para su uso de acuerdo con la presente invención está representado por la fórmula general (Ia) o (Ib)

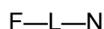


- 55  $F_n-(L_m-N)_r-L_m-F_n \quad (Ib)$

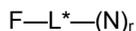
en las que

- F es un resto de monosacárido,  
 L es un enlazador, que comprende un grupo cíclico formado mediante una reacción clic  
 N es un componente nucleosídico seleccionado entre ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos,  
 n es un número entero de 1 a 10, preferentemente, de 1 a 5, más preferentemente 1,  
 m es 1,  
 r es un número entero de 1 a 25, preferentemente, de 2 a 20 y, más preferentemente, de 2 a 8.

- 60 En esta realización, el conjugado puede estar representado por estructuras tales como:



5 en las que F, L, N y r son como se han definido anteriormente,



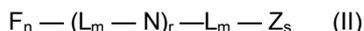
10 en la que L\* es un enlazador ramificado, y F, N y r son como se han definido anteriormente,



15 en la que F, L, N y r son como se han definido anteriormente.

En otra realización, el conjugado puede comprender un ligando receptor adicional, unido covalentemente al al menos un componente nucleosídico. El ligando receptor adicional es un compuesto diferente de un resto de monosacárido tal como el folato, colesterol, una hormona o un resto de ácido graso poliinsaturado, en particular, un resto de ácido araquidónico tal como anandamida.

20 En esta realización, los conjugados pueden estar representados por una estructura que tiene la fórmula general (II)



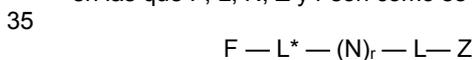
25 en la que

- F es un resto de monosacárido,
- L es un enlazador, que comprende un grupo cíclico formado mediante una reacción clic
- n es un número entero de 1 a 10, preferentemente, de 1 a 5, más preferentemente 1,
- m es 1,
- N es un componente nucleosídico seleccionado entre ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos,
- r es un número entero de 1 a 25, preferentemente, de 2 a 20 y, más preferentemente, de 2 a 8,
- Z es un ligando receptor adicional, y
- s preferentemente 1.

En esta realización, el conjugado puede estar representado por estructuras tales como:



en las que F, L, N, Z y r son como se han definido anteriormente,



L\* es un enlazador ramificado, y F, L, N, Z y r son como se han definido anteriormente.

40 El conjugado para su uso en la presente invención comprende al menos un componente nucleosídico seleccionado entre ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos.

La expresión "ácido nucleico" engloba moléculas de ácido nucleico monocatenario y bicatenario, por ejemplo, moléculas de ADN o moléculas de ARN y análogos de las mismas. Un análogo de un ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un elemento estructural modificado como se describe a continuación.

En una realización, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN que puede comprender al menos un elemento estructural modificado. La expresión "molécula de ADN" engloba moléculas de ADN monocatenario o bicatenario. En las moléculas de ADN bicatenario, las cadenas individuales pueden estar presentes en moléculas separadas o estar conectadas covalentemente a través de un bucle monocatenario o a través de un enlazador heterólogo.

La expresión "molécula de ADN" engloba moléculas que consisten en elementos estructurales de ADN natural, es decir, elementos estructurales de 2'-desoxirribonucleótidos y moléculas que comprenden al menos un elemento estructural modificado.

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN, que puede comprender al menos un elemento estructural modificado. La expresión "molécula de ARN" engloba moléculas de ARN monocatenario o bicatenario, en la que las moléculas de ARN bicatenario pueden tener al menos un saliente, por ejemplo, al menos un saliente de 3'. En las moléculas de ARN bicatenario, las cadenas individuales pueden estar presentes como moléculas separadas o estar conectadas covalentemente a través de un bucle monocatenario o a través de un enlazador heterólogo.

La expresión "molécula de ARN" engloba moléculas que consisten en elementos estructurales de ARN natural, es decir, elementos estructurales de 2'-ribonucleótidos, y moléculas que comprenden al menos un elemento estructural modificado.

Los elementos estructurales modificados se pueden seleccionar entre elementos estructurales modificados con azúcar, estructura principal y/o nucleobase. Los desoxirribonucleótidos modificados con azúcares comprenden un grupo de azúcar diferente de la desoxirribosa, por ejemplo, un grupo de desoxirribosa modificado, en el que el grupo 2'-H se reemplaza por un grupo seleccionado entre OH, R, OR, halo, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub> o CN, en los que R es alquilo o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o alqueno o alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, y halo es F, Cl, Br, I. Los ejemplos específicos de modificaciones de 2'-H son 2'-F y 2'-O metilo. Los ribonucleótidos modificados con azúcar comprenden un grupo de azúcar diferente de la ribosa, por ejemplo, un grupo ribosa modificado, en el que el grupo 2'-OH se reemplaza por un grupo seleccionado entre H, R, OR, halo, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub> o CN, en los que R es alquilo o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o alqueno o alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, y halo es F, Cl, Br, I. Los ejemplos específicos de modificaciones de 2'-OH son 2'-F y 2'-O metilo. En un elemento estructural modificado con estructura principal, el grupo fosfoéster que conecta los elementos estructurales adyacentes puede ser reemplazado por un grupo de conexión modificado, por ejemplo, un grupo fosforotioato. En los elementos estructurales modificados con nucleobase, puede haber una nucleobase no natural presente en lugar de una nucleobase natural. Los análogos correspondientes de nucleobases de purina o pirimidina son bien conocidos en la técnica. Cabe señalar que las modificaciones anteriores pueden combinarse.

La molécula de ácido nucleico se selecciona preferentemente entre moléculas de ácido nucleico que son adecuadas para aplicaciones farmacéuticas, en particular, entre moléculas no codificantes, o entre moléculas de ARN capaces de mediar la interferencia de ARN tal como moléculas de ARNiP o precursores de las mismas. Otras moléculas de ARN adecuadas incluyen moléculas de miARN, antagomiRs, ribozimas y sus precursores. También se prefieren transcripciones de ARN, tales como, en particular, ARNm.

La expresión "componente nucleosídico" también engloba nucleósidos o nucleótidos y análogos de los mismos. Un nucleósido es un compuesto que comprende una nucleobase y un grupo azúcar. Un compuesto nucleotídico es un compuesto que comprende una nucleobase, un grupo azúcar y un grupo fosfato. Los compuestos modificados con azúcar, fosfato y nucleobase también están englobados por la presente invención, en particular, agentes terapéuticos análogos de nucleósidos o nucleótidos que son adecuados para el tratamiento del cáncer y/o de infecciones víricas, tales como AZT, aciclovir, ganciclovir, valaciclovir, gemcitabina, citarabina, etc.

El componente nucleosídico está conectado al resto de monosacárido a través de una nucleobase de la molécula. Si el compuesto es un ácido nucleico, puede estar conectado a través de un elemento estructural presente en la molécula de ácido nucleico, en particular, a través de un elemento estructural terminal, es decir, un elemento estructural ubicado en el extremo 5' o en el extremo 3' de una cadena de ácido nucleico. En una realización preferida, la conexión se produce a través de una nucleobase terminal modificada presente en una molécula de ácido nucleico, en particular, en una molécula de ARN. De acuerdo con una realización particularmente preferida, el resto de monosacárido se une covalentemente al elemento estructural terminal 5' o 3' de una transcripción de ARN, tal como, en particular, ARNm. Estos conjugados demostraron ser especialmente adecuados para transfectar células vegetales y conferir cualquier rasgo deseado a una planta de interés.

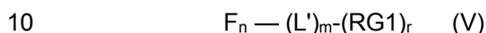
En una realización preferida, el enlace covalente al resto de monosacárido puede estar unido a una nucleobase presente en el componente nucleosídico, por ejemplo, de un elemento estructural de una molécula de ADN o ARN, por ejemplo, a la posición 8 de una base de purina o a la posición 5 de una base de pirimidina.

Una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN, en general, tiene una longitud de 5, 10, 12, 15 o 18 elementos estructurales y hasta 25, 30, 50 o 100 elementos estructurales o más. La molécula de ácido nucleico puede prepararse mediante síntesis química o mediante métodos enzimáticos a partir de moldes de ácido nucleico, por ejemplo, por transcripción, catalizados por una ARN polimerasa, por ejemplo, por ARN polimerasa de T3, T7 o SP6, o por replicación de ADN o por transcripción inversa. Preferentemente, durante la síntesis química o enzimática, se incorpora un elemento estructural que comprende un grupo funcional, por ejemplo, un grupo funcional de clic, por ejemplo, un grupo alquino terminal, o un grupo azida, un grupo alqueno restringido, tal como un grupo norborneno, un grupo óxido de nitrilo, un grupo imina de nitrilo o un grupo tetrazina. En una realización particular, se incorpora un elemento estructural que está modificado mediante la inclusión de un grupo alquino terminal, opcionalmente, a través de un enlazador. En los documentos WO2006/117161 y WO2008/052775, se describen métodos para introducir elementos estructurales modificados mediante clic en moléculas de ácido nucleico. El grupo funcional del componente nucleosídico se puede acoplar a un grupo funcional complementario que esté unido al resto de ácido graso poliinsaturado de acuerdo con métodos conocidos que implican una reacción clic con un grupo reactivo

complementario funcional en la reacción clic, por ejemplo, un grupo azida.

5 Como alternativa, se puede introducir un elemento estructural de ácido nucleico modificado unido al resto de sacárido en un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ARN, durante una síntesis en fase sólida de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, usando un elemento estructural de fosforamidita.

Un conjugado para su uso de acuerdo con la invención se puede preparar a partir de un reactivo que tiene la fórmula general (V)



en la que

15 F, n, m y r son como se han definido anteriormente,  
L' es un enlazador y  
RG1 es un grupo reactivo a clic, tal como un grupo azida (o un grupo alquino).

Un reactivo adicional para fabricar un conjugado de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la invención, está representado por la fórmula general (VI):

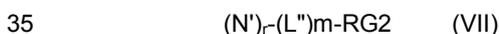


en la que

25 F, L, n y m son como se han definido anteriormente, y  
BB es un elemento estructural para sintetizar una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un nucleósido trifosfato, o un elemento estructural adecuado para la síntesis en fase sólida, por ejemplo, una fosforamidita.

30 Otro aspecto más del presente documento es un método de fabricación de un conjugado en el que un resto de monosacárido se une covalentemente al extremo 3' o 5' de una transcripción de ARN tal como ARNm, comprendiendo dicho método

(i) acoplar el reactivo (V) con al menos un componente nucleosídico modificado (VII)



en el que

40 N' es una molécula de ARN, por ejemplo, una molécula de ARNm,  
L'' es un enlazador,  
r y m son como se han definido anteriormente  
RG2 es un grupo reactivo a clic capaz de reaccionar con RG1, tal como un grupo alquino (o un grupo azida), formando así el conjugado; o

45 (ii) acoplar el reactivo (V) con al menos un elemento estructural de ácido nucleico modificado (VIII)



en el que

50 BB es un elemento estructural para sintetizar una molécula de ARN,  
L'' es un enlazador,  
m es 0 o 1, y  
55 RG2 es como se ha definido anteriormente,  
formando así el reactivo (VI) e incorporando el reactivo (VI) a una molécula de ARN, por ejemplo, mediante síntesis química o enzimática, formando así el conjugado.

Un aspecto adicional del presente documento se refiere a un método de mediación de modificaciones de ácido nucleico específicas de la diana en una célula o un organismo que comprende las etapas:

60 (a) poner en contacto una célula u un organismo con el conjugado descrito anteriormente, en condiciones en las que pueden producirse modificaciones de ácido nucleico específicas de la diana, y  
(b) mediar una modificación de ácido nucleico específica de la diana efectuada por el componente nucleosídico del conjugado hacia un ácido nucleico diana.

65 La etapa de contacto (a) puede comprender introducir el conjugado en una célula diana, por ejemplo, una célula diana

aislada, que puede estar presente en un cultivo celular, un microorganismo unicelular o una célula diana, o una pluralidad de células diana dentro de un organismo multicelular. La célula diana es preferentemente una célula eucariota, en particular, una célula de mamífero, incluyendo una célula humana o una célula vegetal. El organismo diana es preferentemente una planta o un organismo mamífero, por ejemplo, un ser humano. La introducción en un organismo puede comprender la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, la administración transmucosa o la administración transdérmica. En caso de una transfección de células vegetales, se descubrió que, sorprendentemente, los conjugados descritos que incluyen un resto de monosacárido y unidos covalentemente a un componente nucleosídico son absorbidos por una planta, si se añade el conjugado a las raíces de las plantas. Por lo tanto, la introducción de un conjugado en una planta puede comprender la administración del conjugado a las raíces.

La etapa de mediación (b) comprende preferentemente una inhibición de un ácido nucleico diana, por ejemplo, por interferencia de ARN cuando se usa un conjugado de ARNip, o por inhibición de la transcripción del ARNm cuando se usa un conjugado de molécula no codificante, o por inhibición de la replicación de virus o de células tumorales usando un conjugado de nucleósido/nucleótido terapéutico.

El conjugado se introduce preferentemente en una célula diana por endocitosis mediada por receptor, más preferentemente, por endocitosis mediada por proteínas transportadoras de azúcar. Por lo tanto, el conjugado puede introducirse en la diana en ausencia de un vehículo de administración y/o de un reactivo de transfección.

De acuerdo con la invención, el conjugado se usa para la transfección de células *in vitro*, en particular, para la transfección de células vegetales o células de mamífero, incluyendo células humanas *in vitro*.

En otra realización preferida, el conjugado se usa para la transfección de células vegetales *in vitro* o *in vivo*.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el conjugado descrito es particularmente adecuado para la transfección de células vegetales que expresan proteínas transportadoras de azúcar. Los conjugados, en los que un resto de monosacárido está unido covalentemente al extremo 5' o 3' de una molécula de ARN monocatenario o bicatenario, tal como ARNm o ARN no codificante, pueden introducirse con éxito en células vegetales.

El conjugado descrito se puede usar en medicina, particularmente en medicina humana, pero también en medicina veterinaria. Por lo tanto, el presente documento también describe una composición farmacéutica que comprende un conjugado como se ha descrito anteriormente como el principio activo junto con un vehículo adecuado. Para las aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas, la composición farmacéutica puede estar en forma de solución, por ejemplo, una solución para infusión o inyección, una crema, pomada, comprimido, suspensión o similar. La composición puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por administración parenteral, por ejemplo, inyección o infusión, por aplicación transmucosa o por aplicación transdérmica, o por aplicación oral, tópica, nasal, rectal, etc.

La composición farmacéutica puede comprender el conjugado como agente activo en forma no encapsulada, por ejemplo, sin un vehículo de administración tal como un liposoma y/o sin un reactivo de transfección.

El conjugado puede usarse para la regulación a la baja de genes en una célula o un organismo, por ejemplo, genes víricos o genes asociados a enfermedades celulares, tales como oncogenes o genes autoinmunitarios o asociados a enfermedades alérgicas. Los genes diana celulares preferidos son, por ejemplo, el gen *syk*, que es un gen autoinmunitario o asociado a una enfermedad alérgica que codifica una tirosina quinasa esplénica (SYK), que participa en las cascadas de señalización inflamatoria dependiente de IgE. El ortólogo de SYK humano se describe en UniProt P 43405, el ortólogo de SYK murino se describe en UniProt P 48025. Un gen diana preferido adicional es el gen APP que codifica la proteína precursora amiloide (APP). El ortólogo de APP humano se describe en UniProt P 05067. La APP es escindida por las secretasas  $\beta$  o  $\gamma$  en fragmentos neurotóxicos asociados con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Los genes diana víricos preferidos son genes que codifican la proteína N o P de los virus del orden *Mononegavirales*, tales como el virus del Ébola, virus del sarampión y virus de la rabia.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método para transfectar una célula vegetal, que comprende exponer una célula vegetal a un conjugado como se ha descrito anteriormente. La etapa de exponer una célula vegetal a un conjugado como se ha definido en el presente documento, preferentemente, comprende añadir el conjugado a las raíces de una planta. Se pudo observar que el conjugado es luego absorbido por la planta y transportado por las raíces. En particular, se pueden introducir conjugados en los que un resto de sacárido está unido covalentemente al extremo 3' o 5' de una molécula de ARN monocatenario o bicatenario, tal como ARNm o ARN no codificante, con éxito en células vegetales usando el método descrito en el presente documento.

Por lo tanto, el presente documento describe una estrategia conveniente para desarrollar nuevas líneas de plantas que presenten determinados rasgos.

La presente invención se describirá con más detalle mediante las siguientes figuras y los siguientes ejemplos.

## Leyendas de las figuras

### Figura 1

Estructura química y secuencia de ARNip modificado con monosacárido. Como ejemplo comparativo, se muestra ARNip modificado con anandamida.

### Figura 2

Administración de ARNip modificado con glucosa a células vegetales. El ARNip modificado con glucosa añadido a las raíces de *Arabidopsis thaliana* es absorbido por la planta y transportado a lo largo de las raíces (Alexa = Alexa Fluor® 647, Life Technologies).

### Figura 3

Síntesis de reactivos modificados con monosacárido. El esquema de reacción representado muestra la preparación de azida de glucosa (A) y triglucosazida (B).

### Figura 4

Síntesis de ARNip modificado con glucosa a través de la cicloadición de azida-alquino catalizada con cobre (I) (CuAAC).

### Figura 5

Expresión relativa de luciferasa de Renilla en células RBL-2H3 después del tratamiento con dúplex de ARNip modificado con glucosa contra luciferasa de Renilla en comparación con el mismo ARNip con modificación de anandamida (ARNip-AEA). Las células se cultivaron en medio con glucosa 11,1 mM (negro) o en medio sin glucosa (verde).

### Figura 6

Principio del experimento de marcaje de la transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa de T7 y GTP marcado con  $\gamma$ -glucosa.

### Figura 7

Marcaje quimioenzimático regioselectivo de ARN usando ARN ligasa de T4.

## Ejemplos

### 1. Síntesis de conjugados de ARN-monosacárido

La síntesis de la cadena de ARN modificado con monosacárido se realizó como se muestra en la Figura 4. El elemento central de la síntesis es la reacción clic de alquino-azida catalizada por Cu (34-39) entre una cadena de ARN modificado con alquino y la azida de glucosa **1** correspondiente. Para comparar las cadenas de ARN modificado con glucosa con otros sistemas, también se utilizó el método clic para la preparación de un conjugado de triglucosa-ARN usando monoazida de triglucosa **2**, y de una cadena de ARN modificado con  $\beta$ -ciclodextrina con la monoazida de  $\beta$ -ciclodextrina **3**. Además, se preparó una cadena de ARN modificado con anandamida como ejemplo comparativo usando monoazida de anandamida (AEA) **4**. Los respectivos restos de monosacáridos, así como la monoazida de anandamida, se muestran en la Figura 1. En todos los casos se introdujo un espaciador corto de etilenglicol entre la cadena de ARN y el respectivo ligando. La tecnología de clic permitió en todos los casos la unión eficaz de las moléculas de monosacárido o anandamida al ARN. Además, el método permitió una conjugación eficaz en el extremo 3' más difícil de acceder del dúplex de ARNip. Las cadenas de ARNip modificadas en 3' normalmente son mejor toleradas por la maquinaria del ARNi (41). Para lograr la unión del extremo 3', se usó una fosforamidita de desoxiuridina con un asa de octadiína en C5 durante la síntesis de ARN.

En la Figura 3, se muestra la síntesis de azida de glucosa y azida de triglucosa. Para preparar la azida de glucosa **1** en una primera etapa, se introdujo un separador de etilenglicol en un derivado de glucosa protegido usando 2'-bromoetanol. En una etapa posterior, se introdujo una funcionalidad azida antes de que el derivado de glucosa fuera desprotegido para producir azida de glucosa **1**. Para la síntesis de la azida de triglucosa, primero se preparó un enlazador ramificado a partir de pentaeritritol y bromuro de propargilo. Posteriormente, después de proteger la funcionalidad alcohol restante, se añadieron tres azidas de glucosa en una reacción clic. Al desproteger la funcionalidad alcohol e introducir otra funcionalidad azida finalmente se obtuvo la azida de triglucosa **2**.

Posteriormente, las azidas se sometieron a reacción clic con excelentes rendimientos, obteniéndose una cadena codificante de ARN que contenía alquino como se muestra en la Figura 4. Después de la purificación por HPLC, los ARN modificados con monosacárido se hibridaron con la contracadena no codificante, obteniéndose los dúplex de ARNip representados en la Figura 1.

### 2. Administración de conjugado de ARN-monosacárido a células

Para visualizar la administración de los dúplex de ARN a las células vivas, inicialmente, se hibridó la cadena codificante

de ARN modificado con monosacárido con una cadena no codificante que contenía un marcador de fluoresceína (Alexa = Alexa Fluor® 647, Life Technologies).

Se estudió la absorción del dúplex de ARN modificado con glucosa con células de *Arabidopsis thaliana*. Se añadió ARNip modificado con glucosa a las raíces de *Arabidopsis thaliana*. Los estudios de microscopía confocal representados en la Figura 2 muestran que el ARNip no modificado es, tal como se esperaba, incapaz de entrar en las células. El ARNip modificado con glucosa, sin embargo, se detectó fácilmente dentro de las respectivas células, demostrando la absorción y el transporte a lo largo de las raíces. También se observó el mismo resultado con ADNbc modificado (no mostrado).

Para demostrar que las moléculas de ARNip administradas presentan el efecto del ARNi deseado, se utilizó un ensayo de indicador de luciferasa doble disponible en el mercado. Se transfectó un plásmido que contenía dos luciferasas (Renilla y luciérnaga) en las células. Se evaluó el ARNi dirigiéndose a la expresión de la luciferasa de Renilla, mientras que la luciferasa de luciérnaga sirvió como un patrón interno. Para estos estudios, se usó el ARNip modificado con glucosa sin modificación adicional de fluoresceína. Los experimentos de control iniciales con dúplex de ARN no modificado (sin glucosa, sin fluoresceína) mostraron que la expresión de Renilla no se vio afectada. Por el contrario, se observó un silenciamiento dependiente de la dosis de la expresión de Renilla en presencia de ARNip modificado con ligando en ambas estirpes celulares (Figura 5). Lo que es más importante, incluso una cantidad relativamente baja de conjugado de ARNip-ligando mostró ya un efecto considerable.

Seguidamente, se evaluó la eficacia silenciadora del ARNip modificado con glucosa en comparación con el conjugado de ananamida-ARNip. El resultado de esta comparación se representa en la Fig. 5. Sorprendentemente, el nuevo ARNip modificado con glucosa es constantemente significativamente más potente que el sistema de ananamida, lo que establece a la glucosa y a otros restos de monosacárido como una nueva y poderosa herramienta de administración.

### 3. Marcaje de ARN en 5' usando nucleótidos marcados con y

Para marcar transcripciones de ARN en el extremo 5', primero en el 39-mero, se preparó un molde de ADN portador de la secuencia promotora de T7 seguida de una transcripción codificada corta. Esto permitió una reacción de polimerización del ARN independiente del cebador, lo que resulta en una transcripción del ARN 21-merica. Debido al inicio *de novo* de la polimerasa, el primer nucleótido de ARN usado permanece como un trifosfato en la transcripción, proporcionando un producto de transcripción marcado con monosacárido 5' único. Como, en general, la ARN polimerasa de T7 comienza en una secuencia CC<sub>n</sub>, que genera transcripciones que se inician en G, el experimento se realizó con GTP marcado con glucosa. A pesar de la presencia del resto de glucosa, la ARN polimerasa de T7 aceptó el trifosfato marcado y continuó el proceso de transcripción, dando el producto marcado con glucosa esperado.

La siguiente cadena codificante y molde que codifica una secuencia promotora de T7 y una transcripción 21-merica se adquirieron en Metabion.

Codificante: 5'-dATAATACGACTCACTATAGGC

Molde: 3'-dTATTATGCTGAGTGATATCCGGAAAGTGATGAGGATGGA-5'

Antes de las transcripciones, se hibridaron las cadenas en un termociclador (Mastercycler Personal de Eppendorf). Por lo tanto, se hibridaron 20 µM de la cadena codificante a 20 µM de la cadena molde en tampón (NaCl 100 mM, Tris-HCl 25 mM, pH = 7,6 a 25 °C) aplicando el siguiente gradiente de temperatura: 95 °C durante 4 min seguido de enfriamiento con 2 °C/min a 4 °C.

Las transcripciones *in vitro* se llevaron a cabo en un tubo de PCR de 0,2 ml en una configuración de 20 µl.

Se añadieron hasta 40 pmol del molde de ADN hibridado en tampón de transcripción (HEPES 40 mM, pH = 7,4, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, 2 mM, DTT 10 mM), ATP 400 µM, CTP, UTP, GTP 20-80 µM (400 µM para el control) y GTP **7d** marcado con glucosa 400 µM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de una unidad de ARN polimerasa de T7 (New England Biolabs), cuidadosamente mezclada y luego incubando a 37 °C. Después de 5 h, se detuvieron las transcripciones mediante la adición de un volumen de colorante de carga de ARN (formamida al 47,5 %, SDS al 0,01 %, azul de bromofenol al 0,01 %, cianol de xileno al 0,005 %, EDTA 0,5 mM) y se analizaron 20 µl de cada muestra en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 20 % (urea 7 mM, 35 mA, 1000 V) y se visualizaron usando un sistema de generación de imágenes LAS-3000 (Raytest). Para la visualización de las transcripciones de ARN se aplicó tinción con SYBR green II.

### 4. Marcaje de ARN en 3' usando la ARN ligasa de T4

La ARN ligasa de T4 cataliza la transferencia de una citidina-3',5'-bisfosfato al 3'-OH del ARN monocatenario en presencia de ATP.

Por lo tanto, se puede hacer reaccionar una molécula de ARN monocatenario en presencia de ARN ligasa de T4 y

ATP con una citidina-3',5'-bisfosfato marcada portadora de una fracción alquino en un grupo fosfato. Una reacción clic posterior con un resto de monosacárido modificado con azida, como los que se muestran en la Figura 1, permite la preparación de una molécula de ARN monocatenario modificada en 3' como se muestra en la Figura 7.

## 5 Referencias

- (1) Fire, A. Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6966-6984.
- (2) Elbashir, S. M. L.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- (3) Mello, C. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985-6994.
- 10 (4) Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M.; Hannon, G. J. *Nature* **2001**, *409*, 363-366.
- (5) Castanotto, D.; Rossi, J. J. *Nature* **2009**, *457*, 426-433.
- (6) Tiemann, K.; Rossi, J. J. *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 142-151.
- (7) Davis, M. E.; Zuckerman, J. E.; Choi, C. H. J.; Seligson, D.; Tolcher, A.; Alabi, C. A.; Yen, Y.; Heidel, J. D.; Ribas, A. *Nature* **2010**, *464*, 1067-1070.
- 15 (8) Baigude, H.; McCarroll, J.; Yang, C. S.; Swain, P. M.; Rana, T. M. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 237-241.
- (9) Zimmermann, T. S.; Lee, A. C. H.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Bumcrot, D.; Fedoruk, M. N.; Harborth, J.; Heyes, J. A.; Jeffs, L. B.; John, M.; Judge, A. D.; Lam, K.; McClintock, K.; Nechev, L. V.; Palmer, L. R.; Racie, T.; Röhl, I.; Seiffert, S.; Shanmugam, S.; Sood, V.; Soutschek, J.; Toudjarska, I.; Wheat, A. J.; Yaworski, E.; Zedalis, W.; Koteliansky, V.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.-P.; MacLachlan, I. *Nature* **2006**, *441*, 111-114.
- 20 (10) Spagnou, S.; Miller, A. D.; Keller, M. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13348-13356.
- (11) Urban-Klein, B.; Werth, S.; Abuharbid, S.; Czubyko, F.; Aigner, A. *Gene Ther.* **2004**, *12*, 461-466.
- (12) Lv, H.; Zhang, S.; Wang, B.; Cui, S.; Yan, J. *J. Control. Release* **2006**, *114*, 100-109.
- (13) Ma, Z.; Li, J.; He, F.; Wilson, A.; Pitt, B.; Li, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 755-759.
- 25 (14) Akhtar, S.; Benter, I. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 164-182.
- (15) Kurreck, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378.
- (16) Nakagawa, O.; Ming, X.; Huang, L.; Juliano, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8848-8849.
- (17) Alam, M. R.; Dixit, V.; Kang, H.; Li, Z. B.; Chen, X.; Trejo, J.; Fisher, M.; Juliano, R. L. *Nuc. Acids Res.* **2008**, *36*, 2764-2776.
- (18) Alam, M. R.; Ming, X.; Dixit, V.; Fisher, M.; Chen, X.; Juliano, R. L. *Oligonucleotides* **2010**, *20*, 103-109.
- 30 (19) Ming, X.; Alam, M. R.; Fisher, M.; Yan, Y.; Chen, X.; Juliano, R. L. *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38*, 6567-6576.
- (20) Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1624-1625.
- (21) Leamon, C. P.; Low, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A* **1991**, *88*, 5572-5576.
- (22) McNamara, J. O.; Andrechek, E. R.; Wang, Y.; Viles, K. D.; Rempel, R. E.; Gilboa, E.; Sullenger, B. A.; Giangrande, P. H. *Nat. Biotech.* **2006**, *24*, 1005-1015.
- 35 (23) Lorenz, C.; Hadwiger, P.; John, M.; Vornlocher, H. P.; Unverzagt, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975-4977.
- (24) Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R. K.; Racie, T.; Rajeev, K. G.; Rohl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliansky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.-P. *Nature* **2004**, *432*, 173-178.
- 40 (25) Nishina, K.; Unno, T.; Uno, Y.; Kubodera, T.; Kanouchi, T.; Mizusawa, H.; Yokota, T. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 734-740.
- (26) Godfray, J.; Estibeiro, P. *Expert Opin. Ther. Targets* **2003**, *7*, 363-376.
- (27) Wood, M. J. A.; Trützsch, B.; Abdelgany, A.; Beeson, D. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, R279-R284.
- 45 (28) Fillion, M. C.; Phillips, N. C. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1997**, *1329*, 345-356.
- (29) Pertwee, R. G. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *74*, 129-180.
- (30) Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. *Science* **1992**, *258*, 1946-1949.
- (31) McFarland, M. J.; Porter, A. C.; Rakhshan, F. R.; Rawat, D. S.; Gibbs, R. A.; Barker, E. L. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 41991-41997.
- 50 (32) McFarland, M. J.; Barker, E. L. *Pharmacol. Ther.* **2004**, *104*, 117-135.
- (33) Glaser, S. T.; Kaczocha, M.; Deutsch, D. G. *Life Sci.* **2005**, *77*, 1584-1604.
- (34) Burley, G. A.; Gierlich, J.; Mofid, M. R.; Nir, S. T. H.; Eichen, Y.; Carell, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398.
- (35) Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639.
- 55 (36) Gramlich, P. M. E.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442.
- (37) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **2010**, *107*, 15329-15334.
- (38) Aigner, M.; Hartl, M.; Fauster, K.; Steger, J.; Bister, K.; Micura, R. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 47-51.
- (39) Paredes, E.; Das, S. R. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 125-131.
- (40) Xia, W.; Low, P. S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6811-6824.
- 60 (41) Wang, Y.; Juranek, S.; Li, H.; Sheng, G.; Wardle, G. S.; Tuschl, T.; Patel, D. J. *Nature* **2009**, *461*, 754-761.
- (42) Ross, T. L.; Honer, M.; Lam, P. Y. H.; Mindt, T. L.; Groehn, V.; Schibli, R.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2462-2470.
- (43) Facci, L.; Daltoso, R.; Romanello, S.; Buriani, A.; Skaper, S. D.; Leon, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **1995**, *92*, 3376-3380.
- 65 (44) Rakhshan, F.; Day, T. A.; Blakely, R. D.; Barker, E. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 960-967.
- (45) Wong, B. R.; Grossbard, E. B.; Payan, D. G.; Masuda, E. S. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2004**, *13*, 743-762.

- (46) Ulanova, M.; Duta, F.; Puttagunta, L.; Schreiber, A. D.; Befus, A. D. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, 9, 901-921.
- (47) Sanderson, M. P.; Gelling, S. J.; Rippmann, J. F.; Schnapp, A. *Cell. Immunol.* **2010**, 262, 28-34.
- (48) Martin, B. R.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 301, 790-796.
- 5 (49) S. Munro, K. L. Thomas, M. Abu-Shaar, *Nature* **1993**, 365, 61-65
- (50) A. B. Lynn, M. Herkenham, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1994**, 268, 1612-1623.
- (51) L. Facci, R. Dal Toso, S. Romanello, A. Buriani, S. D. Skaper, A. Leon, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* **1995**, 92, 3376-3380.
- (52) L. A. Matsuda, S.J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, T. I. Bonner, *Nature* **1990**, 346, 561-564.
- 10 (53) M. Herkenham, A. B. Lynn, B. R. de Costa, E. K. Richfield, *Brain Res.* **1991**, 547, 267-274.
- (54) B. F. Thomas, X. Wie, B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 263, 1383-1390.
- (55) T. M. Westlake, A. C. Howlett, T. I. Bonner, L. A. Matsuda, M. Herkenham, *Neuroscience* **1994**, 63, 637-652.

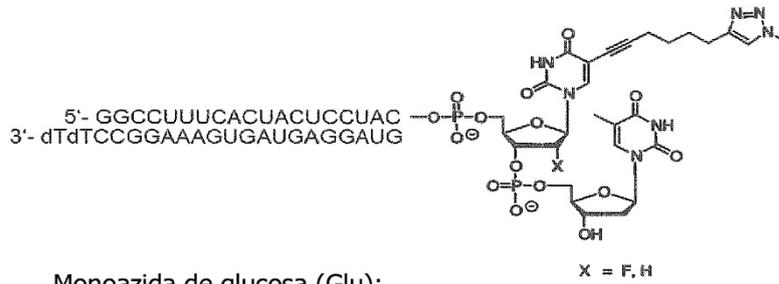
LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Ludwig-Maximilians-Universität München
- <120> Moléculas de ácido nucleico modificadas con sacárido
- 20 <130> 56988P WO
- <150> EP 14 151 255.8
- <151> 14-01-2014
- 25 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 30 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> Cadena codificante que codifica promotor de T7
- <400> 1
- ataatacgcac tcactatagg c 21
- 40 <210> 2
- <211> 39
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
- <223> Cadena molde que codifica promotor de T7
- <400> 2
- 50 aggtaggagt agtgaaagc ctatagtgag tcgtattat 39

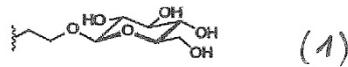
## REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* de un conjugado que comprende al menos un resto de monosacárido y al menos un componente nucleosídico en la transfección de células que tienen proteínas transportadoras de azúcar en la membrana celular,  
 5 en el que, en el conjugado, se une covalentemente al menos un resto de monosacárido a al menos un componente nucleosídico a través de un enlazador que comprende un grupo cíclico formado mediante una reacción clic, en particular, un grupo 1,2,3-triazol, formado mediante una reacción clic entre un alquino y una azida, o un grupo formado mediante una reacción clic entre un norborneno y una imina de nitrilo, un óxido de nitrilo o una tetrazina, en el que el componente nucleosídico está conectado al resto de monosacárido a través de una nucleobase, y  
 10 en el que el componente nucleosídico se selecciona entre ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el componente nucleosídico es una molécula de ácido nucleico, en particular, una molécula de ARN, por ejemplo, una molécula de ARN monocatenario o una molécula de ARN bicatenario que tiene opcionalmente al menos un saliente 3', más particularmente, una molécula de ARNip.  
 15
3. El uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el componente nucleosídico es una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un elemento estructural modificado.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el componente nucleosídico está conectado al resto de monosacárido a través de una nucleobase de un elemento estructural presente en una molécula de ácido nucleico, en particular, a través de un elemento estructural terminal presente en una molécula de ácido nucleico.  
 20
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el resto de monosacárido se selecciona entre glucosa, manosa, galactosa, ribosa, arabinosa, fructosa, fucosa y ácido siálico.  
 25
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el conjugado comprende
- (i) un resto de monosacárido y un componente nucleosídico, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico;
  - (ii) múltiples grupos de monosacáridos y un componente nucleosídico, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico;
  - (iii) un resto de monosacárido y múltiples componentes nucleosídicos, por ejemplo, múltiples moléculas de ácido nucleico; o
  - (iv) múltiples restos de monosacáridos y múltiples componentes nucleosídicos, por ejemplo, múltiples moléculas de ácido nucleico.
- 30
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el conjugado comprende un resto de monosacárido, unido covalentemente al extremo 3' o 5' de una transcripción de ARN, por ejemplo, ARNm.  
 35
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la transfección de células vegetales o células de mamífero, por ejemplo, células humanas.  
 40
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para la regulación a la baja de genes, por ejemplo, genes víricos o genes asociados a enfermedades celulares, tales como oncogenes o genes asociados a enfermedades autoinmunitarias.  
 45
10. Un método para transfectar una célula vegetal, que comprende exponer una célula vegetal a un conjugado según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

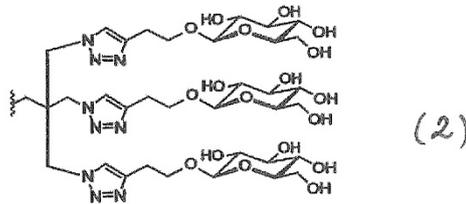
Ligandos de ARNip



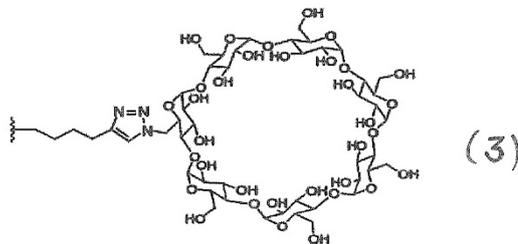
Monoazida de glucosa (Glu):



Monoazida de triglucosa (Triglu):



Monoazida de β-ciclodextrina



Monoazida de anandamida (EAE):

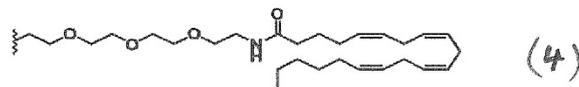
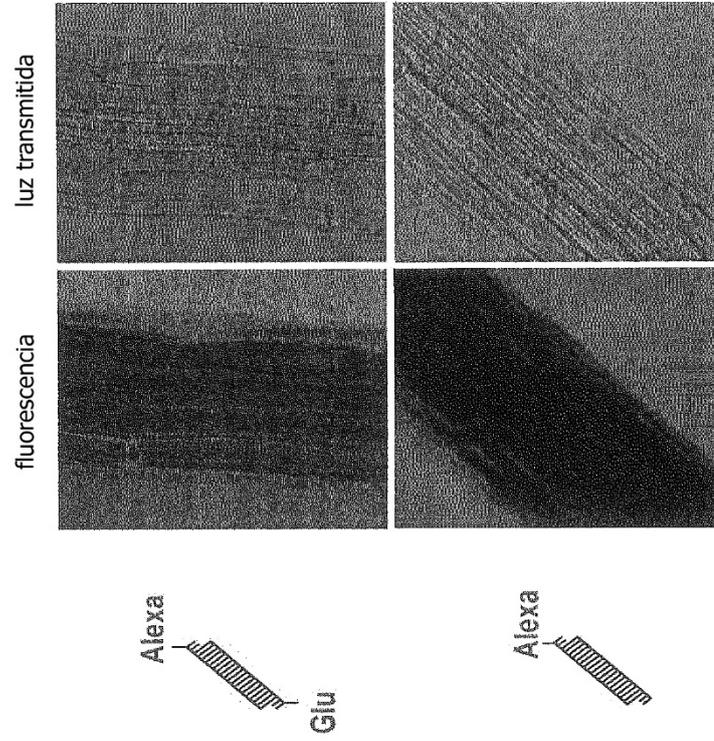


Fig. 1

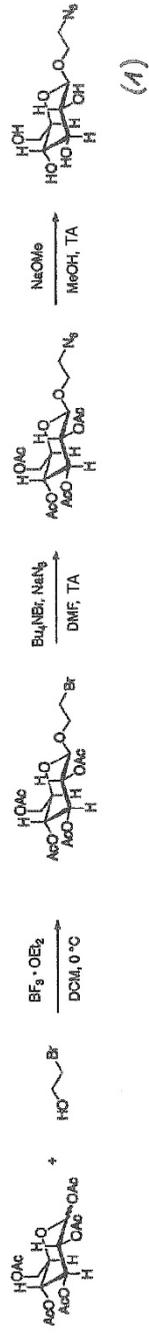
**Captación activa de ARNip modificado con glucosa por las raíces de *Arabidopsis thaliana***



Alexa = Alexa Fluor® 647 - lifetechnologies

**Fig. 2**

A) Síntesis de glucosazida:



B) Síntesis de triglucosazida:

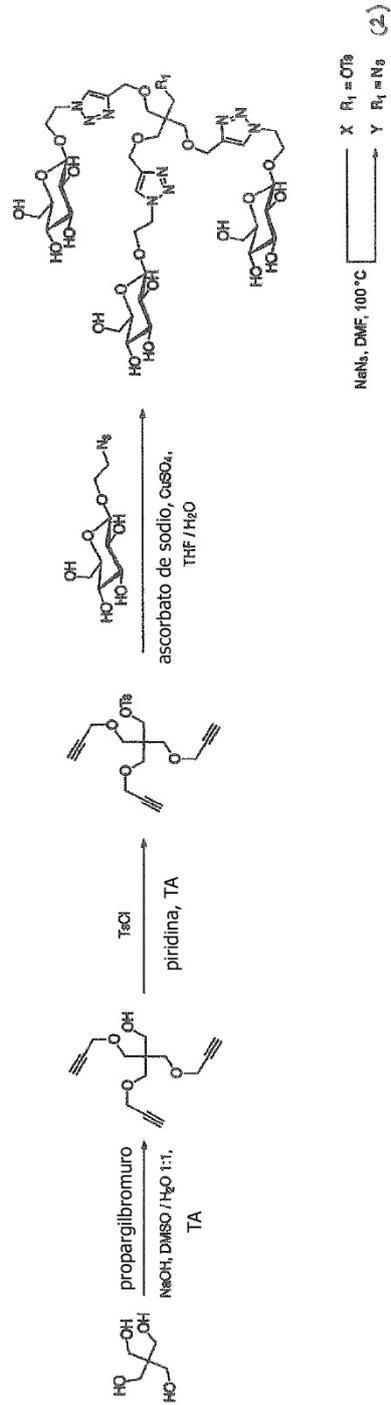


Fig. 3

Síntesis de ARNip modificado con glucosa a través de CuAAC:

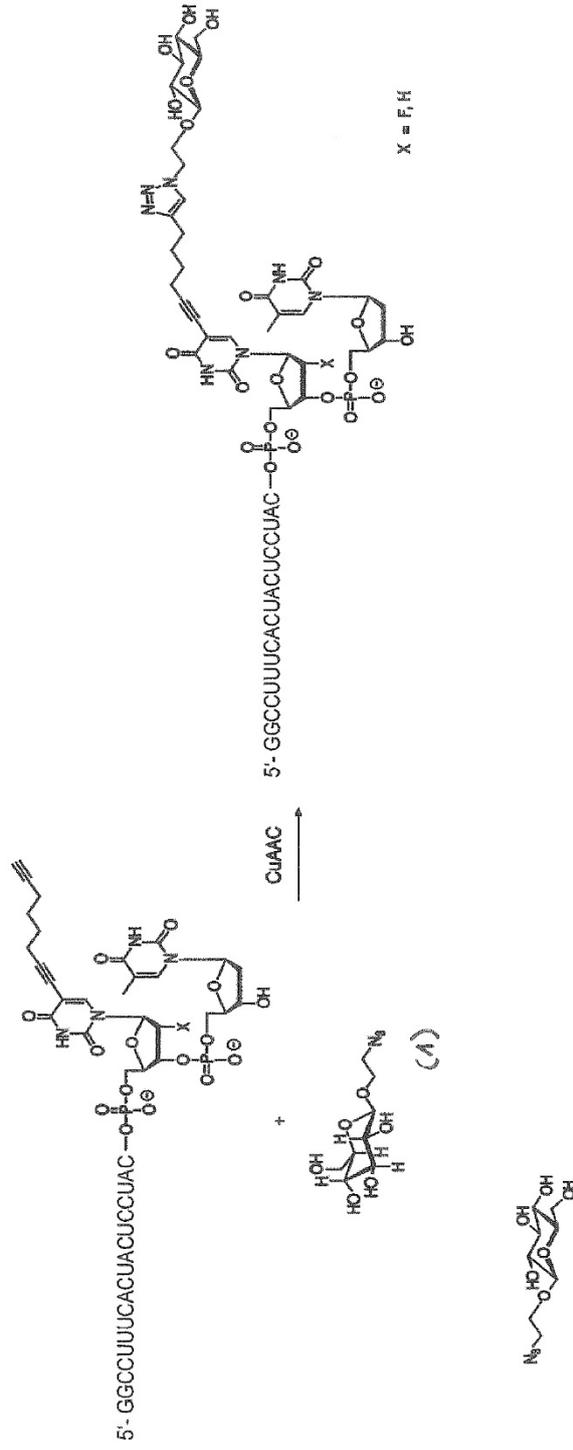


Fig. 4

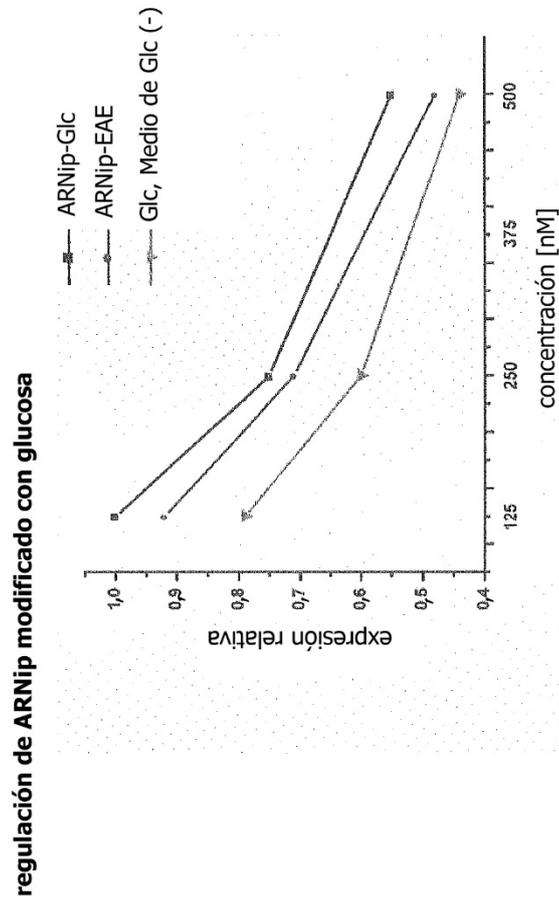


Fig. 5

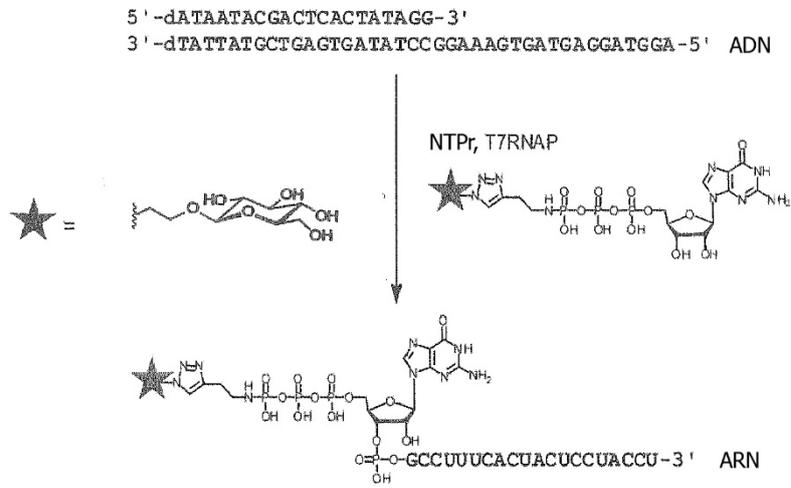


Fig. 6

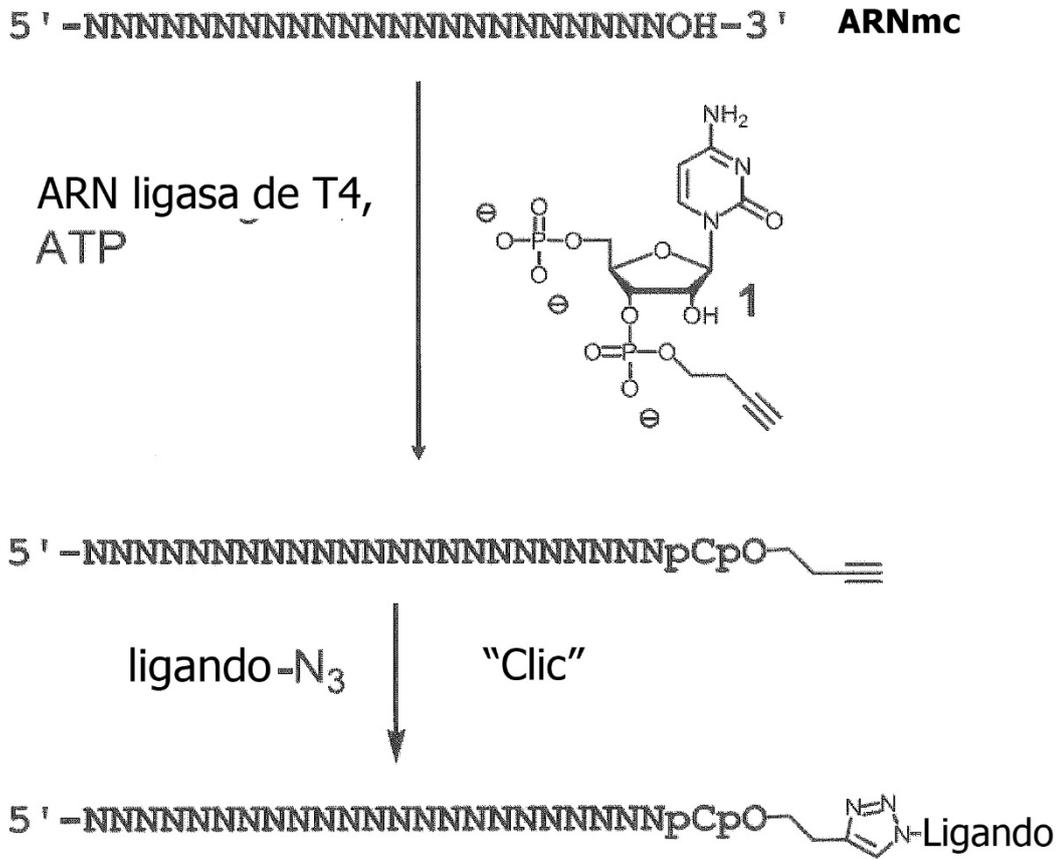


Fig. 7