(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 805 026**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/61 (2007.01)
A61K 47/56 (2007.01)
A61K 47/54 (2007.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2017** **PCT/EP2017/058112**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017** **WO17174657**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2017** **E 17715730 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 3439703**

(54) Título: **Ácido nucleico unido a un glucoconjugado trivalente**

(30) Prioridad:

05.04.2016 EP 16163939

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2021

(73) Titular/es:

SILENCE THERAPEUTICS GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE

(72) Inventor/es:

FRAUENDORF, CHRISTIAN y
CAMERON, MARK

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 805 026 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

Ácido nucleico unido a un glucoconjugado trivalente

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de conjugado de ácido nucleico novedosos. La invención se refiere además a composiciones que comprenden dichos conjugados y su uso en medicina, investigación y diagnóstico. Los compuestos de conjugado novedosos pueden usarse en el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades inflamatorias, trastornos metabólicos, enfermedades genéticas y hereditarias, oncología, enfermedades infecciosas y enfermedades oculares.

Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que el ARN bicatenario (ARNbc) bloquea la expresión génica (Fire et al., 1998 y Elbashir et al., 2001) y esto se ha denominado interferencia de ARN o "ARNi", mediada por moléculas de ARN de interferencia (ARNi). El ARNbc corto dirige el silenciamiento postranscripcional específico de genes en muchos organismos, incluyendo vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para estudiar la función génica. El ARNi está mediado por el complejo silenciador inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), una nucleasa multicomponente específica de secuencia que destruye ARN mensajeros homólogos al desencadenante del silenciamiento. Los ARNi (ARN de interferencia) tales como el ARNip (ARN de interferencia pequeño), el ARN antisentido y el micro-ARN son oligonucleótidos que evitan la formación de proteínas mediante silenciamiento génico, es decir, inhiben la traducción de la proteína. Los agentes silenciadores de genes son cada vez más importantes para aplicaciones terapéuticas en medicina.

Por tanto, el medio para la administración eficiente de oligonucleótidos, en particular ARNip bicatenarios, a células *in vivo* se está volviendo cada vez más importante y requiere un direccionamiento específico y una protección sustancial del ambiente extracelular, en particular proteínas séricas. Un método para conseguir un direccionamiento específico es conjugar un resto de direccionamiento con el agente de dúplex de ARNi. El resto de direccionamiento ayuda a dirigir el agente de dúplex de ARNi al sitio diana requerido y existe la necesidad de diseñar restos de direccionamiento apropiados para los sitios receptores deseados para que las células capten las moléculas conjugadas, tal como por endocitosis.

Por ejemplo, el receptor de Asialoglucoproteína (ASGP-R) es un receptor de alta capacidad, que es muy abundante en los hepatocitos. Una de las primeras divulgaciones de glucósidos de agrupación triantenaria fue en la Patente de los EE.UU. número US 5.885.968. Se conocen conjugados que tienen tres ligandos GalNAc y que comprenden grupos fosfato y se describen en Dubber et al. (2003), en Prakash et al (*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25 (2015) 4127-4130 y el documento WO2014/179620. El ASGP-R muestra una afinidad 50 veces mayor por la N-acetil-D-galactosilamina (GalNAc) que por la D-Gal.

En Dubber et al también se describe un glucoconjugado tetravalente de un ácido nucleico con grupos tiofosfato (*Bioconjugate Chem*. 2003, 14, 239-246).

Los hepatocitos que expresan la Lectina (receptor de asialoglucoproteína; ASGPR), que reconoce específicamente subunidades de β-galactosilo terminales de proteínas glicosiladas u otros oligosacáridos (P. H. Weigel et al., 2002), pueden usarse para dirigir un fármaco al hígado mediante el acoplamiento covalente de galactosa o galactosamina a la sustancia farmacológica (S. Ishibashi, et al. 1994). Además, la afinidad de unión puede aumentarse significativamente por el efecto de valencia múltiple, que se consigue mediante la repetición de la unidad de direccionamiento (E. A. L. Biessen et. al., 1995).

El ASGPR es un mediador para un transporte endosómico activo de glucoproteínas que contienen β-galactosilo terminal, por tanto, ASGPR es altamente adecuado para la administración dirigida de fármacos candidatos como ARNip, que deben ser suministrados a una célula (Akinc et al.).

Sin embargo, los ligandos de direccionamiento desarrollados hasta ahora no siempre se traducen en un entorno *in vivo* y existe una necesidad evidente de agentes de dúplex de ARNi conjugados con ligandos específicos de receptor más eficaces y métodos para su preparación para la administración *in vivo* de productos terapéuticos oligonucleotídicos, ácidos nucleicos y ARNip bicatenarios. La presente invención intenta abordar estas necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de conjugado que tienen tres ligandos sacarídicos y grupos fosfato modificados dentro de la porción sacarídica de los compuestos. Se ha demostrado que estos compuestos de conjugado tienen una potencia y duración *in vivo* mejoradas. Además, los grupos de conjugado son mucho más fáciles de preparar en comparación con conjugados conocidos en la técnica.

Los compuestos de conjugado de la presente invención tienen la fórmula I:

$$[S\text{-}X^1\text{-}P\text{-}X]_3\text{-}A\text{-}X^3\text{-}Z \qquad (I)$$

en donde:

S representa un sacárido;
X^1 representa alquileno C_3-C_6 o un tallo de etilenglicol $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3;
P es un tiofosfato;
X^2 es alquileno o un alquilén éter de fórmula $(-CH_2)_n-O-CH_2-$ donde n = 1-6;
A es una unidad de ramificación;
X^3 representa una unidad de unión;
Z es un ácido nucleico;
y donde el enlace entre X^3 y Z es un fosfato o tiofosfato.

El ácido nucleico puede seleccionarse entre ARNi, ARNip, ANip, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegélmeros. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de conjugado de fórmula I.

Descripción detallada de la invención

Las definiciones y explicaciones a continuación son para los términos que se usan a lo largo de todo el presente documento, incluyendo tanto la memoria descriptiva como las reivindicaciones.

A menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"Conjugado" o **"grupo conjugado"** significa un átomo o grupo de átomos unidos a un oligonucleótido o compuesto oligomérico. En general, los grupos de conjugado modifican una o más propiedades del compuesto al que se unen, incluyendo, pero sin limitación, propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas, de unión, de absorción, de distribución celular, de captación celular, de carga y/o aclaramiento.

"GalNAc" significa N-acetil galactosamina.

Alquilo C_x-C_y se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que tiene x-y átomos de carbono que pueden ser lineales o ramificados. Por ejemplo, alquilo C_1-C_6 e incluye C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 y C_6. "Ramificado" significa que al menos hay presente un punto de ramificación de carbono en el grupo. Por ejemplo, *terc*-butilo e isopropilo son ambos grupos ramificados. Los ejemplos de grupos alquilo C_1-C_6 incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, n-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo y n-hexilo. Esto también se aplica para C_1-C_6.

Alcoxi C_x-C_y se refiere a un grupo o parte de un grupo que tiene un grupo -O-alquilo C_x-C_y de acuerdo con la definición de alquilo C_x-C_y anterior. Alcoxi C_1-C_3 contiene de 1 a 3 átomos de carbono e incluye C_1, C_2 y C_3. Los ejemplos de alcoxi C_1-C_3 incluyen metoxi, etoxi, propoxi e isopropoxi. Alcoxi como se emplea en el presente documento también abarca realizaciones en las que el átomo de oxígeno o un átomo de oxígeno (por ejemplo, un único átomo de oxígeno) se encuentra dentro de la cadena alquílica, por ejemplo, $CH_2CH_2OCH_3$ o CH_2OCH_3. Por tanto, el alcoxi puede unirse a través de carbono al resto de la molécula, por ejemplo, $-CH_2CH_2OCH_3$ o, como alternativa, el alcoxi se une a través del oxígeno al resto de la molécula, por ejemplo, -O-alquilo C_{1-3}. En determinados casos, el alcoxi puede unirse a través del oxígeno al resto de la molécula, pero el grupo alcoxi contiene un átomo de oxígeno adicional, por ejemplo, $-OCH_2CH_2OCH_3$.

La expresión **"ácido nucleico"** se refiere a moléculas compuestas por nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos monocatenarios (ADNmc), ácidos nucleicos bicatenarios (ADNbc), ácidos ribonucleicos de interferencia pequeños (ARNip) y microARN (miARN). Un ácido nucleico también puede comprender cualquier combinación de estos elementos en una sola molécula.

El término **"tratar"** o **"tratando"** o **"tratamiento"** puede incluir la profilaxis y medios para mejorar, aliviar síntomas, eliminar la causa de los síntomas de forma temporal o permanente, o prevenir o retrasar la aparición de los síntomas del trastorno o la afección mencionados. Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de seres humanos y animales no humanos.

Por **"cantidad eficaz"** o **"cantidad terapéuticamente eficaz"** o **"dosis eficaz"** se entiende esa cantidad suficiente para desencadenar los efectos farmacológicos o terapéuticos deseados, dando como resultado, por tanto, la prevención o el tratamiento eficaz del trastorno. La prevención del trastorno se manifiesta retrasando la aparición

de los síntomas del trastorno en un grado médicamente significativo. El tratamiento del trastorno se manifiesta por una disminución de los síntomas asociados al trastorno o una mejora de la recurrencia de los síntomas del trastorno.

Una **"composición farmacéutica"** o **"composición"** significa una mezcla de sustancias adecuadas para su administración a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender uno o más agentes activos y un vehículo farmacéutico, por ejemplo, una solución acuosa estéril.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula I:

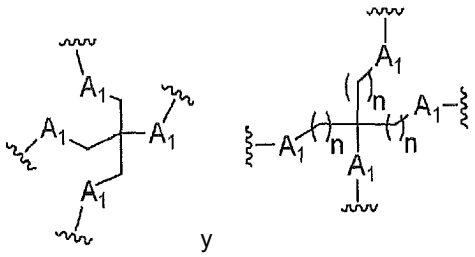
$$[S\text{-}X^1\text{-}p\text{-}X^2]_3\text{-}A\text{-}X^3\text{-}Z \qquad (I)$$

en donde:

S representa un sacárido;
X^1 representa alquileno C_3-C_6 o un tallo de etilenglicol $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3;
P es un tiofosfato;
X^2 es alquileno o un alquilén éter de fórmula $(-CH_2)_n-O-CH_2-$ donde n = 1-6;
A es una unidad de ramificación;
X^3 representa una unidad de unión;
Z es un ácido nucleico;
y donde el enlace entre X^3 y Z es un fosfato o tiofosfato.

En la fórmula I, la unidad de ramificación "A" se ramifica en tres con el fin de acomodar los tres ligandos sacarídicos. La unidad de ramificación se une covalentemente a los ligandos atados y el ácido nucleico. La unidad de ramificación puede comprender un grupo alifático ramificado que comprenda grupos seleccionados entre grupos alquilo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter e hidroxiamino. La unidad de ramificación puede comprender grupos seleccionados entre grupos alquilo y éter.

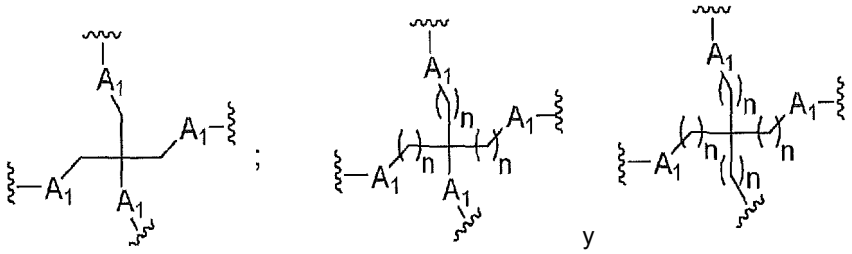
La unidad de ramificación A puede tener una estructura seleccionada entre:



y

en donde cada A_1 representa independientemente O, S, C=O o NH; y
cada n representa independientemente un número entero de 1 a 20.

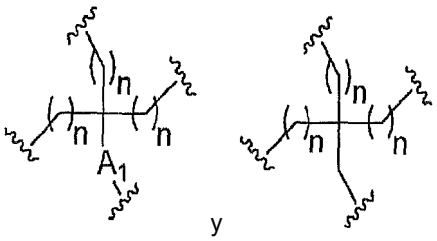
La unidad de ramificación puede tener una estructura seleccionada entre:



y

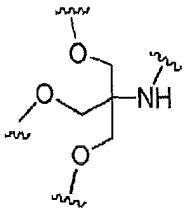
en donde cada A_1 representa independientemente O, S, C=O o NH; y
cada n representa independientemente un número entero de 1 a 20.

La unidad de ramificación puede tener una estructura seleccionada entre:

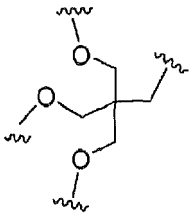


en donde A_1 es O, S, C=O o NH; y
cada n representa independientemente un número entero de 1 a 20.

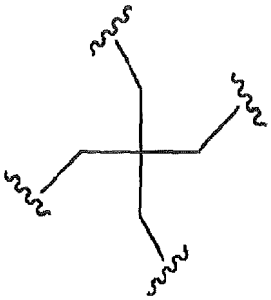
La unidad de ramificación puede tener la estructura:



La unidad de ramificación puede tener la estructura:



La unidad de ramificación puede tener la estructura:



Opcionalmente, la unidad de ramificación consiste en solo un átomo de carbono.

La porción "X^3" de los compuestos de fórmula I es una unidad de unión. X^3 también puede denominarse el enlazador de conjugado. La unidad de unión es lineal y se une covalentemente a la unidad de ramificación y el ácido nucleico.

X puede seleccionarse entre -alquilen C_1-C_{20}-, -alquenilen C_2-C_{20}-, un alquilén éter de fórmula -(alquilen C_1-C_{20})-O-(alquilen C_1-C_{20})-, -C(O)-alquilen C_1-C_{20}-, -alquilen C_0-C_4(Ci)alquilen C_0-C_4- en donde Ci representa un anillo cicloalquileno, arileno, heterociclileno o heteroarileno sustituido o sin sustituir de 5 o 6 miembros, -alquilen C_1-C_4-NHC(O)-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-C(O)NH-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-SC(O)-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-C(O)S-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-OC(O)-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-C(O)O-alquilen C_1-C_4- y -alquilen C_1-C_6-S-S-alquilen C_1-C_6-.

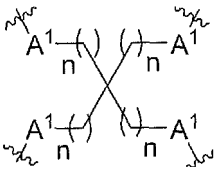
X^3 puede ser un alquilén éter de fórmula -(alquilen C_1-C_{20})-O-(alquilen C_1-C_{20})-. X^3 puede ser un alquilén éter de fórmula -(alquilen C_1-C_{20})-O-(alquilen C_4-C_{20})-, en donde dicho (alquileno C_4-C_{20}) se une a Z. X^3 puede seleccionarse entre el grupo que consiste en $-CH_2-O-C_3H_6-$, $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$, especialmente $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$, en donde en cada caso el grupo $-CH_2-$ se une a A.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (II):

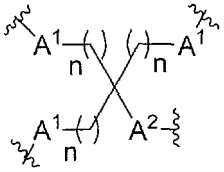
$$[S-X^1-P-X^2]_3-A-X^3-Z \qquad (II)$$

en donde:

S representa un sacárido;
X^1 representa alquileno C_3-C_6 o un tallo de etilenglicol $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3;
P es un tiofosfato;
X^2 es alquileno C_1-C_8;
A es una unidad de ramificación seleccionada entre:



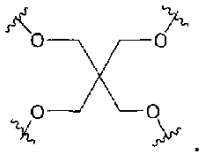
A^1 = O, NH
n = 1 a 4



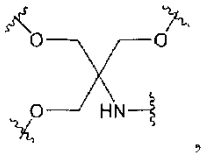
A^1 = O, NH A^2 = NH, CH_2, O
n = 1 a 4

X^3 es una unidad de unión;
Z es un ácido nucleico;
y donde el enlace entre X^3 y Z es un tiofosfato.

La unidad de ramificación A puede tener la estructura:



La unidad de ramificación A puede tener la estructura:



en donde X^3 se une al átomo de nitrógeno.

X^3 puede ser alquileno C_1-C_{20}. Preferentemente, X^3 se selecciona entre el grupo que consiste en $-C_3H_6-$, $-C_4H_8-$, $-C_6H_{12}-$ y $-C_8H_{16}-$, especialmente $-C_4H_8-$, $-C_6H_{12}-$ y $-C_8H_{16}-$.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (III):

$$[S-X^1-P-X^2]_3-A-X^3-Z \qquad (III)$$

en donde:

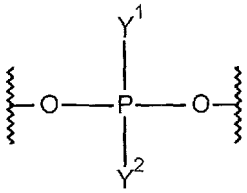
S representa un sacárido;
X^1 representa alquileno C_3-C_6 o un tallo de etilenglicol $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3; P es un tiofosfato;
X^2 es un alquilén éter de fórmula $-C_3H_6-O-CH_2-$;
A es una unidad de ramificación;
X^3 es un alquilén éter de fórmula seleccionada entre el grupo que consiste en $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-O-C_2H_4-$, $-CH_2-O-C_3H_6-$, $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_5H_{10}-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$, $-CH_2-O-C_7H_{14}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$, en donde en cada caso el grupo $-CH_2-$ se une a A,
Z es un ácido nucleico;

y en donde el enlace entre X^3 y Z es un fosfato o tiofosfato.

La unidad de ramificación puede comprender carbono. Preferentemente, la unidad de carbono es carbono.

X^3 puede seleccionarse entre el grupo que consiste en $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_5H_{10}-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$, $-CH_2-O-C_7H_{14}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$. Preferentemente, X^3 se selecciona entre el grupo que consiste en $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}$.

Un grupo fosfato modificado P de la presente divulgación puede representarse por:



en donde Y^1 e Y^2 representan cada uno independientemente =O, =S, $-O^-$, -OH, -SH, $-BH_3$, $-OCH_2CO_2$, $-OCH_2CO_2R^x$, $-OCH_2C(S)OR^x$ y $-OR^x$, en donde R^x representa alquilo C_1-C_6 y en donde

indica unión al resto del compuesto.

Por ejemplo, Y^1 puede representar -OH e Y^2 puede representar =O o =S; o
Y^1 puede representar $-O^-$ e Y^2 puede representar =O o =S;
Y^1 puede representar =O e Y^2 puede representar $-CH_3$, -SH, $-OR^x$ o $-BH_3$
Y^1 puede representar =S e Y^2 puede representar $-CH_3$, OR^x o -SH.

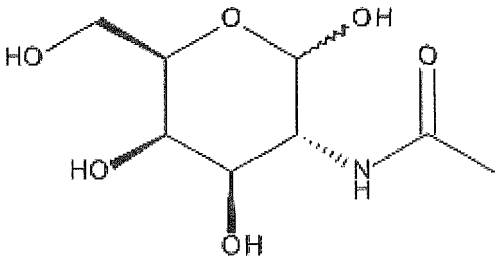
El experto en la materia comprenderá que en determinados casos habrá deslocalización entre Y^1 e Y^2.

En la presente invención, el grupo fosfato modificado es un grupo tiofosfato. Los grupos tiofosfato incluyen bitiofosfato (es decir, donde Y^1 representa =S e Y^2 representa $-S^-$) y monotiofosfato (es decir, donde Y^1 representa -O- e Y^2 representa =S, o donde Y^1 representa =O e Y^2 representa $-S^-$). Preferentemente, P es un monotiofosfato. Los inventores han descubierto que los conjugados que tienen grupos tiofosfato en reemplazo de los grupos fosfato tienen una potencia y duración de la acción *in vivo* mejoradas.

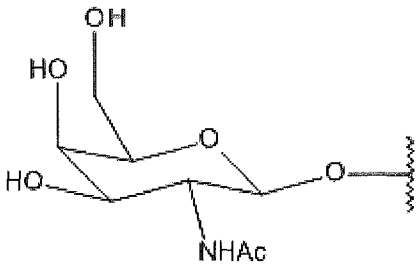
El sacárido, que también puede denominarse ligando, puede seleccionarse para que tenga una afinidad por al menos un tipo de receptor en una célula diana. En particular, el receptor está en la superficie de una célula hepática de mamífero, por ejemplo, el receptor hepático de asialoglucoproteína (ASGP-R).

Para cualquiera de los aspectos anteriores, el sacárido puede seleccionarse entre N-acetil galactosamina, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina y fructosa. Preferentemente, el sacárido es N-acetil galactosamina (GalNAc). Los compuestos de la invención tienen 3 ligandos que son cada uno preferentemente N-acetil galactosamina.

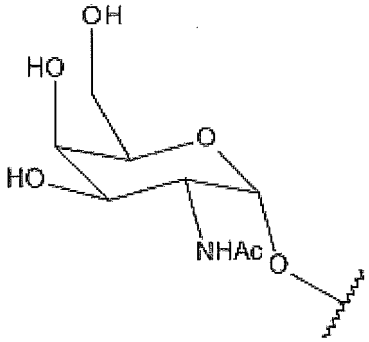
"GalNAc" se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa, habitualmente denominada en la bibliografía N-acetil galactosamina. La referencia a "GalNAc" o a "N-acetil galactosamina" incluye tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa. En determinadas realizaciones, tanto la forma β: 2-(Acetilarnino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa pueden usarse indistintamente. Preferentemente, los compuestos de la invención comprenden la forma β, 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa.



2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa



2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa



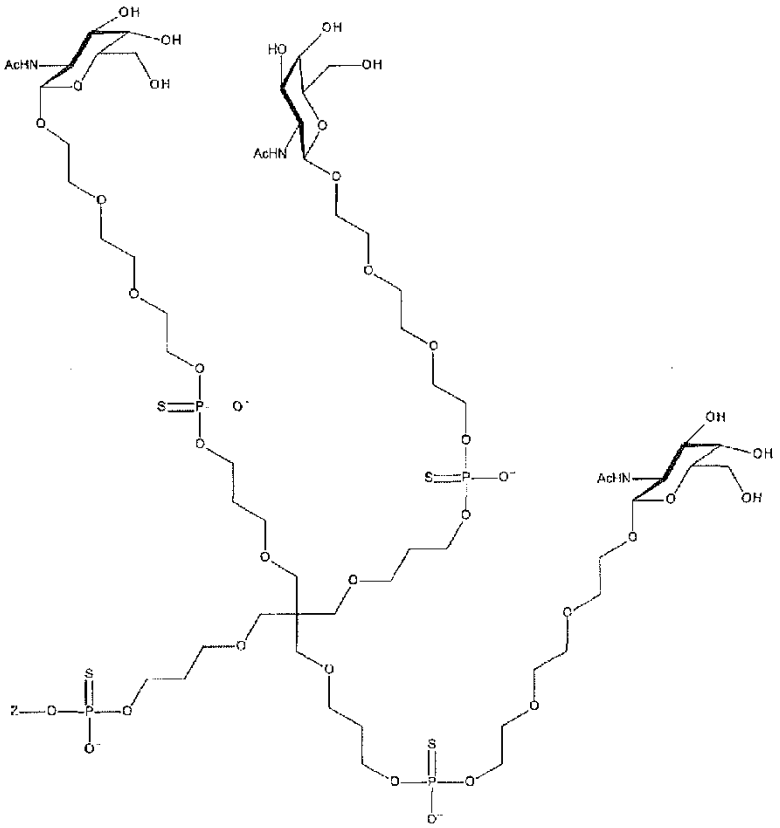
2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa

La porción "X^1-P-X^2" de los compuestos de la presente invención también puede denominarse la conexión o enlazador. El enlazador comprende un grupo lineal y se une covalentemente al ligando sacarídico y a la unidad de ramificación.

Para cualquiera de los aspectos anteriores, X^1 puede ser un tallo de etilenglicol ($-CH_2-CH_2-O_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3. X^1 puede ser $(-CH_2-CH_2-O)(-CH_2)_2-$. X^1 puede ser $(-CH_2-CH_2-O)_2(-CH_2)_2-$. X^1 puede ser $(-CH_2-CH_2-O)_3(-CH_2)_2-$. Preferentemente, X^1 es $(-CH_2-CH_2-O)_2(-CH_2)_2-$. Como alternativa, X^1 representa alquileno C_3-C_6. X^1 puede ser propileno. X^1 puede ser butileno. X^1 puede ser pentileno. X^1 puede ser hexileno. Preferentemente, el alquilo es un alquileno lineal. En particular, X^1 puede ser butileno.

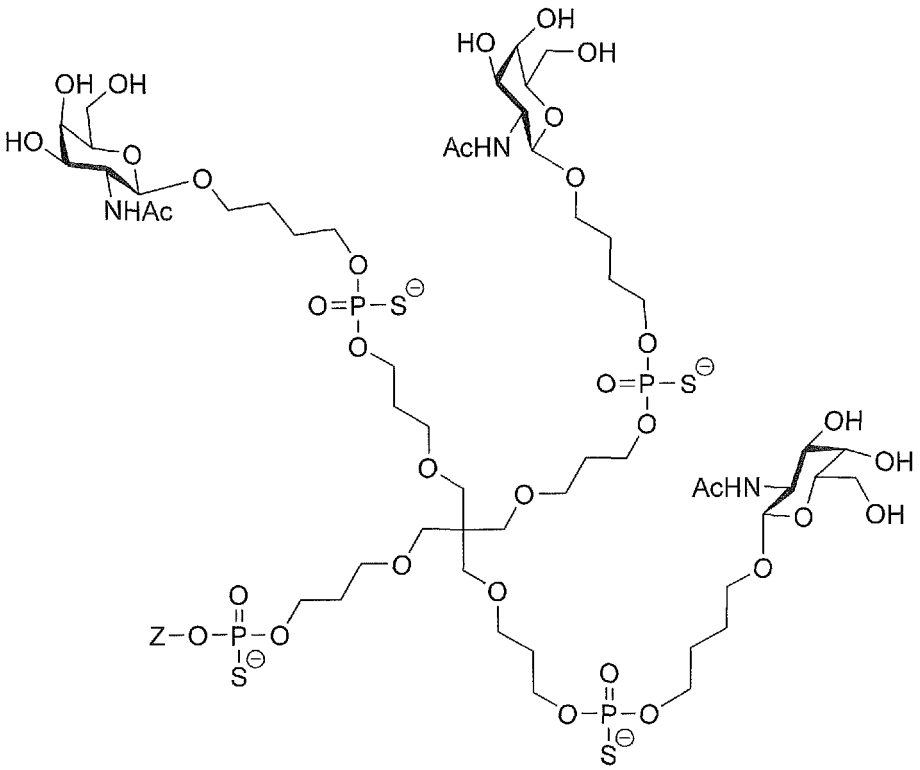
Para compuestos del tercer aspecto, X^2 representa un alquilén éter de fórmula $-C_3H_6-O-CH_2-$, es decir, alcoxi C_3-metileno o $-CH_2CH_2CH_2OCH_2-$.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado que tienen la estructura:



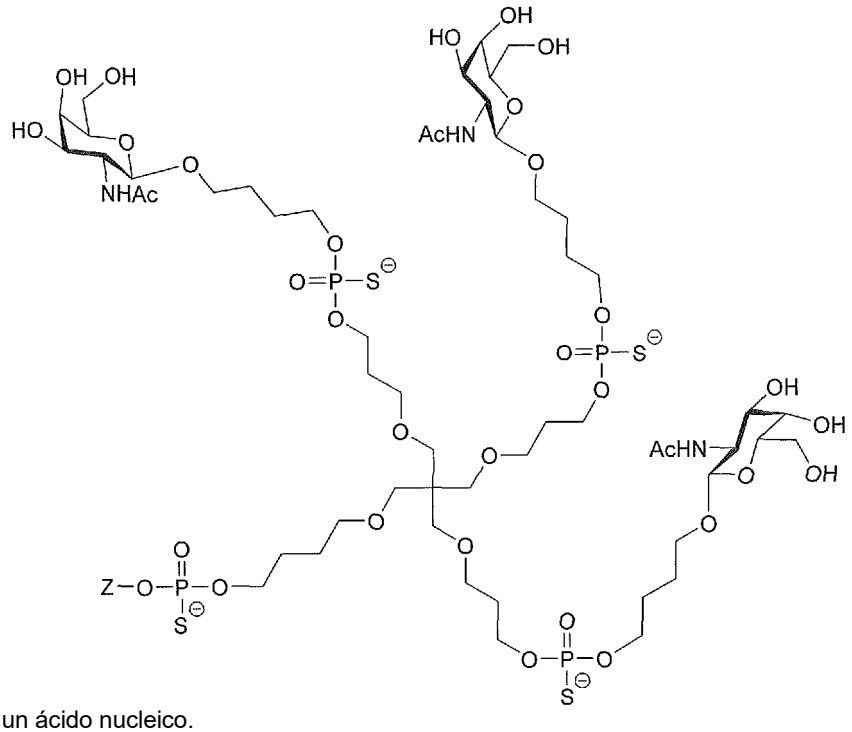
en donde Z es un ácido nucleico.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado que tienen la estructura:



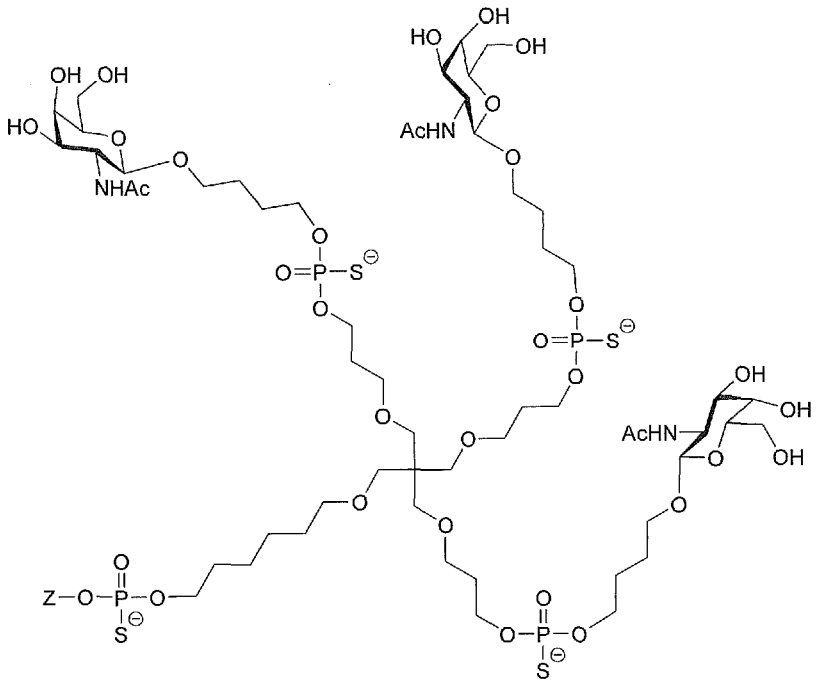
en donde Z es un ácido nucleico.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado que tienen la estructura:



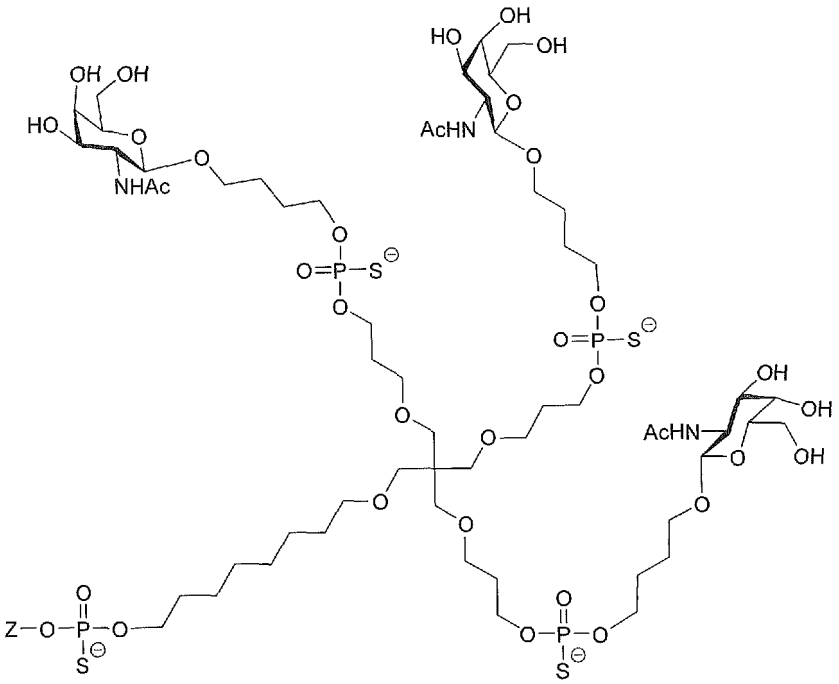
en donde Z es un ácido nucleico.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado que tienen la estructura:



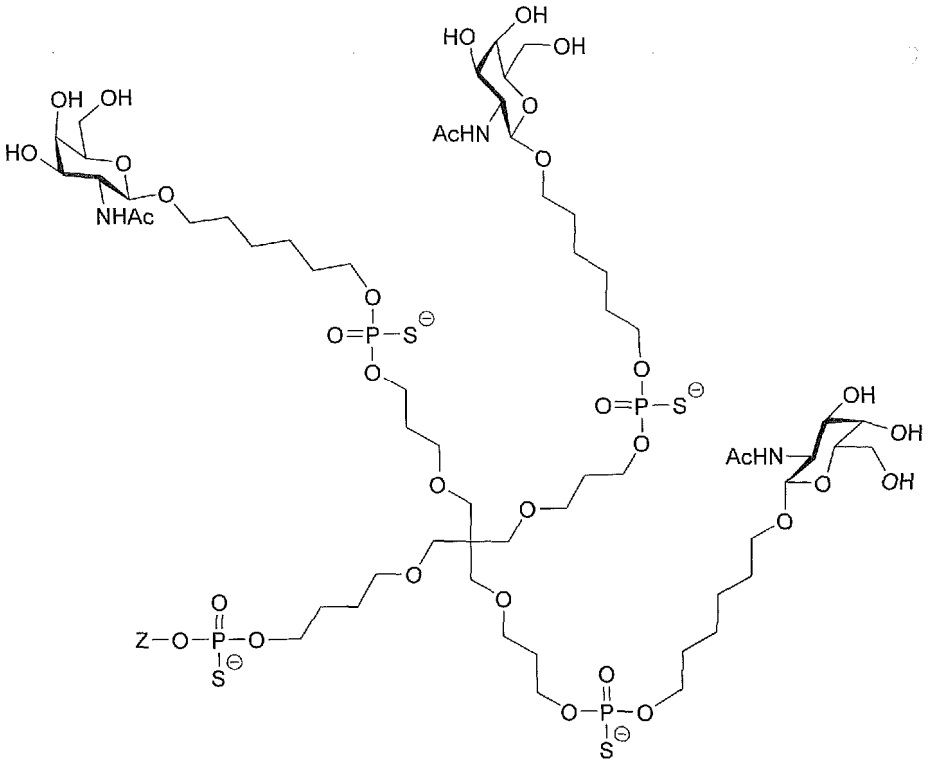
en donde Z es un ácido nucleico.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado que tienen la estructura:



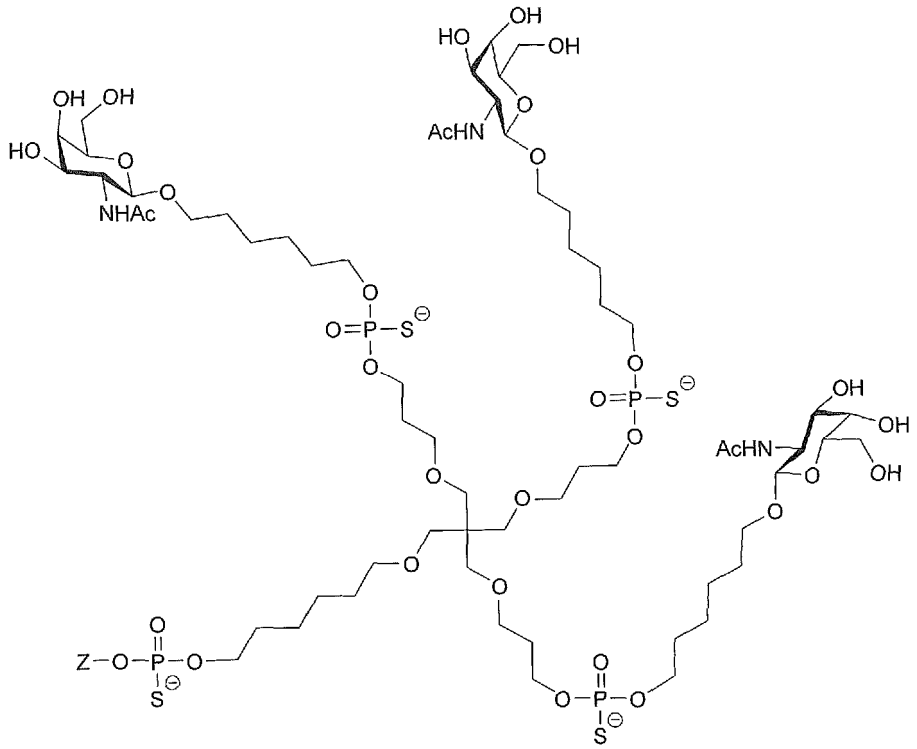
en donde Z es un ácido nucleico.

En un noveno aspecto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado que tienen la estructura:



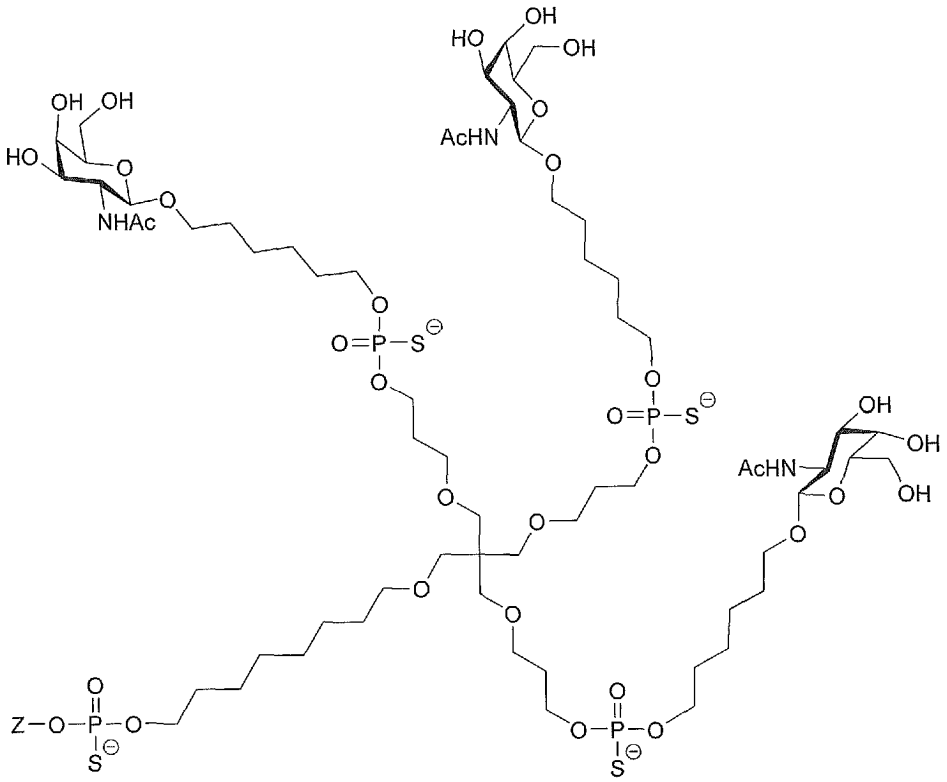
en donde Z es un ácido nucleico.

En un décimo aspecto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado que tienen la estructura:



en donde Z es un ácido nucleico.

En un undécimo aspecto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado que tienen la estructura:



en donde Z es un ácido nucleico.

En todos los casos que se describen en el presente documento, el ácido nucleico puede seleccionarse entre el grupo que consiste en ADN, ARN, ANP y ANB.

El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico funcional, por lo que preferentemente el ácido nucleico funcional se selecciona entre el grupo que consiste en ARNm, micro-ARN, ARNhc, combinaciones de ADN y ARN, ARNip, ANip,

ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegélmeros. En particular, el ácido nucleico puede ser ARNip.

El ácido nucleico puede seleccionarse entre ARNi, ARNip, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegélmeros.

Los ácidos nucleicos pueden tener cualquier longitud y pueden tener cualquier número de nucleótidos de manera que sean eficaces para el ARNi. Preferentemente, los ARNip varían de 15 a 30 nucleótidos. La región dúplex de un ARN bicatenario puede variar de 15 a 30 pares de bases nucleotídicas usando el apareamiento de bases de Watson-Crick. La región dúplex puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 pares de bases.

Preferentemente, el ácido nucleico tiene de 19 a 23 pares de bases. Por ejemplo, el ácido nucleico puede tener 19, 20, 21, 22 o 23 pares de bases de longitud.

Los ARNi bicatenarios pueden tener un extremo romo en un extremo o en ambos extremos. Los ARNi bicatenarios pueden tener salientes de 1 o más nucleótidos de una o ambas cadenas en uno o ambos extremos. Los salientes pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos n de longitud.

Para cualquiera de los aspectos anteriores, el ácido nucleico puede ser un ácido nucleico modificado. La modificación puede seleccionarse entre sustituciones o inserciones con análogos de ácidos nucleicos o bases y modificación química de la base, el azúcar o los restos fosfato.

El ácido nucleico puede: a) tener extremos romos en ambos extremos; b) tener un saliente en un extremo y un extremo romo en el otro; o c) tener un saliente en ambos extremos.

Puede modificarse uno o más nucleótidos en la cadena primera y/o segunda, para formar nucleótidos modificados. Puede modificarse uno o más de los nucleótidos impares de la primera cadena. Puede modificarse uno o más de los nucleótidos pares de la primera cadena mediante al menos una segunda modificación, en donde la al menos segunda modificación es diferente de la modificación en uno o más nucleótidos añadidos. Al menos uno de los uno o más nucleótidos pares modificados puede estar adyacente a al menos uno de los uno o más nucleótidos impares modificados.

Puede modificarse una pluralidad de nucleótidos impares en la primera cadena en el ácido nucleico de la invención. Una pluralidad de nucleótidos pares en la primera cadena puede modificarse mediante una segunda modificación. La primera cadena puede comprender nucleótidos adyacentes que se modifican mediante una modificación común. La primera cadena también puede comprender nucleótidos adyacentes que se modifican mediante una segunda modificación diferente.

Uno o más de los nucleótidos impares de la segunda cadena pueden modificarse mediante una modificación que sea diferente de la modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena y/o uno o más de los nucleótidos pares de la segunda cadena pueden modificarse mediante la misma modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena. Al menos uno de los uno o más nucleótidos pares modificados de la segunda cadena puede estar adyacente al uno o más nucleótidos impares modificados. Una pluralidad de nucleótidos impares de la segunda cadena puede modificarse mediante una modificación común y/o una pluralidad de nucleótidos pares puede modificarse mediante la misma modificación que está presente en los nucleótidos impares de la primera cadena. Una pluralidad de nucleótidos impares en la segunda cadena puede modificarse mediante una segunda modificación, en donde la segunda modificación es diferente de la modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena.

La segunda cadena comprende nucleótidos adyacentes que se modifican mediante una modificación común, que puede ser una segunda modificación que sea diferente de la modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena.

En el ácido nucleico de la invención, cada uno de los nucleótidos impares en la primera cadena y cada uno de los nucleótidos pares en la segunda cadena pueden modificarse con una modificación común y, cada uno de los nucleótidos pares puede modificarse en la primera cadena con una segunda modificación y cada uno de los nucleótidos impares puede modificarse en la segunda cadena con una segunda modificación diferente.

El ácido nucleico de la invención puede tener los nucleótidos modificados de la primera cadena desplazados por al menos un nucleótido con respecto a los nucleótidos sin modificar o modificados de manera diferente de la segunda cadena.

La modificación y/o modificaciones pueden seleccionarse cada una individualmente entre el grupo que consiste en desoxi timina terminal en 3', O metilo en 2', una modificación con desoxi en 2', una modificación con amino en 2', una modificación con alquilo en 2', una modificación con morfolino, una modificación con fosforamidato, una modificación con grupo 5'-fosforotioato, una modificación con fosfato en 5' o mimético de fosfato en 5' y un derivado de colesterilo o una modificación de grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico y/o el nucleótido modificado puede ser uno

cualquiera de entre un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico o una base no natural que comprende nucleótido. Al menos una modificación puede ser 2'-O-metilo y/o al menos una modificación puede ser 2'-F.

Por ácido nucleico se entiende un ácido nucleico que comprende dos cadenas que comprenden nucleótidos, que es capaz de interferir con la expresión génica. La inhibición puede ser completa o parcial y da como resultado la regulación negativa de la expresión génica de una manera dirigida. El ácido nucleico comprende dos cadenas de polinucleótidos separadas; la primera cadena, que también puede ser una cadena guía; y una segunda cadena, que también puede ser una cadena pasajero. La primera cadena y la segunda cadena pueden ser parte de la misma molécula polinucleotídica que es autocomplementaria y se 'pliega' para formar una molécula bicatenaria. El ácido nucleico puede ser una molécula de ARNip.

La primera cadena también puede denominarse cadena antisentido. La segunda cadena también puede denominarse cadena sentido.

El ácido nucleico puede comprender ribonucleótidos, ribonucleótidos modificados, desoxinucleótidos, desoxirribonucleótidos o nucleótidos análogos. El ácido nucleico puede comprender además una porción de ácido nucleico bicatenario o región dúplex formada por toda o una porción de la primera cadena (también conocida en la técnica como cadena guía) y toda o una parte de la segunda cadena (también conocida en la técnica como pasajero). La región dúplex se define como que comienza con el primer par de bases formado entre la primera cadena y la segunda cadena y termina con el último par de bases formado entre la primera cadena y la segunda cadena, ambos inclusive.

Por región dúplex se entiende la región en dos oligonucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios que forman pares de bases entre sí, ya sea mediante apareamiento de bases Watson-Crick o de cualquier otra manera que permita un dúplex entre cadenas oligonucleotídicas que sean complementarias o sustancialmente complementarias. Por ejemplo, una cadena de oligonucleótidos que tiene 21 unidades de nucleótidos puede emparejarse con otro oligonucleótido de 21 unidades de nucleótidos, aunque solo 19 nucleótidos en cada cadena son complementarios o sustancialmente complementarios, de manera que la "región dúplex" consiste en 19 pares de bases. Los pares de bases restantes pueden existir como salientes en 5' y 3', o como regiones monocatenarias. Además, dentro de la región dúplex, no se requiere el 100 % de complementariedad; se permite una complementariedad sustancial dentro de una región dúplex. Complementariedad sustancial se refiere a la complementariedad entre las cadenas de manera que sean capaces de hibridarse en condiciones biológicas. Se conocen bien en la materia técnicas para determinar empíricamente si dos cadenas son capaces de hibridarse en condiciones biológicas. Como alternativa, pueden sintetizarse dos cadenas y añadirse juntas en condiciones biológicas para determinar si se hibridan entre sí.

La porción de la primera cadena y la porción de la segunda cadena que forman al menos una región dúplex pueden ser totalmente complementarias y al menos parcialmente complementarias entre sí.

Dependiendo de la longitud de un ácido nucleico, no se requiere necesariamente un emparejamiento perfecto en términos de complementariedad de bases entre la primera cadena y la segunda cadena. Sin embargo, las cadenas primera y segunda deben ser capaces de hibridarse en condiciones fisiológicas.

La complementariedad entre la primera cadena y la segunda cadena en la al menos una región dúplex puede ser perfecta ya que no hay desemparejamientos de nucleótidos o nucleótidos adicionales/suprimidos en ninguna de las cadenas. Como alternativa, la complementariedad puede no ser perfecta. La complementariedad puede ser de al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

La primera cadena y la segunda cadena pueden comprender cada una región de complementariedad que comprenda al menos 15 nucleótidos contiguos que difieran en no más de 3 nucleótidos.

Un "saliente", como se usa en el presente documento, tiene su significado normal y habitual en la técnica, es decir, una porción monocatenaria de un ácido nucleico que se prolonga más allá del nucleótido terminal de una cadena complementaria en un ácido nucleico bicatenario. La expresión "extremo romo" incluye ácido nucleico bicatenario por el que ambas cadenas terminan en la misma posición, independientemente de si el nucleótido o los nucleótidos terminales se aparean por las bases. El nucleótido terminal de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden estar apareados por las bases. El nucleótido terminal de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden no estar apareados. Los dos nucleótidos terminales de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden estar apareados por las bases. Los dos nucleótidos terminales de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden no estar apareados.

El ácido nucleico puede tener un saliente en un extremo y un extremo romo en el otro. El ácido nucleico puede tener un saliente en ambos extremos. El ácido nucleico puede tener extremos romos en ambos extremos. El ácido nucleico puede tener extremos romos en el extremo con el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena o en el extremo 3' de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena.

El ácido nucleico puede comprender un saliente en un extremo 3' o 5'. El ácido nucleico puede tener un saliente en 3' en la primera cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 3' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 5' en la primera cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 5' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la primera cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 5' en la primera cadena y un saliente en 3' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 3' en la primera cadena y un saliente en 5' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 3' en la primera cadena y un saliente en 3' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 5' en la primera cadena y un saliente en 5' en la segunda cadena.

Un saliente en el extremo 3' o 5' de la segunda cadena o la primera cadena puede seleccionarse entre 1, 2, 3, 4 y 5 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, un saliente puede consistir en 1 o 2 nucleótidos, que pueden estar modificados o no.

Los polinucleótidos sin modificar, en particular los ribonucleótidos, pueden ser propensos a la degradación por nucleasas celulares, y, como tales, la modificación/nucleótidos modificados pueden incluirse en el ácido nucleico de la invención.

Puede modificarse uno o más nucleótidos en las cadenas segunda y/o primera del ácido nucleico de la invención.

Las modificaciones del ácido nucleico de la presente invención generalmente proporcionan una herramienta poderosa para superar limitaciones potenciales, incluyendo, pero sin limitación, la estabilidad *in vitro* e *in vivo*, y la biodisponibilidad inherente a las moléculas de ARN nativas. El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede modificarse mediante modificaciones químicas. El ácido nucleico modificado también puede minimizar la posibilidad de inducir actividad interferón en seres humanos. La modificación puede potenciar adicionalmente la administración funcional de un ácido nucleico a una célula diana. El ácido nucleico modificado de la presente invención puede comprender uno o más ribonucleótidos modificados químicamente de una o las dos de entre la primera cadena o la segunda cadena. Un ribonucleótido puede comprender una modificación química de la base, el azúcar o los restos fosfato. El ácido ribonucleico puede modificarse mediante sustitución o inserción con análogos de ácidos nucleicos o bases.

Puede modificarse uno o más nucleótidos de un ácido nucleico de la presente invención. El ácido nucleico puede comprender al menos un nucleótido modificado. El nucleótido modificado puede estar en la primera cadena. El nucleótido modificado puede estar en la segunda cadena. El nucleótido modificado puede estar en la región dúplex. El nucleótido modificado puede estar fuera de la región dúplex, es decir, en una región monocatenaria. El nucleótido modificado puede estar en la primera cadena y puede estar fuera de la región dúplex. El nucleótido modificado puede estar en la segunda cadena y puede estar fuera de la región dúplex. El nucleótido terminal en 3' de la primera cadena puede ser un nucleótido modificado. El nucleótido terminal en 3' de la segunda cadena puede ser un nucleótido modificado. El nucleótido terminal en 5' de la primera cadena puede ser un nucleótido modificado. El nucleótido terminal en 5' de la segunda cadena puede ser un nucleótido modificado.

Un ácido nucleico de la invención puede tener 1 nucleótido modificado o un ácido nucleico de la invención puede tener aproximadamente 2-4 nucleótidos modificados, o un ácido nucleico puede tener aproximadamente 4-6 nucleótidos modificados, aproximadamente 6-8 nucleótidos modificados, aproximadamente 8-10 nucleótidos modificados, aproximadamente 10-12 nucleótidos modificados, aproximadamente 12-14 nucleótidos modificados, aproximadamente 14-16 nucleótidos modificados, aproximadamente 16-18 nucleótidos modificados, aproximadamente 18-20 nucleótidos modificados, aproximadamente 20-22 nucleótidos modificados, aproximadamente 22-24 nucleótidos modificados, 24-26 nucleótidos modificados o aproximadamente 26-28 nucleótidos modificados. En cada caso, el ácido nucleico que comprende dichos nucleótidos modificados conserva al menos el 50 % de su actividad en comparación con el mismo ácido nucleico, pero sin dichos nucleótidos modificados. El ácido nucleico puede conservar el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % o más de su actividad en comparación con el mismo ácido nucleico, pero sin dichos nucleótidos modificados.

El nucleótido modificado puede ser una purina o una pirimidina. Al menos la mitad de las purinas pueden modificarse. Al menos la mitad de las pirimidinas pueden modificarse. Todas las purinas pueden modificarse. Todas las pirimidinas pueden modificarse. Los nucleótidos modificados pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en un nucleótido de desoxitimina (dT) terminal en 3', un nucleótido modificado con metilo O en 2', un nucleótido modificado en 2', un nucleótido modificado con desoxi en 2', un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado con amino en 2', un nucleótido modificado con alquilo en 2', un nucleótido de morfolino, un fosforoamidato, una base no natural que comprende nucleótido, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleótido que comprende un fosfato en 5' o mimético de fosfato de 5' y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o un grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico.

El ácido nucleico puede comprender un nucleótido que comprenda un nucleótido modificado, en donde la base se selecciona entre 2-aminoadenosina, 2,6-diaminopurina, inosina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metil uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitidina (por ejemplo, 5-metilcitidina),

5-alquiluridina (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidina (por ejemplo, 6-metiluridina), propina, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wybutosina, wybutoxosina, 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, beta-D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetiluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, beta-D-manosilqueosina, ácido uridina-5-oxiacético y 2-tiocitidina.

Los ácidos nucleicos que se analizan en el presente documento incluyen ARN sin modificar así como ARN que se han modificado, por ejemplo, para mejorar la eficacia, y polímeros de sustitutos de nucleósido. El ARN sin modificar se refiere a una molécula en la que los componentes del ácido nucleico, en concreto, azúcares, bases y restos fosfato, son iguales o esencialmente iguales a los que se producen en la naturaleza, por ejemplo, los que se producen de forma natural en el cuerpo humano. El nucleótido modificado como se usa en el presente documento se refiere a un nucleótido en el que uno o más de los componentes del ácido nucleico, en concreto, azúcares, bases y restos fosfato, son diferentes de los que se producen en la naturaleza. Aunque se les denomina nucleótidos modificados, incluirán, por supuesto, debido a la modificación, moléculas que no sean nucleótidos, por ejemplo, moléculas de polinucleótidos en las que la cadena principal de ribofosfato se reemplaza con una construcción sin ribofosfato que permite la hibridación entre cadenas, es decir, los nucleótidos modificados imitan la cadena principal de ribofosfato.

Muchas de las modificaciones que se describen a continuación que se producen dentro de un ácido nucleico se repetirán dentro de una molécula de polinucleótido, tal como una modificación de una base, un resto fosfato o el O no enlazante de un resto fosfato. En algunos casos, la modificación se producirá en todas las posiciones/nucleótidos posibles en el polinucleótido, pero en muchos casos no se producirá. Una modificación solo puede producirse en una posición terminal en 3' o 5', solo puede producirse en regiones terminales, tal como en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de una cadena. Una modificación puede producirse en una región bicatenaria, una región monocatenaria, o en ambas. Una modificación puede producirse solo en la región bicatenaria de un ácido nucleico de la invención o puede producirse solo en una región monocatenaria de un ácido nucleico de la invención. Una modificación con fosforotioato en una posición O no enlazante puede producirse solo en uno o en ambos extremos, puede producirse solo en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de un cadena, o puede producirse en regiones dúplex y/o monocatenarias, en particular en los extremos. El extremo 5' o los extremos 3' pueden estar fosforilados. La estabilidad de un ácido nucleico de la invención puede aumentarse incluyendo bases particulares en salientes, o incluir nucleótidos modificados, en salientes monocatenarios, por ejemplo, en un saliente en 5' o 3', o en ambos. Los nucleótidos de purina pueden incluirse en salientes. Todas o algunas de las bases en un saliente en 3' o 5' pueden modificarse. Las modificaciones pueden incluir el uso de modificaciones en el grupo OH en 2' del azúcar ribosa, el uso de desoxirribonucleótidos, en lugar de ribonucleótidos, y modificaciones en el grupo fosfato, tales como modificaciones de fosfotioato. No es necesario que los salientes sean homólogos con la secuencia diana.

Las nucleasas pueden hidrolizar enlaces fosfodiéster de ácido nucleico. Sin embargo, las modificaciones químicas de los ácidos nucleicos pueden conferir propiedades mejoradas, y, pueden hacer que los oligorribonucleótidos sean más estables a las nucleasas.

Los ácidos nucleicos modificados, como se usan en el presente documento, pueden incluir uno o más de:

(i) alteración, por ejemplo, reemplazo, de uno o los dos oxígenos de fosfato no enlazantes y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato enlazantes (denominados enlazantes incluso si están en el extremo 5' y 3' del ácido nucleico de la invención);
(ii) alteración, por ejemplo, reemplazo, de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del hidroxilo en 2' en el azúcar ribosa;
(iii) reemplazo del resto fosfato con "defosfo" enlazadores;
(iv) modificación o reemplazo de una base de origen natural;
(v) reemplazo o modificación de la cadena principal de ribosa-fosfato;
(vi) modificación del extremo 3' o del extremo 5' del ARN, por ejemplo, retirada, modificación o reemplazo de un grupo fosfato terminal o conjugación de un resto, por ejemplo, un resto marcado con fluorescencia, en el extremo 3' o 5' del ARN.

Los términos reemplazo, modificación, alteración, indican una diferencia con respecto a una molécula de origen natural.

Se analizan modificaciones específicas con más detalle a continuación.

Los ejemplos de grupos fosfato modificados en los ácidos nucleicos modificados incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, fosfatos de borano, ésteres de fosfato de borano, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no enlazantes reemplazados por azufre. Uno, cada uno, o los dos oxígenos no enlazantes en el grupo fosfato pueden ser independientemente uno cualquiera de S, Se, B, C, H, N u OR (R es alquilo o arilo).

El enlazador de fosfato también puede modificarse mediante reemplazo de un oxígeno enlazante con nitrógeno (fosfoamidatos unidos), azufre (fosforotioatos unidos) y carbono (fosfonatos de metileno unidos). El reemplazo puede producirse en un oxígeno terminal. Es posible reemplazar los oxígenos no enlazantes con nitrógeno.

Un nucleótido modificado puede incluir la modificación de los grupos azúcar. El grupo hidroxilo (OH) en 2' puede modificarse o reemplazarse con varios sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes.

Los ejemplos de modificaciones del grupo "oxi"-hidroxilo en 2' incluyen alcoxi o ariloxi (OR, por ejemplo, R=H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), O(CH2CH2O)nCH2CH2OR; ácidos nucleicos "bloqueados" (ANB) en los que el hidroxilo en 2' se conecta, por ejemplo, mediante una unión de metileno, con el carbono en 4' del mismo azúcar ribosa; O-AMINA (AMINA = NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) y aminoalcoxi, O(CH2)nAMINA, (por ejemplo, AMINA = NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino).

Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno halo; amino (por ejemplo, NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); NH(CH2CH2NH)nCH2CH2-AMINA (AMINA = NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino), -NHC(O)R (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquiltioalquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alquenilo y alquinilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos con, por ejemplo, una funcionalidad amino. Otros sustituyentes de determinadas realizaciones incluyen 2'-metoxietilo, 2'-OCH3, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo y 2'-fluoro.

El grupo azúcar también puede contener uno o más carbonos que posean la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en la ribosa. Por tanto, un nucleótido modificado puede contener un azúcar tal como arabinosa.

Los nucleótidos modificados también pueden incluir azúcares "abásicos", que carecen de una nucleobase en C-I'. Estos azúcares abásicos pueden contener además modificaciones en uno o más de los átomos de azúcar constituyentes.

Las modificaciones en 2' pueden usarse en combinación con una o más modificaciones del enlazador de fosfato (por ejemplo, fosforotioato).

El grupo fosfato puede reemplazarse por enlazadores que no contengan fósforo.

Los ejemplos de restos que pueden reemplazar el grupo fosfato incluyen siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, enlazador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilenmetilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo y metilenoximetilimino. En determinadas realizaciones, los reemplazos pueden incluir los grupos metilencarbonilamino y metilenmetilimino.

El enlazador de fosfato y el azúcar ribosa pueden reemplazarse por nucleótidos resistentes a nucleasas.

Los ejemplos incluyen los sustitutos de mofilino, ciclobutilo, pirrolidina y nucleósido de ácido nucleico peptídico (ANP). En determinadas realizaciones, pueden usarse sustitutos de ANP.

Los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido pueden modificarse. Dichas modificaciones pueden estar en el extremo 3' o el extremo 5' o en ambos extremos de la molécula. Pueden incluir la modificación o el reemplazo de un fosfato terminal completo o de uno o más de los átomos del grupo fosfato. Por ejemplo, los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido pueden conjugarse con otras entidades moleculares funcionales tales como restos de marcado, por ejemplo, fluoróforos (por ejemplo, pireno, TAMRA, fluoresceína, colorantes Cy3 o Cy5) o grupos protectores (basados, por ejemplo, en azufre, silicio, boro o éster). Las entidades moleculares funcionales pueden unirse al azúcar a través de un grupo fosfato y/o un enlazador. El átomo terminal del enlazador puede conectarse a o reemplazar el átomo de enlace del grupo fosfato o el grupo O, N, S o C C-3' o C-5' del azúcar. Como alternativa, el enlazador puede conectarse a o reemplazar el átomo terminal de un sustituto de nucleótido (por ejemplo, ANP). Estos espaciadores o enlazadores pueden incluir, por ejemplo, -(CH2)n-, -(CH2)nN-, -(CH2)nO-, -(CH2)nS-, O(CH2CH2O)nCH2CH2OH (por ejemplo, n = 3 o 6), azúcares abásicos, amida, carboxi, amina, oxiamina, oxiimina, tioéter, disulfuro, tiourea, sulfonamida, o morfolino, o reactivos de biotina y fluoresceína. El extremo 3' puede ser un grupo -OH.

Otros ejemplos de modificaciones terminales incluyen colorantes, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), reticulantes (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA), vehículos lipófilos (por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litiocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y

conjugados peptídicos (por ejemplo, péptido antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, grupos imidazol, conjugados acridina-imidazol, complejos Eu3+ de tetraazamacrociclos).

Pueden añadirse modificaciones terminales por una serie de razones, incluyendo modular la actividad o modular la resistencia a la degradación. Las modificaciones terminales útiles para modular la actividad incluyen la modificación del extremo 5' con fosfato o análogos de fosfato. Los ácidos nucleicos de la invención, en la primera o segunda cadena, pueden estar fosforilados en 5' o incluir un análogo de fosforilo en el extremo 5' prima. Las modificaciones con 5'-fosfato incluyen aquellas que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); protección de 5'-guanosina (7-metilada o no metilada) (7m-G-O-5'-(HO)(O)PO-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); protección de 5'-adenosina (Appp) y cualquier estructura de protección de nucleótido modificada o sin modificar (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosforotioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosforotiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional monofosfato difosfato y trifosfato reemplazados con oxígeno/azufre, (por ejemplo, 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrofosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R = alquilo = metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5'-, (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'vinilfosfonato, 5'-alquileterfosfonatos (R = alquileter = metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5'-).

El ácido nucleico de la presente invención puede incluir una o más modificaciones de fosforotioato en uno o más de los extremos terminales de la primera y/o la segunda cadena. Opcionalmente, cada uno o cualquiera de los extremos de la primera cadena puede comprender uno o dos o tres nucleótidos modificados con fosforotioato. Opcionalmente, cada uno de los extremos de la segunda cadena puede comprender uno o dos o tres nucleótidos modificados con fosforotioato. Opcionalmente, ambos extremos de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena pueden comprender dos nucleótidos modificados con fosforotioato. Por nucleótido modificado con fosforotioato se entiende que el enlace entre el nucleótido y el nucleótido adyacente comprende un grupo fosforotioato en lugar de un grupo fosfato convencional.

Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para controlar la distribución y en dichos casos los grupos que han de añadirse pueden incluir fluoróforos, por ejemplo, fluoresceína o un colorante Alexa. Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para potenciar la captación, las modificaciones útiles para esto incluyen el colesterol. Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para reticular un agente de ARN con otro resto.

Adenina, guanina, citosina y uracilo son las bases más comunes que se encuentran en el ARN. Estas bases pueden modificarse o reemplazarse para proporcionar ARN que tengan propiedades mejoradas. Por ejemplo, pueden prepararse oligorribonucleótidos resistentes a nucleasas con estas bases o con nucleobases sintéticas y naturales (por ejemplo, inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina o tubercidina) y una cualquiera de las modificaciones anteriores. Como alternativa, pueden emplearse análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases anteriores y "bases universales". Los ejemplos incluyen 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-amino alil uracilo, 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-deaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquil citosina, 7-desazaadenina, N6,N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-amino-alil-uracilo, N3-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N<4>-acetil citosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, N-metilguaninas o bases O-alquiladas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "análogo de nucleótido no apareado" significa un análogo de nucleótido que incluye un resto de apareamiento que no es una base que incluye, pero sin limitación: 6 des amino adenosina (Nebularina), 4-Me-indol, 3-nitropirrol, 5-nitroindol, Ds, Pa, N3-Me ribo U, N3-Me riboT, N3-Me dC, N3-Me-dT, N1-Me-dG, N1-Me-dA, N3-metil-dC, N3-Me dC. En algunas realizaciones, el análogo de nucleótido sin apareamiento por las bases es un ribonucleótido. En otras realizaciones es un desoxirribonucleótido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo funcional terminal" incluye, sin limitación, un grupo halógeno, alcohol, amina, carboxílico, éster, amida, aldehído, cetona y éter.

Determinados restos pueden estar unidos al extremo 5' de la primera cadena o la segunda cadena e incluyen un resto ribosa abásico, un resto desoxirribosa abásico, modificaciones de ribosa abásica y restos desoxirribosa abásicos que incluyen modificaciones con alquilo O en 2'; restos de ribosa abásica invertida y desoxirribosa abásica y modificaciones

de los mismos, C6-imino-Pi; un nucleótido espejo que incluye L-ADN y L-ARN; nucleótido de 5'OMe; y análogos de nucleótidos que incluyen nucleótido de 4',5'-metileno; 1-(β-D-eritrofuranosil)nucleótido; 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; fosfato de 5'-amino-alquilo; fosfato de 1,3-diamino-2-propilo, fosfato de 3-aminopropilo; fosfato de 6-aminohexilo; fosfato de 12-aminododecilo; fosfato de hidroxipropilo; nucleótido de 1,5-anhidrohexitol; alfa-nucleótido; nucleótido de treo-pentofuranosilo; 3',4'-seco nucleótido acíclico; nucleótido de 3,4-dihidroxibutilo; nucleótido de 3,5-dihidroxipentilo, resto abásico invertido 5'-5'; fosfato de 1,4-butanodiol; 5'-amino; y metilfosfonato de unión y no de unión y restos 5'-mercapto.
Los ácidos nucleicos de la invención pueden incluir uno o más nucleótidos invertidos, por ejemplo, timidina invertida o adenina invertida (por ejemplo, véase Takei, et al., 2002. *JBC* 277 (26):23 800-06).

Como se usa en el presente documento, el término "inhibir", "regular negativamente" o "reducir" con respecto a la expresión génica significa que la expresión del gen, o el nivel de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas (por ejemplo, ARNm), o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, se reducen por debajo de lo observado en ausencia de un ácido nucleico de la invención; por ejemplo, la expresión puede reducirse al 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o menos que la observada en ausencia de un inhibidor.

El ácido nucleico de la presente invención puede comprender un nucleótido abásico. El término "abásico", como se usa en el presente documento, se refiere a restos que carecen de una base o que tienen otros grupos químicos en lugar de una base en la posición 1', por ejemplo, un derivado de ribosa desoxiabásico unido 3',3' o unido 5',5'.

El ácido nucleico puede comprender uno o más nucleótidos en las cadenas segunda y/o primera que se modifican. Pueden modificarse nucleótidos alternos, para formar nucleótidos modificados.

Alternos como se describe en el presente documento significa que se produce uno tras otro de manera regular. En otras palabras, alternos significa se produce a su vez repetidamente. Por ejemplo, si se modifica un nucleótido, el siguiente nucleótido contiguo no se modifica y el siguiente nucleótido contiguo se modifica y así sucesivamente. Un nucleótido puede estar modificado con una primera modificación, el siguiente nucleótido contiguo puede modificarse con una segunda modificación y el siguiente nucleótido contiguo se modifica con la primera modificación y así sucesivamente, donde las modificaciones primera y segunda son diferentes.

Uno o más de los nucleótidos impares de la primera cadena del ácido nucleico de la invención pueden modificarse en donde la primera cadena se numera de 5' a 3'. El término "impar" como se describe en el presente documento significa un número no divisible por dos. Son ejemplos de números impares 1, 3, 5, 7, 9, 11 y así sucesivamente. Uno o más de los nucleótidos pares de la primera cadena del ácido nucleico de la invención pueden modificarse, en donde la primera cadena se numera de 5' a 3'. El término "par" como se describe en el presente documento significa un número que es divisible uniformemente por dos. Son ejemplos de números pares 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y así sucesivamente. Uno o más de los nucleótidos impares de la segunda cadena del ácido nucleico de la invención pueden modificarse en donde la segunda cadena se numera de 3' a 5'. Uno o más de los nucleótidos pares de la segunda cadena del ácido nucleico de la invención pueden modificarse, en donde la segunda cadena se numera de 3' a 5'.

Puede modificarse uno o más nucleótidos en la cadena primera y/o segunda, para formar nucleótidos modificados. Puede modificarse uno o más de los nucleótidos impares de la primera cadena. Puede modificarse uno o más de los nucleótidos pares de la primera cadena mediante al menos una segunda modificación, en donde la al menos segunda modificación es diferente de la modificación en uno o más nucleótidos añadidos. Al menos uno de los uno o más nucleótidos pares modificados puede estar adyacente a al menos uno de los uno o más nucleótidos impares modificados.

Puede modificarse una pluralidad de nucleótidos impares en la primera cadena en el ácido nucleico de la invención. Una pluralidad de nucleótidos pares en la primera cadena puede modificarse mediante una segunda modificación. La primera cadena puede comprender nucleótidos adyacentes que se modifican mediante una modificación común. La primera cadena también puede comprender nucleótidos adyacentes que se modifican mediante una segunda modificación diferente.

Uno o más de los nucleótidos impares de la segunda cadena pueden modificarse mediante una modificación que sea diferente de la modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena y/o uno o más de los nucleótidos pares de la segunda cadena pueden modificarse mediante la misma modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena. Al menos uno de los uno o más nucleótidos pares modificados de la segunda cadena puede estar adyacente al uno o más nucleótidos impares modificados. Una pluralidad de nucleótidos impares de la segunda cadena puede modificarse mediante una modificación común y/o una pluralidad de nucleótidos pares puede modificarse mediante la misma modificación que está presente en los nucleótidos impares de la primera cadena. Una pluralidad de nucleótidos impares en la segunda cadena puede modificarse mediante una segunda modificación, en donde la segunda modificación es diferente de la modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena.

La segunda cadena puede comprender nucleótidos adyacentes que se modifican mediante una modificación común, que puede ser una segunda modificación que sea diferente de la modificación de los nucleótidos impares de la primera

cadena.

En el ácido nucleico de la invención, cada uno de los nucleótidos impares en la primera cadena y cada uno de los nucleótidos pares en la segunda cadena pueden modificarse con una modificación común y, cada uno de los nucleótidos pares puede modificarse en la primera cadena con una segunda modificación y cada uno de los nucleótidos impares puede modificarse en la segunda cadena con la segunda modificación.

El ácido nucleico de la invención puede tener los nucleótidos modificados de la primera cadena desplazados por al menos un nucleótido con respecto a los nucleótidos sin modificar o modificados de manera diferente de la segunda cadena.

Uno o más o cada uno de los nucleótidos impares pueden modificarse en la primera cadena y uno o más o cada uno de los nucleótidos pares pueden modificarse en la segunda cadena. Uno o más o cada uno de los nucleótidos alternos en una de las dos o las dos cadenas pueden modificarse mediante una segunda modificación. Uno o más o cada uno de los nucleótidos pares pueden modificarse en la primera cadena y uno o más o cada uno de los nucleótidos pares pueden modificarse en la segunda cadena. Uno o más o cada uno de los nucleótidos alternos en una de las dos o las dos cadenas pueden modificarse mediante una segunda modificación. Uno o más o cada uno de los nucleótidos impares pueden modificarse en la primera cadena y uno o más de los nucleótidos impares pueden modificarse en la segunda cadena mediante una modificación común. Uno o más o cada uno de los nucleótidos alternos en una de las dos o las dos cadenas pueden modificarse mediante una segunda modificación. Uno o más o cada uno de los nucleótidos pares pueden modificarse en la primera cadena y uno o más o cada uno de los nucleótidos impares pueden modificarse en la segunda cadena mediante una modificación común. Uno o más o cada uno de los nucleótidos alternos en una de las dos o las dos cadenas pueden modificarse mediante una segunda modificación.

En un duodécimo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores y un vehículo o excipiente adecuado.

En un decimotercer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de los aspectos primero a undécimo o una composición de acuerdo con el duodécimo aspecto para su uso en medicina.

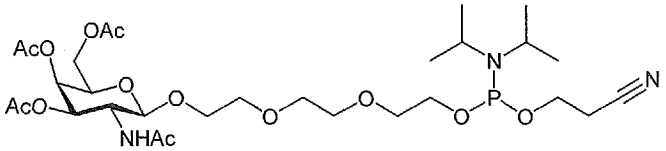
El compuesto o composición puede ser para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas, enfermedades genéticas, hemofilia y trastornos hemorrágicos, fibrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), hepatitis vírica, enfermedades raras (por ejemplo, acromegalia), enfermedades metabólicas (por ejemplo, hipercolesterolemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia), enfermedades cardiovasculares, obesidad, talasemia, daño hepático (por ejemplo, daño hepático inducido por fármacos), hemocromatosis, enfermedades hepáticas alcohólicas, dependencia del alcohol, anemia y anemia por enfermedades crónicas.

El compuesto o composición puede ser para su uso en el tratamiento de enfermedad hepática, anemia, enfermedades crónicas, talasemia; daño hepático inducido por fármacos, hemocromatosis y anemia por enfermedad crónica.

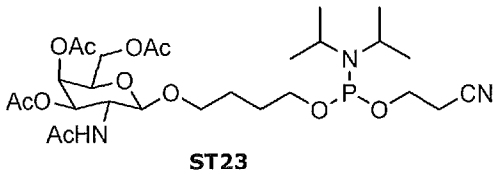
En un decimocuarto aspecto, la presente invención proporciona un método de administración de ácidos nucleicos a hepatocitos que comprende poner en contacto el hepatocito con un compuesto de acuerdo con cualquiera de los aspectos primero a undécimo.

En un decimoquinto aspecto, la presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), de acuerdo con cualquiera de los aspectos primero a undécimo, comprendiendo el proceso sumar cada componente para formar el compuesto de fórmula (I), (II) o (III).

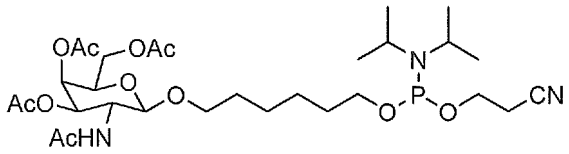
Pueden usarse componentes básicos de las siguientes estructuras en el método de fabricación:



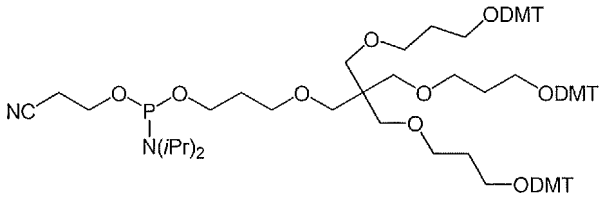
ST21



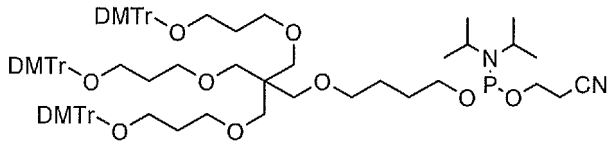
ST23



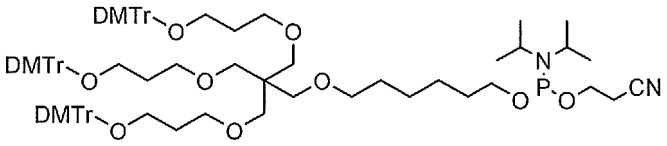
ST31



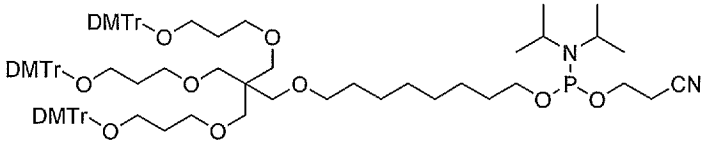
STKS



ST41



ST43



ST45

en donde DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr).

Modificaciones de ARN

Las modificaciones de las moléculas de ARNip de la presente invención generalmente proporcionan una herramienta poderosa para superar limitaciones potenciales, incluyendo, pero sin limitación, la estabilidad *in vitro* e *in vivo*, y la biodisponibilidad inherente a las moléculas de ARN nativas. El ARNip de acuerdo con la invención puede modificarse mediante modificaciones químicas. El ARNip modificado también puede minimizar la posibilidad de activar la actividad interferón en seres humanos. La modificación puede potenciar adicionalmente la administración funcional de un ARNip a una célula diana. El ARNip modificado de la presente invención puede comprender uno o más ribonucleótidos modificados químicamente de una o las dos de entre la cadena antisentido o la cadena sentido. Un ribonucleótido puede comprender una modificación química de la base, el azúcar o los restos fosfato. El ácido ribonucleico puede modificarse mediante sustitución o inserción con análogos de ácidos nucleicos o bases.

Uno o más nucleótidos de un ARNip de la presente invención pueden comprender una base modificada. En un aspecto,

el ARNip comprende al menos un nucleótido que comprende una base modificada. En una realización, la base modificada se encuentra en la cadena antisentido. En otra realización, la base modificada se encuentra en la cadena sentido. En otra realización, la base modificada se encuentra en la región dúplex. En otra realización, la base modificada se encuentra fuera de la región dúplex, es decir, en una región monocatenaria. En otra realización, la base modificada se encuentra en la cadena antisentido y está fuera de la región dúplex. En otra realización, la base modificada se encuentra en la cadena sentido y está fuera de la región dúplex. En otra realización, el nucleótido terminal en 3' de la cadena antisentido es un nucleótido con una base modificada. En otra realización, el nucleótido terminal en 3' de la cadena sentido es un nucleótido con una base modificada. En otra realización, el nucleótido terminal en 5' de la cadena antisentido es un nucleótido con una base modificada. En otra realización, el nucleótido terminal en 5' de la cadena sentido es un nucleótido con una base modificada.

En una realización, un ARNip puede tener 1 base modificada. En otra realización, un ARNip puede tener aproximadamente 2-4 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 4-6 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 6-8 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 8-10 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 10-12 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 12-14 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 14-16 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 16-18 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 18-20 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 20-22 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 22-24 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 24-26 bases modificadas. En otra realización, un ARNip tiene aproximadamente 26-28 bases modificadas. En cada caso, el ARNip que comprende dichas bases modificadas conserva al menos el 50 % de su actividad en comparación con el mismo ARNip, pero sin dichas bases modificadas. La base modificada puede ser una purina o una pirimidina. En otra realización, al menos la mitad de las purinas se modifican. En otra realización, al menos la mitad de las pirimidinas se modifican. En otra realización, todas las purinas se modifican. En otra realización, todas las pirimidinas se modifican. En otra realización, el ARNip puede comprender un nucleótido que comprenda una base modificada, en donde la base se selecciona entre 2-aminoadenosina, 2,6-diaminopurina, inosina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metil uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitidina (por ejemplo, 5-metilcitidina), 5-alquiluridina (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidina (por ejemplo, 6-metiluridina), propina, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wybutosina, wybutoxosina, 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, beta-D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetiluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, beta-D-manosilqueosina, ácido uridina-5-oxiacético y 2-tiocitidina.

En otro aspecto, un ARNip de la presente invención comprende un nucleótido abásico. El término "abásico", como se usa en el presente documento, se refiere a restos que carecen de una base o que tienen otros grupos químicos en lugar de una base en la posición 1', por ejemplo, un derivado de ribosa desoxiabásico unido 3',3' o unido 5',5'. Como se usa en el presente documento, un nucleótido con una base modificada no incluye nucleótidos abásicos. En un aspecto, el ARNip comprende al menos un nucleótido abásico. En una realización, el nucleótido abásico se encuentra en la cadena antisentido. En otra realización, el nucleótido abásico se encuentra en la cadena sentido. En otra realización, el nucleótido abásico se encuentra en la región dúplex. En otra realización, el nucleótido abásico se encuentra fuera de la región dúplex. En otra realización, el nucleótido abásico se encuentra en la cadena antisentido y se encuentra fuera de la región dúplex. En otra realización, el nucleótido abásico se encuentra en la cadena sentido y se encuentra fuera de la región dúplex. En otra realización, el nucleótido terminal en 3' de la cadena antisentido es un nucleótido abásico. En otra realización, el nucleótido terminal en 3' de la cadena sentido es un nucleótido abásico. En otra realización, el nucleótido terminal en 5' de la cadena antisentido es un nucleótido abásico. En otra realización, el nucleótido terminal en 5' de la cadena sentido es un nucleótido abásico. En otra realización, un ARNip tiene un número de nucleótidos abásicos seleccionados entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Modificaciones del resto azúcar

Otro aspecto se refiere a modificaciones de un resto azúcar. Uno o más nucleótidos de un ARNip de la presente invención pueden comprender un resto ribosa modificado. Las modificaciones en la posición 2' donde el 2'-OH está sustituido incluyen los ejemplos no limitantes seleccionados entre alquilo, alquilo sustituido, alcarilo-, arilalquilo-, -F, -Cl, -Br, -CN, -CF3, -OCF3, -OCN, -O-alquilo, -S-alquilo, HS-alquil-O, -O-alquenilo, -S-alquenilo, -N-alquenilo, -SO-alquilo, -alquil-OSH, -alquil-OH, -O-alquil-OH, -O-alquil-SH, -S-alquil-OH, -S-alquil-SH, -alquil-S-alquilo, -alquil-O-alquilo, -ON02, -N02, -N3, -NH2, alquilamino, dialquilamino-, aminoalquil-, aminoalcoxi, aminoácido, aminoacil-, -ONH2, -O-aminoalquilo, -O-aminoácido, -
O-aminoacilo, heterocicloalquil-, heterocicloalcaril-, aminoalquilamino-, polialquilamino-, silil- sustituido, metoxietil-(MOE), alquenilo y alquinilo. Los acidos nucleicos "bloqueados" (ANB) en los que el hidroxilo en 2' se conecta, por ejemplo, mediante una unión de metileno, con el carbono en 4' del mismo azúcar ribosa se incluyen adicionalmente como una modificación en 2' de la presente invención. Son sustituyentes preferidos 2'-metoxietilo, 2'-O-CH3, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo y 2'-fluoro.

En una realización, el ARNip comprende 1-5 nucleótidos modificados en 2'. En otra realización, el ARNip comprende 5-10 nucleótidos modificados en 2'. En otra realización, el ARNip comprende 15-20 nucleótidos modificados en 2'. En otra realización, el ARNip comprende 20-25 nucleótidos modificados en 2'. En otra realización, el ARNip comprende 25-30 nucleótidos modificados en 2'.

En una realización, el ARNip comprende 1-5 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3. En otra realización, el ARNip comprende 5-10 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3. En otra realización, el ARNip comprende 15-20 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3. En otra realización, el ARNip comprende 20-25 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3. En otra realización, el ARNip comprende 25-30 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3.

En una realización, la región dúplex de ARNip comprende 1-5 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3. En otra realización, la región dúplex de ARNip comprende 5-10 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3. En otra realización, la región dúplex de ARNip comprende 15-20 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3. En otra realización, la región dúplex de ARNip comprende 20-25 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3. En otra realización, la región dúplex de ARNip comprende 25-30 nucleótidos modificados con 2'-O-CH3.

En una realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 19 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 19 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'. En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 20 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 20 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'.

En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 21 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 21 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'. En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 22 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 22 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'. En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 23 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 23 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'.

En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 18-23 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 18-23 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'. En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 18-23 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 18-23 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 5, 7, 9, 11, 13 y 15 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 6, 8, 10, 12 y 14, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'. En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 18-23 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 18-23 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 7, 9, 11, 13 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 8, 10 y 12, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'. En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 18-23 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 18-23 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 7, 9 y 11 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 8, 10 y 12, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'. En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 18-23 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 18-23 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 7 y 9 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 8 y 10, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'. En otra realización, el ARNip comprende una cadena antisentido de 18-23 nucleótidos de longitud y una cadena sentido de 18-23 nucleótidos de longitud, en donde dicha cadena antisentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 9 y 11 y en donde dicha cadena sentido comprende modificaciones 2'-O-CH3 en los nucleótidos 8 y 10, en donde dicha cadena antisentido se numera de 5'-3' y dicha cadena sentido se numera de 3'-5'.

Patrón

En un aspecto, la región dúplex antisentido comprende una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados, denominados en el presente documento "grupos modificados", en donde cada grupo modificado consiste en uno o más nucleótidos idénticamente modificados, en donde cada grupo modificado está flanqueado en uno o ambos lados por un segundo grupo de nucleótidos, denominados en el presente documento "grupos flanqueantes", en donde cada grupo flanqueante consiste en uno o más nucleótidos que están sin modificar o modificados de una manera diferente con respecto a los nucleótidos de dicho grupo modificado. En una realización, cada grupo modificado en la región dúplex antisentido es idéntico, es decir, cada grupo modificado consiste en un número igual de nucleótidos idénticamente modificados. En otra realización, cada grupo flanqueante tiene un número igual de nucleótidos. En otra realización, cada grupo flanqueante es idéntico. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la región dúplex antisentido comprenden una base modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados comprenden una cadena principal de fosfato modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados comprenden una posición *2* modificada.

En otro aspecto, la región dúplex sentido comprende una pluralidad de grupos de grupos modificados, en donde cada grupo modificado consiste en uno o más nucleótidos idénticamente modificados, en donde cada grupo modificado está flanqueado en uno o ambos lados por un grupo flanqueante, en donde cada grupo flanqueante consiste en uno o más nucleótidos que están sin modificar o modificados de una manera diferente con respecto a los nucleótidos de dicho grupo modificado. En una realización, cada grupo modificado en la región dúplex sentido es idéntico. En otra realización, cada grupo flanqueante tiene un número igual de nucleótidos. En otra realización, cada grupo flanqueante es idéntico. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la región dúplex sentido comprenden una base modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados comprenden una cadena principal de fosfato modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados comprenden una posición 2' modificada.

En otro aspecto, la región dúplex antisentido y la región dúplex sentido comprenden cada una pluralidad de grupos modificados, en donde cada grupo modificado consiste en uno o más nucleótidos idénticamente modificados, en donde cada grupo modificado está flanqueado en uno o ambos lados por un grupo flanqueante, en donde cada grupo flanqueante consiste en uno o más nucleótidos que están sin modificar o modificados de una manera diferente con respecto a los nucleótidos de dicho grupo modificado. En una realización, cada grupo modificado en la región dúplex antisentido y la región dúplex sentido es idéntico. En otra realización, cada grupo flanqueante en la región dúplex antisentido y la región dúplex sentido tiene cada uno un número igual de nucleótidos. En otra realización, cada grupo flanqueante en la región dúplex antisentido y en la región dúplex sentido es idéntico. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la región dúplex antisentido y la región dúplex sentido comprenden cada uno los mismos grupos modificados y los mismos grupos flanqueantes. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la región dúplex antisentido y la región dúplex sentido comprenden cada uno una base modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la región dúplex antisentido y la región dúplex sentido comprenden cada uno una cadena principal de fosfato modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la región dúplex antisentido y la región dúplex sentido comprenden cada uno una posición *2* modificada.

En un aspecto, la cadena antisentido comprende una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados, denominados en el presente documento "grupos modificados", en donde cada grupo modificado consiste en uno o más nucleótidos idénticamente modificados, en donde cada grupo modificado está flanqueado en uno o ambos lados por un segundo grupo de nucleótidos, denominados en el presente documento "grupos flanqueantes", en donde cada grupo flanqueante consiste en uno o más nucleótidos que están sin modificar o modificados de una manera diferente con respecto a los nucleótidos de dicho grupo modificado. En una realización, cada grupo modificado en la cadena antisentido es idéntico, es decir, cada grupo modificado consiste en un número igual de nucleótidos idénticamente modificados. En otra realización, cada grupo flanqueante tiene un número igual de nucleótidos. En otra realización, cada grupo flanqueante es idéntico. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la cadena antisentido comprenden una base modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados comprenden una cadena principal de fosfato modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados comprenden una posición *2* modificada.

En otro aspecto, la cadena sentido comprende una pluralidad de grupos de grupos modificados, en donde cada grupo modificado consiste en uno o más nucleótidos idénticamente modificados, en donde cada grupo modificado está flanqueado en uno o ambos lados por un grupo flanqueante, en donde cada grupo flanqueante consiste en uno o más nucleótidos que están sin modificar o modificados de una manera diferente con respecto a los nucleótidos de dicho grupo modificado. En una realización, cada grupo modificado en la cadena sentido es idéntico. En otra realización, cada grupo flanqueante tiene un número igual de nucleótidos. En otra realización, cada grupo flanqueante es idéntico. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la cadena sentido comprenden una base modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados comprenden una cadena principal de fosfato modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados comprenden una posición 2' modificada.

En otro aspecto, la cadena antisentido y la cadena sentido comprenden cada una pluralidad de grupos modificados,

en donde cada grupo modificado consiste en uno o más nucleótidos idénticamente modificados, en donde cada grupo modificado está flanqueado en uno o ambos lados por un grupo flanqueante, en donde cada grupo flanqueante consiste en uno o más nucleótidos que están sin modificar o modificados de una manera diferente con respecto a los nucleótidos de dicho grupo modificado. En una realización, cada grupo modificado en la cadena antisentido y la cadena sentido es idéntico. En otra realización, cada grupo flanqueante en la cadena antisentido y la cadena sentido tiene cada uno un número igual de nucleótidos. En otra realización, cada grupo flanqueante en la cadena antisentido y en la cadena sentido es idéntico. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la cadena antisentido y la cadena sentido comprenden cada uno los mismos grupos modificados y los mismos grupos flanqueantes. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la cadena antisentido y la cadena sentido comprenden cada uno una base modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la cadena antisentido y la cadena sentido comprenden cada uno una cadena principal de fosfato modificada. En otra realización, los nucleótidos de dichos grupos modificados en la cadena antisentido y la cadena sentido comprenden cada uno una posición 2' modificada.

En otro aspecto, los grupos modificados y los grupos flanqueantes forman un patrón regular en la cadena antisentido. En otro aspecto, los grupos modificados y los grupos flanqueantes forman un patrón regular en la cadena sentido. En una realización, los grupos modificados y los grupos flanqueantes forman un patrón regular tanto en la cadena antisentido como en la cadena sentido. En otra realización, los grupos modificados y los grupos flanqueantes forman un patrón regular en la región dúplex antisentido. En otro aspecto, los grupos modificados y los grupos flanqueantes forman un patrón regular en la región dúplex sentido. En una realización, los grupos modificados y los grupos flanqueantes forman un patrón regular tanto en la región dúplex antisentido como en la región dúplex sentido.

En otro aspecto, el patrón es un patrón espacial o posicional. Un patrón espacial o posicional significa que (a) los nucleótidos se modifican dependiendo de su posición dentro de la secuencia de nucleótidos de una porción bicatenaria. En consecuencia, no importa si el nucleótido que ha de modificarse es una pirimidina o una purina. Más bien, la posición de un nucleótido modificado depende de: (a) su posición numerada en una cadena de ácido nucleico, en donde los nucleótidos se numeran del extremo 5' al extremo 3' estando el nucleótido del extremo 5' de la cadena en la posición uno (tanto la cadena antisentido como la cadena sentido se numeran desde sus respectivos nucleótidos del extremo 5'), o (b) la posición del grupo modificado con respecto a un grupo flanqueante. Por tanto, de acuerdo con la presente realización, el patrón de modificación siempre será el mismo, independientemente de la secuencia que ha de modificarse.

En una realización, cada grupo modificado tanto en la cadena antisentido como en la cadena sentido es idéntico. En una realización, cada grupo modificado tanto en la región dúplex antisentido como en la región dúplex sentido es idéntico. En otra realización, cada grupo modificado y cada grupo flanqueante tanto en la cadena antisentido como en la cadena sentido son idénticos. En una realización, cada grupo modificado y cada grupo flanqueante tanto en la región dúplex antisentido como en la región dúplex sentido son idénticos.

En una realización, cada grupo modificado, cada posición de grupo modificado, cada grupo flanqueante y cada posición de grupo flanqueante tanto en la cadena antisentido como en la cadena sentido son idénticas. En una realización, cada grupo modificado, cada posición de grupo modificado, cada grupo flanqueante y cada posición de grupo flanqueante tanto en la región dúplex antisentido como en la región dúplex sentido son idénticos. En otra realización, los grupos modificados en la cadena antisentido son complementarios con los grupos modificados en la cadena sentido (los grupos modificados en la cadena antisentido y la cadena sentido se alinean perfectamente entre sí). En otra realización, no hay desemparejamientos en los grupos modificados de manera que cada grupo modificado en la cadena antisentido se aparea por las bases con cada grupo modificado en la cadena sentido.

En otra realización, cada grupo modificado en la cadena sentido se desplaza 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos con respecto a los grupos modificados en la cadena antisentido. Por ejemplo, si cada grupo modificado en la cadena sentido se desplaza un nucleótido o un grupo de nucleótidos y un grupo modificado comienza en la posición uno en la cadena antisentido, un grupo modificado en la cadena sentido comenzaría en la posición dos. En otra realización, los grupos modificados de la cadena antisentido no se superponen a los grupos modificados de la cadena sentido, es decir, ningún nucleótido de un grupo modificado en la cadena antisentido se aparea por las bases con un nucleótido de un grupo modificado en la cadena sentido.

En una realización, los desoxirribonucleótidos en un extremo de una cadena de ácido nucleico no se tienen en cuenta cuando se determina la posición de un grupo modificado, es decir, la numeración posicional comienza con el primer ribonucleótido o ribonucleótido modificado. En otra realización, los nucleótidos abásicos en un extremo de una cadena de ácido nucleico no se tienen en cuenta cuando se determina la posición de un grupo modificado.

En un aspecto, un grupo modificado comprende un nucleótido del extremo 5' de una o las dos de entre la cadena antisentido y la cadena sentido. En otra realización, un grupo flanqueante comprende el nucleótido del extremo 5' de una o las dos de entre la cadena antisentido y la cadena sentido. En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de una o las dos de entre la cadena antisentido y la cadena sentido no se modifica. En otra realización, un grupo modificado comprende el nucleótido más en el extremo 5' de una o las dos de entre la región dúplex antisentido y la región dúplex sentido. En otra realización, un grupo flanqueante comprende el nucleótido más en el extremo 5' de una

o las dos de entre la región dúplex antisentido o la región dúplex sentido. En otra realización, el nucleótido más en el extremo 5' de una o las dos de entre la región dúplex antisentido o la región dúplex sentido está sin modificar. En una realización, la modificación en la posición 2' se selecciona entre el grupo que comprende amino, fluoro, metoxi, alcoxi y alquilo C1-C3. En otra realización, la modificación puede seleccionarse entre 2'-O-metilo, 2'-amino-2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-alquilo y 2'-O-(alquilo C1-C3). En otra realización, la modificación en la posición 2'es 2'-O-metilo.

En otro aspecto, cada grupo modificado consiste en un nucleótido y cada grupo flanqueante consiste en un nucleótido. En una realización, cada grupo modificado en la cadena antisentido se alinea con un grupo flanqueante en la cadena sentido. En otra realización, la alineación de cada grupo modificado en la cadena antisentido con el grupo modificado en la cadena sentido se desplaza uno o más nucleótidos.

Modificaciones de la cadena principal de fosfato

Otro aspecto se refiere a modificaciones de la cadena principal de fosfato. Todos o una porción de los nucleótidos del ARNip de la invención pueden estar unidos a través de enlaces fosfodiéster, como se encuentra en el ácido nucleico sin modificar. Sin embargo, un ARNip de la presente invención puede comprender un enlace fosfodiéster modificado. Los enlaces fosfodiéster de la cadena antisentido o de la cadena sentido pueden modificarse para incluir independientemente al menos un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno y azufre. En una realización, un grupo fosfoéster que conecta un ribonucleótido con un ribonucleótido adyacente se reemplaza por un grupo modificado. En una realización, el grupo modificado que reemplaza al grupo fosfoéster se selecciona entre el grupo fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato o fosforamidato.

En una realización, todos los nucleótidos de la cadena antisentido se unen a través de enlaces fosfodiéster. En otra realización, todos los nucleótidos de la región dúplex antisentido se unen a través de enlaces fosfodiéster. En otra realización, todos los nucleótidos de la cadena sentido se unen a través de enlaces fosfodiéster. En otra realización, todos los nucleótidos de la región dúplex sentido se unen a través de enlaces fosfodiéster. En otra realización, la cadena antisentido comprende un número de grupos fosfoéster modificados seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra realización, la región dúplex antisentido comprende un número de grupos fosfoéster modificados seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra realización, la cadena sentido comprende un número de grupos fosfoéster modificados seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra realización, la región dúplex sentido comprende un número de grupos fosfoéster modificados seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

Modificaciones terminales 5' y 3'

El ARNip de la presente invención puede incluir moléculas de ácido nucleico que comprendan uno o más nucleótidos modificados, nucleótidos abásicos, acíclicos o desoxirribonucleótido en el extremo 5' o 3' terminal en una o las dos de entre las cadenas sentido o antisentido. En una realización, los nucleótidos de los extremos 5' y 3' de las cadenas tanto sentido como antisentido están sin modificar. En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de la cadena antisentido se modifica. En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de la cadena sentido se modifica. En otra realización, el nucleótido del extremo 3' de la cadena antisentido se modifica. En otra realización, el nucleótido del extremo 3' de la cadena sentido se modifica. En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de la cadena antisentido y el nucleótido del extremo 5' de la cadena sentido se modifican. En otra realización, el nucleótido del extremo 3' de la cadena antisentido y el nucleótido del extremo 3' de la cadena sentido se modifican. En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de la cadena antisentido y el nucleótido del extremo 3' de la cadena sentido se modifican. En otra realización, el nucleótido del extremo 3' de la cadena antisentido y el nucleótido del extremo 5' de la cadena sentido se modifican. En otra realización, el nucleótido del extremo 3' de la cadena antisentido y los nucleótidos del extremo tanto 5' como 3' de la cadena sentido se modifican. Pueden modificarse los nucleótidos del extremo tanto 5' como 3' de la cadena antisentido. En otra realización, se modifican los nucleótidos del extremo tanto 5' como 3' de la cadena sentido.

El nucleótido del extremo 5' de la cadena antisentido puede forsforilarse. En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de la cadena sentido se fosforila. En otra realización, los nucleótidos del extremo 5' tanto de la cadena antisentido como de la cadena sentido se fosforilan. En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de la cadena antisentido se fosforila y el nucleótido del extremo 5' de la cadena sentido tiene un grupo hidroxilo libre (5'-OH). En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de la cadena antisentido se fosforila y el nucleótido del extremo 5' de la cadena sentido se modifica. En otra realización, el nucleótido del extremo 5' de la cadena antisentido lleva un 5'E vinilfosfonato.

Las modificaciones de los nucleótidos del extremo 5' y 3' no se limitan a las posiciones 5' y 3' en estos nucleótidos terminales. Los ejemplos de modificaciones de los nucleótidos terminales incluyen, pero sin limitación, biotina, (desoxi) abásicos invertidos, amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, metoxi, imidazol, carboxilato, tioato, alquilo C_1 a C_{10} inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo o arilalquilo, OCF_3, OCN, O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; SO-CH3; SO_2CH_3; ONO_2; NO_2, N_3; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, como, entre otros, descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente PCT WO 99/54459, las patentes europeas EP 0 586 520 B1 o EP 0 618 925 B1, incorporadas por referencia en su totalidad. Como se usa en el presente documento, "alquilo" significa alquilo C_1-C_{12} y "alquilo inferior" significa alquilo C_1-C_6, incluyendo alquilo C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 y C_6.

En otro aspecto, el extremo 5' de la cadena antisentido, el extremo 5' de la cadena sentido, el extremo 3' de la cadena antisentido o el extremo 3' de la cadena sentido pueden conectarse covalentemente con un resto de profármaco. En una realización, el resto puede escindirse en un endosoma. En otra, el resto puede escindirse en el citoplasma.

Se presentan ejemplos de diferentes tipos de modificaciones terminales en la **Tabla 1**.

Tabla 1 - Ejemplos de modificaciones terminales

	Cadena antisentido	**Cadena sentido**
1. extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	OH libre
2. extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación terminal	modificación terminal
extremo 3,5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	modificación terminal
extremo 4,5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación terminal	OH libre
extremo 5,5'	OH libre	modificación terminal
extremo 3'	OH libre	OH libre
extremo 6,5'	OH libre	modificación terminal
extremo 3'	modificación terminal	OH libre
extremo 7,5'	OH libre	modificación terminal
extremo 3'	OH libre	modificación terminal
extremo 8,5'	OH libre	modificación terminal
extremo 3'	modificación terminal	modificación terminal

En otra realización, el nucleótido 3' terminal o dos nucleótidos 3' terminales en una o las dos de entre la cadena antisentido o la cadena sentido es un 2'-desoxinucleótido. En otra realización, el 2'-desoxinucleótido es una 2'-desoxi-pirimidina. En otra realización, el 2'-desoxinucleótido es una 2'-desoxi-timidina.

ARNhc (ARN de horquilla corta) y ARNip unido

Otro aspecto se refiere a ARNhc y ARNip unido. La cadena antisentido y la cadena sentido pueden estar unidas covalentemente entre sí. Dicho enlace puede producirse entre cualquiera de los nucleótidos que forman la cadena antisentido y la cadena sentido, respectivamente, y puede formarse mediante enlaces covalentes o no covalentes. El enlace covalente puede formarse uniendo ambas cadenas una o varias veces y en una o varias posiciones, respectivamente, mediante un compuesto seleccionado preferentemente entre el grupo que comprende azul de metileno y grupos bifuncionales. Dichos grupos bifuncionales se seleccionan preferentemente entre el grupo que comprende bis(2-cloroetil)amina, N-acetil-N'-(p-glioxilbenzoil)cistamina, 4-tiouracilo y psoraleno. Además, la cadena antisentido y la cadena sentido pueden estar unidas por una estructura de bucle. La estructura de bucle puede estar compuesta por un polímero de ácido no nucleico tal como polietilenglicol. El extremo 5' de la cadena antisentido puede estar unido al extremo 3' de la cadena sentido o el extremo 3' de la cadena antisentido puede estar unido al extremo 5' de la cadena sentido. El bucle puede consistir en un ácido nucleico, un ácido nucleico bloqueado (ANB), un ácido nucleico peptídico (ANP) o el bucle puede estar formado por polímeros. La longitud del bucle puede ser suficiente para unir covalentemente las dos cadenas de manera que pueda producirse un plegado hacia atrás a través de una estructura de bucle o estructura similar.

Las construcciones de ácido ribonucleico pueden incorporarse en sistemas de vectores adecuados. Preferentemente, el vector comprende un promotor para la expresión de ARNi. El promotor puede seleccionarse entre cualquiera conocido en la técnica, tal como pol III, U6, H1 o 7SK.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender uno o más enlaces internucleotídicos de fosforotioato. Preferentemente, los enlaces internucleotídicos de fosforotioato pueden distribuirse a través de todas las secuencias de nucleótidos completas y pueden producirse en cualquier número en cualquier posición. Preferentemente, los ácidos nucleicos pueden comprender entre uno y diez enlaces internucleotídicos de fosforotioato. Preferentemente, la cadena antisentido tiene al menos 1 modificación de fosforotioato en cada extremo. Preferentemente, la cadena antisentido tiene una modificación de 1-3 fosforotioato en cada extremo. Mucho más preferentemente, la cadena antisentido tiene 2 modificaciones de fosforotioato en cada extremo. Preferentemente, la cadena sentido tiene al menos 1 modificación de fosforotioato en el extremo 3'. Preferentemente, la cadena sentido tiene una modificación de 1-3 fosforotioato en el extremo 3'. Mucho más preferentemente, la cadena sentido tiene 2 modificaciones de fosforotioato en el extremo 3'.

ARNip con salientes

Puede seleccionarse un saliente en el extremo 3' o 5' de la cadena sentido o la cadena antisentido que consista en 1, 2, 3, 4 y 5 nucleótidos de longitud. Como alternativa, la molécula de ARNip puede tener extremos romos en ambos extremos y puede tener una longitud de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos consecutivos.

En una realización, la molécula de ARNip tiene extremos romos en un extremo y la porción bicatenaria o dúplex de la molécula de ARNip tiene una longitud seleccionada entre 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos consecutivos.

En una realización, la molécula de ARNip tiene salientes en ambos extremos en cualquiera de las cadenas y la porción bicatenaria o dúplex de la molécula de ARNip tiene una longitud de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos consecutivos.

El saliente puede comprender al menos un desoxirribonucleótidos y/o un dinucleótido TT. Fabricación de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención
El ácido nucleico de la presente invención puede producirse usando métodos habituales en la técnica, incluyendo síntesis química o expresión del ácido nucleico *in vitro* (por ejemplo, transcripción run-off) o *in vivo*. Por ejemplo, usando síntesis química en fase sólida o usando un vector de expresión. En una realización, el vector de expresión puede producir el ácido nucleico de la invención en una célula diana. Los expertos en la materia conocen métodos para la síntesis de la molécula de ácido nucleico que se describe en el presente documento.

Formulaciones para la administración de los ácidos nucleicos de la presente invención

Pueden proporcionarse a las células ARNip y compuestos de conjugado, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo el contacto directo con células (ARNip "desnudo") o en combinación con uno o más agentes que faciliten el direccionamiento o la administración en las células. Dichos agentes y métodos incluyen lipoplejos, liposomas, iontoforesis, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas, micro y nanoesferas y vectores proteínicos. La combinación de ácido nucleico/vehículo puede administrarse por vía local *in vivo* mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. El ARNip y los conjugados de la invención pueden administrarse *in vivo* por diversos medios, incluyendo inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intradérmica o inhalación. Las moléculas pueden usarse como agentes farmacéuticos. Preferentemente, los agentes farmacéuticos evitan, modulan la aparición, tratan o alivian un síntoma de una patología en un sujeto.

También se proporciona el uso de una composición que comprende liposomas modificados en superficie que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (liposomas modificados con PEG o de circulación larga o liposomas furtivos). Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la estabilidad de un liposoma o soluciones de lipoplejos evitando su agregación y fusión. Las formulaciones también tienen el beneficio añadido *in vivo* de resistir la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (SFM o SRE), lo que permite tiempos de circulación sanguínea más largos y una exposición a los tejidos potenciada para el fármaco encapsulado. Dichos liposomas pueden acumularse selectivamente en tumores, presumiblemente por extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados. Los liposomas de circulación larga potencian la farmacocinética y farmacodinámica del ADN y el ARN, en particular en comparación con los liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en los tejidos del SFM (Liu et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 42, 24864-24780; Choi et al., Publicación internacional PCT N.º WO 96/10391; Ansell et al., Publicación internacional PCT N.º WO 96/10390; Holland et al., Publicación internacional PCT N.º WO 96/10392). Los liposomas de circulación larga también protegen el ARNip de la degradación por nucleasas.

Los conjugados de ARNip de la presente invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden usarse como medicamentos o como agentes de diagnóstico, solos o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, uno o más conjugados de ARNip de la invención pueden combinarse

con un vehículo de suministro (por ejemplo, liposomas) y excipientes, tales como vehículos, diluyentes. También pueden añadirse otros agentes tales como conservantes y estabilizantes. Se conocen en la técnica y dentro del conocimiento del experto en la materia métodos para suministrar moléculas de ácido nucleico.

Los conjugados de ARNip de la presente invención también pueden administrarse en combinación con otros compuestos terapéuticos, ya sea administrados por separado o simultáneamente, por ejemplo, en forma de una dosis unitaria combinada. En una realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende uno o más conjugados de ARNip de acuerdo con la presente invención en un excipiente fisiológicamente/farmacéuticamente aceptable, tal como un estabilizante, conservante, diluyente, tampón y similares.

Dosificación

Los expertos en la materia pueden determinar niveles de dosificación para el medicamento y las composiciones farmacéuticas de la invención mediante experimentación rutinaria. En una realización, una dosis unitaria puede contener entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de ARNip. Como alternativa, la dosis puede ser de 10 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal, o de 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, o de 0,05 mg/kg a 5 mg/kg de peso corporal, o de 0,1 mg/kg a 5 mg/kg de peso corporal, o de 0,1 mg/kg a 1 mg/kg de peso corporal, o de 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg de peso corporal, o de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg de peso corporal.

La composición farmacéutica puede ser una suspensión o solución acuosa inyectable estéril o en forma liofilizada. En una realización, la composición farmacéutica puede comprender lipoplexos liofilizados o una suspensión acuosa de lipoplexos. Los lipoplejos preferentemente comprenden un ARNip de la presente invención. Dichos lipoplejos pueden usarse para suministrar el ARNip de la invención a una célula diana *in vitro* o *in vivo*.

Las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención pueden administrarse a un sujeto mamífero en una dosis farmacéuticamente eficaz. El mamífero puede seleccionarse entre seres humanos, perros, gatos, caballos, ganado bovino, cerdo, cabra, ovejas, ratón, rata, hámster y cobaya.

Vías de administración

Una composición conjugada que incluye un ARNip bicatenario puede administrarse a un sujeto por diversas vías. Las vías de ejemplo incluyen: subcutánea, intravenosa, tópica, rectal, anal, vaginal, nasal, pulmonar, ocular.

La composición conjugada puede incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área que ha de tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica, vaginal, rectal, intranasal, transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular, o administración intratecal o intraventricular.

La vía y el sitio de administración pueden elegirse para potenciar el direccionamiento. Por ejemplo, para dirigir a las células musculares, la inyección intramuscular en los músculos de interés sería una opción lógica. El direccionamiento a las células pulmonares conseguirse mediante la administración del ARNi en forma de aerosol. Las células endoteliales vasculares podrían dirigirse recubriendo un catéter de globo con el ARNi e introduciendo mecánicamente el ADN.

Un experto en la materia apreciará que la modificación, las modificaciones del resto azúcar, el patrón, las modificaciones terminales 5' y 3, los salientes, las formulaciones, la administración, la dosificación y las vías de administración como se han descrito anteriormente pueden aplicarse igualmente a cualquier tipo de molécula de ARNi y no se limitan a los ARNip.

De acuerdo con el decimotercer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de los compuestos o composiciones de la presente invención en medicina. Los conjugados de GalNAc de acuerdo con la invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades hepáticas, enfermedades crónicas, talasemia, daño hepático inducido por fármacos, hemocromatosis y anemia o anemia por enfermedad crónica.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de administración de ácidos nucleicos a hepatocitos usando los conjugados de acuerdo con la presente invención. El método comprende las etapas de poner en contacto el hepatocito con el compuesto de la presente invención. El método puede usarse *in vitro* o *in vivo*, con fines de

diagnóstico, terapia o investigación.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** proporciona una ilustración de un ARNip bicatenario modificado conjugado con un resto de ligando de tres sacáridos modificado con grupos tiofosfato.

La **Figura 2** es un gráfico de barras que ilustra la eficacia *in vivo* en ratones con la eficacia *in vivo* de la inactivación de TTR en ratones. Se trataron ratones (4 animales por grupo) con una sola dosis subcutánea de 1 mg/kg y se sacrificaron 2 días después de la inyección. El nivel de ARNm de TTR se cuantificó mediante PCR TAQman. El nivel de inactivación se muestra sobre las barras. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a PTEN. La introducción de fosforotioatos en el sistema enlazador de GalNAc como en TTR CF02V21 y TTR CF02V23 mostró una potencia sustancialmente mayor en comparación con el enlace de fosfodiéster convencional (como en TTR CF02V20 y TTR CF02V22).

La **Figura 3** es un gráfico de barras que ilustra la duración de la inactivación de TTR en ratones. Se trataron ratones (4 animales por grupo) con una sola dosis subcutánea de 2 mg/kg y se sacrificaron en los puntos temporales dados (7, 14, 21 y 28 días después de la inyección). El nivel de ARNm de TTR se cuantificó mediante PCR TAQman. El nivel de inactivación se muestra sobre las barras. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a PTEN. La duración de la inactivación con conjugados de ARNip de la presente invención es mucho más pronunciada y más duradera en comparación con el compuesto TTRCF02 que incorpora el tipo convencional Biessen/van Berkel de enlazador de GalNAc (como en la estructura ST13).

La **Figura 4** es un gráfico de barras que ilustra una titulación de dosis de inactivación de TTR en ratones. Se trataron ratones (4 animales por grupo) con la dosis respectiva (3, 1, 0,3, 0,1 mg/kg). El nivel de ARNm de TTR se cuantificó mediante PCR TAQman. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a PTEN.

La **Figura 5** es un gráfico de barras que ilustra la determinación *in vitro* de la inactivación de TTR de conjugados de GalNAc de ARNip de TTR STS016 L8 y L9. TTR CF02V23 representa el control positivo. GN_Luc representa el control negativo. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a PTEN.

La **Figura 6** es un gráfico de barras que ilustra la determinación *in vitro* de la inactivación de TTR de conjugados de GalNAc de ARNip de TTR STS016 L4-L7. TTR CF02V23 representa el control positivo. GN_Luc representa el control negativo. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a PTEN.

La **Figura 7** es un gráfico de barras que ilustra la eficacia *in vivo* de la inactivación de TTR en ratones. Se trataron ratones (4 animales por grupo) con una sola dosis subcutánea de 1 mg/kg. Se extrajo sangre después de cada punto temporal (día 8, 15, 22 después de la inyección) y se analizó el nivel de TTR usando el kit Elisa específico de TTR murino disponible en el mercado.

La **Figura 8** es un gráfico de barras que ilustra la eficacia *in vivo* de inactivación de PTEN en ratones. Se trataron ratones (4 animales por grupo) con la dosis respectiva (1, 3, 10 mg/kg). El nivel de ARNm de PTEN se cuantificó mediante PCR TAQman. Se demostró una inactivación clara dependiente de la dosis de PTEN.

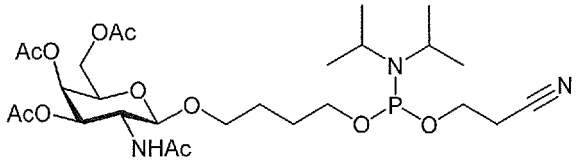
Ejemplos:

Información general

Todas las reacciones se realizaron en una atmósfera de nitrógeno, a menos que se indique lo contrario. Los espectros de RMN se registraron en un Bruker de 400 MHz UltrashieldTM y todos los desplazamientos químicos (δ) se determinaron con respecto a TMS.

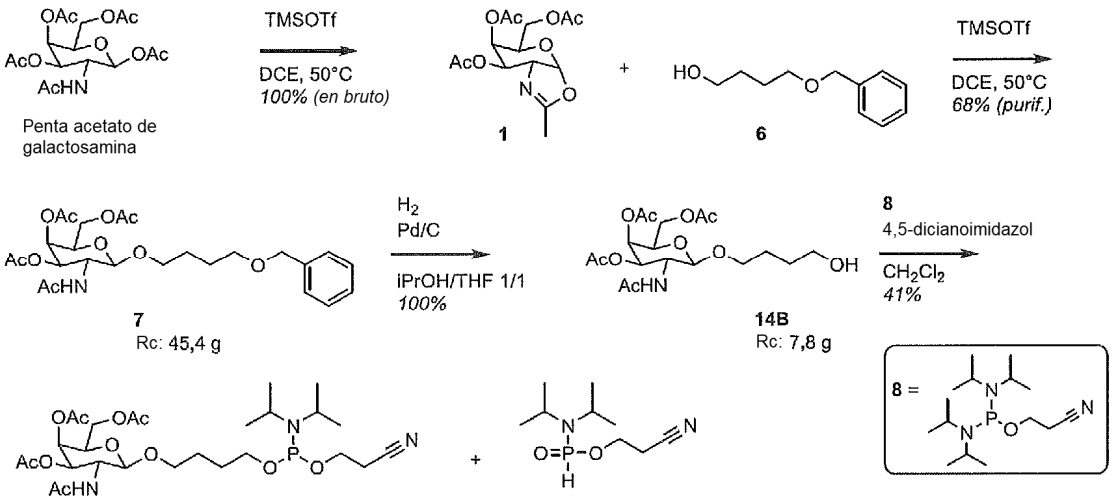
Ejemplo 1 - Síntesis de fosforamiditas de GalNAc:

ST23

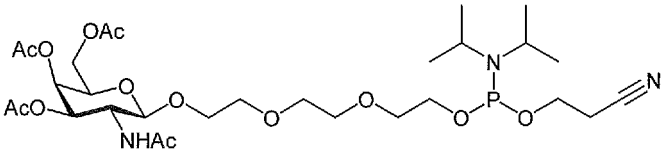


La síntesis de las fosforamiditas respectivas sigue esencialmente el procedimiento descrito en Prakash et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 4127-4130.

Se activó penta acetato de galactosamina con trifluorometilsulfonato de trimetilsililo y se hizo reaccionar con 4-benciloxi-1-butanol. Después de la retirada hidrogenolítica del grupo protector bencilo, el alcohol resultante se transfirió a la fosforamidita siguiendo el método descrito por Dubber, 2003.

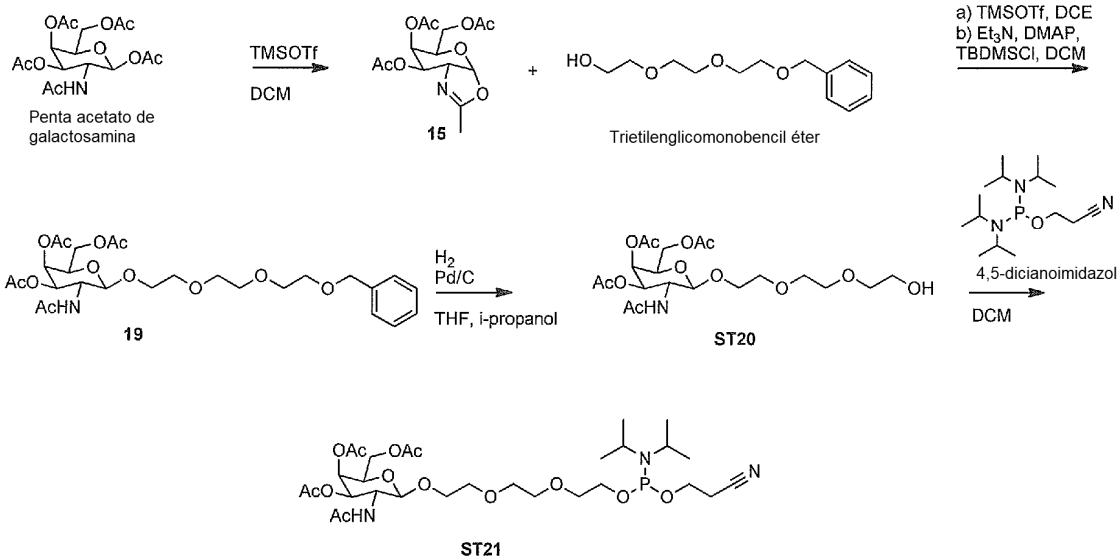


ST21:



ST21 se sintetizó siguiendo el mismo procedimiento que anteriormente usando trietilenglicol protegido con bencilo como material de partida.

ST21



Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (19)

A una solución de **15** (64,2 g, 166 mmol) en 1,2-dicloroetano (700 ml) se le añadió trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (22,10 g, 99 mmol, 18,04 ml, 0,6 equiv.) y la suspensión de color marrón se agitó durante 15 minutos. Se añadieron tamices moleculares 4A molidos (85 g) y se continuó agitando durante 15 minutos. Se añadió

trietilenglicolmonobencil éter (51,8 g, 215 mmol, 47,5 ml, 1,3 equiv.), a través de adición gota a gota, durante un período de 15 minutos y se continuó agitando a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de kieselguhr seguido de aclarado con diclorometano templado. El filtrado se inactivó vertiéndolo en solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ enfriada con hielo (800 ml) y se agitó vigorosamente. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces más con diclorometano (2 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (600 ml) y salmuera (600 ml), se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron al vacío para obtener un aceite de color amarillo. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 5-100 % en heptano) para obtener una mezcla de 19 y trietilenglicolmonobencil éter (64 g). Este material se disolvió en diclorometano (430 ml) seguido de la adición de trietilamina (38,4 g, 380 mmol, 52,8 ml, 4 equiv.) y DMAP (2,321 g, 19,00 mmol, 0,2 equiv.). Después, a través de adición discontinua, se añadió TBDMSCl (21,47 g, 142 mmol, 1,5 equiv.) y se continuó agitando a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró y después se vertió en una solución saturada de NaHCO3 enfriada con hielo (1 l). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces más con diclorometano (2x300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera (1 l) y se secaron sobre Na_2SO_4. Después de concentrar al vacío, seguido de cromatografía en columna ultrarrápida (70-100 % de EtOAc en heptano), se obtuvo 19 en forma de un aceite incoloro (36 g, rendimiento del 30 %) RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,38 - 7,28 (m, 5H), 6,58 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 5,26 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 4,96 (dd, *J* = 11,2, 3,4 Hz, 1H), 4,79 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 4,53 (d, *J* = 1,3 Hz, 2H), 4,28 (dt, *J* = 11,2, 9,0 Hz, 1H), 4,16 - 4,06 (m, 2H), 3,88 (dd, *J* = 6,0, 2,7 Hz, 2H), 3,75 (td, *J* = 5,7, 2,7 Hz, 4H), 3,71 - 3,58 (m, 7H), 2,15 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 1,95 (s, 3H).

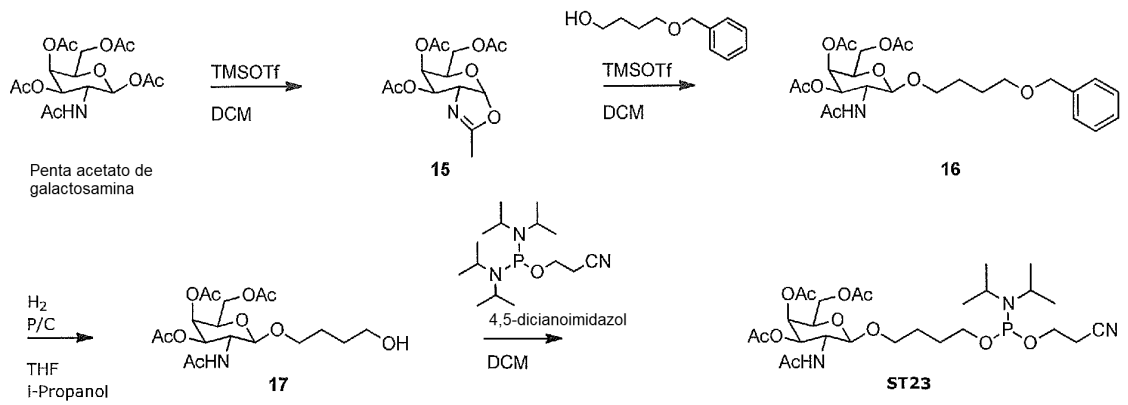
Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (ST20)

A una solución de **19** (47,68 g, 84 mmol) en tetrahidrofurano (330 ml) y 2-propanol (330 ml) se le añadió paladio al 10 % sobre carbón activado (12,92 g, 12,14 mmol, 1,45 equiv.). La mezcla de reacción se cargó con hidrógeno (globo) y se continuó agitando a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró sobre kieselguhr y se aclaró con diclorometano templado. Después de concentrar al vacío, se obtuvo **ST20** (37 g, rendimiento del 94 %) RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,81 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 5,22 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 4,97 (dd, *J* = 11,2, 3,4 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,56 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,03 (s, 3H), 3,88 (dt, *J* = 11,1, 8,9 Hz, 1H), 3,82 - 3,73 (m, 1H), 3,63 - 3,45 (m, 9H), 3,41 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,89 (s, 3H), 1,78 (s, 3H).

Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-(2-(((2-cianoetoxi)(diisopropilamino)fosfino)oxi)etoxi)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (ST21)

A una solución de 4,5-dicianoimidazol (961 mg, 8,13 mmol, 0,65 equiv) en acetonitrilo anhidro (8 ml) y diclorometano seco (40 ml) se le añadieron tamices moleculares 4A molidos (4,4 g). Después, se añadió 2-cianoetil tetraisopropilfosforo-diamidita (4903 mg, 16,27 mmol, 5,16 ml, 1,3 equiv.) mediante una jeringa y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, una solución de **ST20** (6000 mg, 12,51 mmol) en diclorometano seco (20 ml) se añadió a la mezcla de reacción durante un período de 10 minutos. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de algodón seguido de concentración al vacío. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida se realizó dos veces (10-100 % EtOAc en heptano) para obtener ST21 en forma de un aceite de color amarillo pálido (6,9 g, rendimiento del 74 %). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,81 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 5,21 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 4,97 (dd, *J* = 11,2, 3,4 Hz, 1H), 4,55 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,03 (d, *J* = 3,0 Hz, 3H), 3,88 (dt, *J* = 11,2, 8,9 Hz, 1H), 3,82 - 3,45 (m, 16H), 2,77 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,89 (s, 3H), 1,77 (s, 3H), 1,13 (dd, *J* = 6,8, 3,1 Hz, 12H).

ST23



Diacetato de (3aR,5R,6R,7R,7aR)-5-(acetoximetil)-2-metil-5,6,7,7a-tetrahidro-3aH-pirano[3,2-d]oxazol-6,7-diilo (15)

A una suspensión de pentaacetato de galactosamina (125 g, 321 mmol) en diclorometano (870 ml) a temperatura ambiente se le añadió, a través de adición gota a gota, trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (107 g, 482 mmol, 87 ml, 1,5 equiv.) durante un período de 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 40 ºC durante un período de 2 horas, después de lo cual se enfrió nuevamente a temperatura ambiente y se inactivó vertiéndola en una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ enfriada con hielo (1000 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces más con diclorometano (2x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (500 ml) y salmuera (800 ml), seguido de secado sobre Na_2SO4. Después de concentrar al vacío, se obtuvo **15** en forma de un aceite de color amarillo pálido (109 g, rendimiento bruto del 103 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 6,00 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,47 (t, *J* = 3,0 Hz, 1H), 4,91 (dd, *J* = 7,4, 3,3 Hz, 1H), 4,29 - 4,06 (m, 3H), 4,03 - 3,97 (m, 1H), 2,13 (s, 3H), 2,07 (d, *J* = 1,0 Hz, 6H), 2,06 (d, *J* = 1,3 Hz, 3H).

Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-(4-(benciloxi)butoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (16)

A una solución de **15** (109 g, 331 mmoles) en diclorometano (1200 ml) se le añadieron tamices moleculares en polvo 4A (75 g) seguido de agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió 4-benciloxi-1-butanol (89 g, 497 mmol, 87 ml, 1,5 equiv.) y se continuó agitando durante otros 15 minutos. Después, a través de adición gota a gota, se añadió trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (44,1 g, 199 mmol, 36,0 ml, 0,6 equiv.) durante un período de 15 minutos. La agitación de la mezcla de reacción continuó durante 2 horas. La filtración de la mezcla se realizó sobre un tapón de kieselguhr seguido de aclarado una vez con diclorometano (200 ml). El filtrado se enfrió después vertiéndolo en una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ enfriada con hielo (1000 ml). Las capas se separaron seguido de extracción de la capa acuosa dos veces más con diclorometano (2x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (600 ml) y salmuera (600 ml) seguido de secado sobre Na_2SO_4. Después de concentrar al vacío, se realizó purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre sílice neutralizada con Et_3N al 1 % (20-80 % de EtOAc en heptano) para obtener **16** en forma de un aceite incoloro que cristalizó lentamente (109 g, rendimiento del 65 %). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,83 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 7,39 - 7,23 (m, 5H), 5,21 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 4,96 (dd, *J* = 11,2, 3,5 Hz, 1H), 4,48 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,44 (s, 2H), 4,07 - 3,97 (m, 3H), 3,87 (dt, *J* = 11,2, 8,8 Hz, 1H), 3,72 (p, *J* = 5,3 Hz, 1H), 3,49 - 3,37 (m, 3H), 2,10 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,89 (s, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,54 (cd, *J* = 8,0, 5,2, 4,6 Hz, 4H).

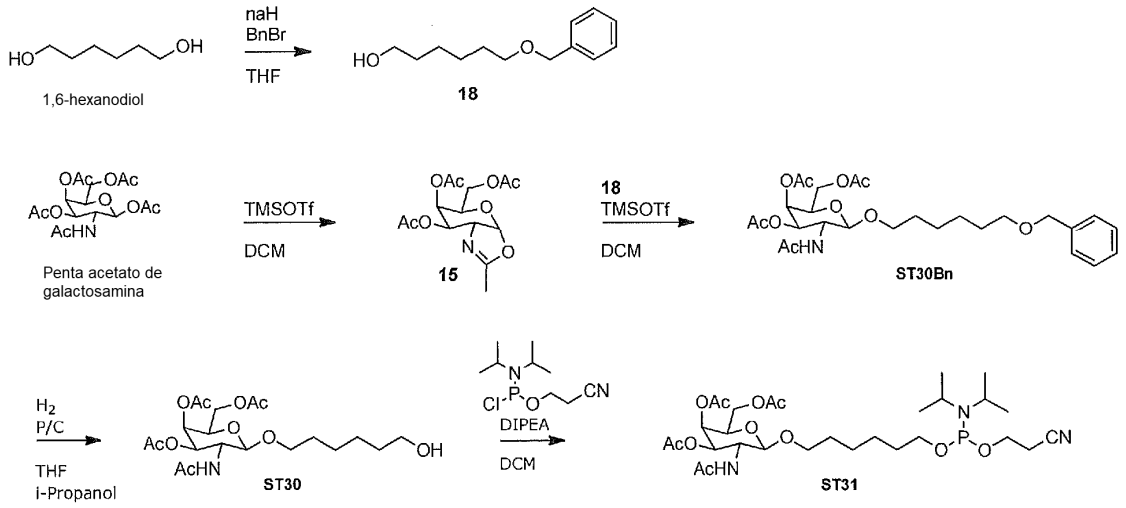
Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-(4-hidroxibutoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (17)

A una solución de **16** (109,6 g, 215 mmol) en tetrahidrofurano (1000 ml) y 2-propanol (1000 ml) se le añadió paladio al 10 % sobre carbono (17,17 g, 16,13 mmol, 10 %, 0,075 equiv.) y el matraz se cargó con hidrógeno (presión atmosférica). La agitación de la mezcla de reacción continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se filtró sobre un tapón de kieselguhr y se concentró al vacío. Después de separar el material dos veces con tolueno (2x 300 ml) y diclorometano (2x 300 ml), se obtuvo **17** en forma de un sólido pegajoso de color blanco (87 g, rendimiento del 97 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Metanol-d_4) δ 5,33 (dd, *J* = 3,5, 1,0 Hz, 1H), 5,05 (dd, *J* = 11,3, 3,3 Hz, 1H), 4,55 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,20 - 3,97 (m, 4H), 3,87 (dt, *J* = 10,1, 5,8 Hz, 1H), 3,60 - 3,48 (m, 3H), 3,30 (p, *J* = 1,8 Hz, 1H), 2,14 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,92 (s, 3H), 1,61 (dtd, *J* = 16,8, 11,0, 10,1, 3,6 Hz, 4H).

Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-(4-(((2-cianoetoxi)(diisopropilamino)fosfino)oxi)butoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (ST23)

A una solución de 4,5-dicianoimidazol (1,940 g, 16,43 mmol, 0,65 equiv.) en acetonitrilo seco (20 ml) y diclorometano seco (20 ml), en una atmósfera de argón, se le añadieron tamices moleculares 4A molidos (9 g). Después, se añadió 2-cianoetil tetraisopropilfosforo-diamidita (10,00 g, 33,2 mmol, 10,53 ml, 1,31 equiv.) a través de una jeringa y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, a través de adición gota a gota, se añadió una solución de **17** (10,6 g, 25,3 mmol) en diclorometano seco (50 ml) durante un período de 10 minutos. Después de agitar durante 30 minutos adicionales, la mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de algodón y se concentró al vacío. La purificación del material se realizó mediante múltiples etapas de cromatografía en columna ultrarrápida (0-100 % de EtOAc en heptano con Et_3N al 5 %) para obtener **ST23** en forma de un aceite de color amarillo pálido (11,75 g, rendimiento del 72 %). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,82 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 5,21 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 4,96 (dd, *J* = 11,2, 3,5 Hz, 1H), 4,48 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,02 (s, 3H), 3,93 - 3,82 (m, 1H), 3,78 - 3,65 (m, 3H), 3,64 - 3,49 (m, 4H), 3,48 - 3,40 (m, 1H), 2,76 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,89 (s, 3H), 1,77 (s, 3H), 1,62 - 1,46 (m, 4H), 1,13 (dd, *J* = 6,8, 3,6 Hz, 12H). RMN ^{31}P (162 MHz, Cloroformo-d) 147 (d, *J* = 8,6 Hz)

ST31



6-(benciloxi)hexan-1-ol (18)

A una suspensión de hidruro de sodio enfriada y agitada vigorosamente (90 g, 2242 mmol, 3,5 equiv) en tetrahidrofurano (500 ml) se le añadió, a través de adición gota a gota, una solución de 1,6-hexanodiol (265 g, 2242 mmol, 3,5 equiv.) en tetrahidrofurano (1000 ml) durante un período de una hora. Después de agitar durante 30 minutos adicionales, se añadió una solución de bromuro de bencilo (76 ml, 641 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (500 ml) durante un período de 30 minutos. Una vez completada la adición, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se continuó agitando durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a una temperatura de 5 ºC seguido de la adición lenta de agua (200 ml). La mezcla se concentró al vacío, se redisolvió en diclorometano (600 ml) y se lavó con agua (3000 ml). La capa acuosa se extrajo tres veces más con diclorometano (3x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3x 400 ml) y salmuera (1x500 ml) seguido de secado sobre Na_2SO_4 y concentración al vacío. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna de gravedad (0-50 % de EtOAc en heptano) para obtener 18 (25 g, rendimiento del 20 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,40 - 7,27 (m, 5H), 4,50 (s, 2H), 3,64 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,47 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 1,68 - 1,51 (m, 4H), 1,47 - 1,31 (m, 4H), 1,27 (s, 1H).

Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-((6-(benciloxi)hexil)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (ST30Bn)

A una solución de **15** (28 g, 85 mmol) en diclorometano (320 ml) se le añadieron tamices moleculares en polvo 4A (10 g) seguido de agitación durante 5 minutos. Después, se añadió **18** (26,6 g, 128 mmol, 1,5 equiv.) y se continuó agitando durante otros 15 minutos. Se añadió trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (9,26 ml, 51,0 mmol, 0,6 equiv.), a través de adición gota a gota, durante un período de 15 minutos. Se continuó agitando a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de algodón seguido de inactivación rápida con una solución acuosa saturada de NaHCO3 enfriada con hielo (300 ml). Las capas se separaron y la extracción se realizó dos veces más con diclorometano (2x 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (150 ml) y salmuera (150 ml) seguido de secado sobre Na_2SO_4 y concentración al vacío. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (20-100 % de EtOAc en heptano) para obtener **ST30Bn** en forma de un aceite incoloro (25 g, rendimiento del 55 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,38 - 7,27 (m, 5H), 5,43 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 5,38 - 5,27 (m, 2H), 4,71 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,50 (s, 2H), 4,21 - 4,07 (m, 2H), 3,96 - 3,81 (m, 3H), 3,47 (t, *J* = 6,3 Hz, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,68 - 1,51 (m, 4H), 1,44 - 1,30 (m, 4H).

Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-((6-hidroxihexil)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (ST30)

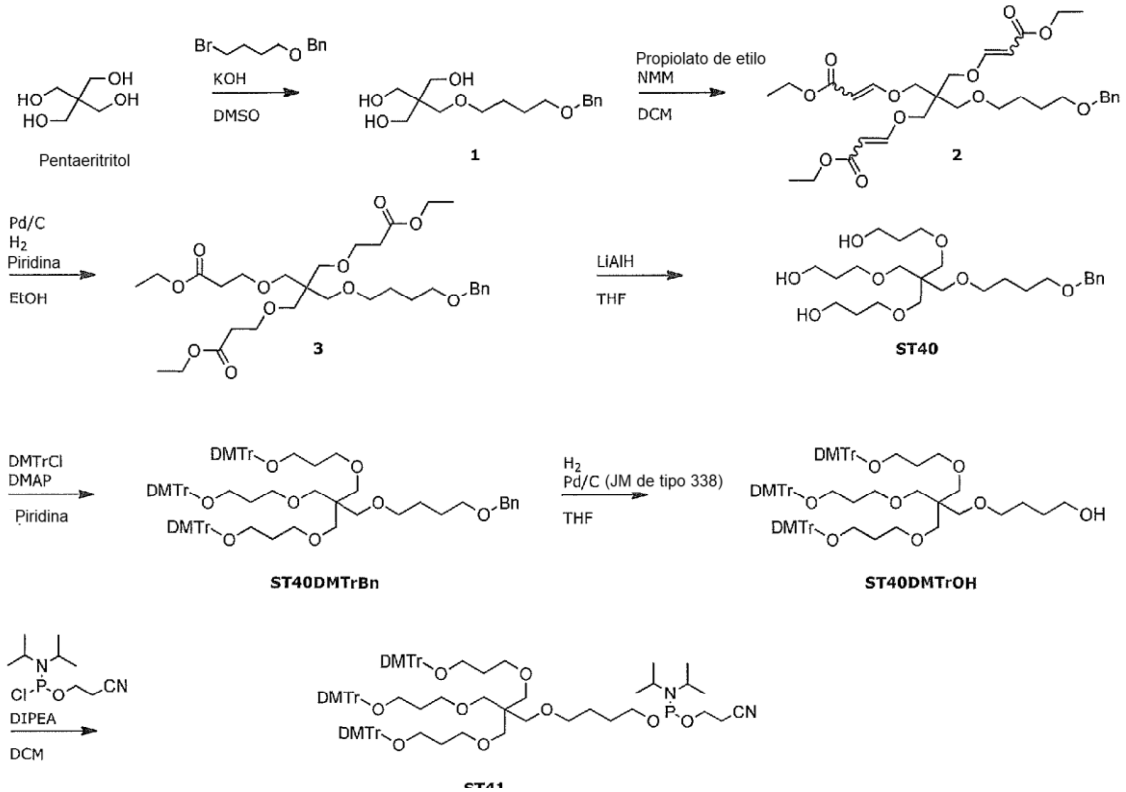
A una solución de **ST30Bn** (29 g, 54 mmol) en tetrahidrofurano (250 ml) y 2-propanol (250 ml) se le añadió paladio al 10 % sobre carbono (0,582 g, 0,547 mmol, 0,075 equiv.). El matraz se cargó con hidrógeno (presión atmosférica) y la agitación de la mezcla continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de kieselguhr y el filtrado se concentró al vacío. Después de extraer dos veces con tolueno (2x 200 ml) y diclorometano (2x 200 ml), se obtuvo **ST30** en forma de un aceite incoloro (24 g, rendimiento del 99 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Metanol-*d4*) δ 5,37 - 5,26 (m, 1H), 5,10 - 4,97 (m, 1H), 4,67 - 4,48 (m, 2H), 4,20 - 3,93 (m, 4H), 3,92 - 3,77 (m, 1H), 3,52 (hept, *J* = 9,4, 8,1 Hz, 3H), 3,36 - 3,23 (m, 1H), 2,17 - 2,09 (m, 3H), 2,05 - 1,98 (m, 3H), 1,97 - 1,87 (m, 6H), 1,63 - 1,45 (m, 4H), 1,43 - 1,29 (m, 4H).

Diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-((6-(((2-

cianoetoxi)(diisopropilamino)fosfino)oxi)hexil)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (ST31)

A una solución de **ST30** (21,2 g, 47,4 mmol) en diclorometano seco (550 ml), en una atmósfera de argón, se le añadió DIPEA (83 ml, 474 mmol, 10 equiv.) y tamices moleculares 4A (30 g). La mezcla de reacción se enfrió a una temperatura de 0 ºC seguido de la adición gota a gota de 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (13,46 g, 56,9 mmol, 1,2 equiv.) durante un período de 10 minutos. La agitación de la mezcla continuó mientras se le permitía calentarse durante un período de 30 minutos. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de algodón y se aplicó como recubrimiento directamente sobre, con Et_3N tratada, sílice (60 g). La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (10-60 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST31** en forma de un alquitrán de color amarillo (24,8 g, rendimiento del 78 %). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,82 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 5,21 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 4,96 (dd, *J* = 11,3, 3,4 Hz, 1H), 4,48 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,02 (s, 3H), 3,91 - 3,81 (m, 1H), 3,79 - 3,63 (m, 3H), 3,63 - 3,49 (m, 4H), 3,45 - 3,37 (m, 1H), 2,76 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,10 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,89 (s, 3H), 1,77 (s, 3H), 1,58 - 1,40 (m, 4H), 1,37 - 1,22 (m, 4H), 1,13 (dd, *J* = 6,8, 3,9 Hz, 12H).

Ejemplo 2 - Síntesis de sintones triples *ST41*



2-((4-(benciloxi)butoxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (1)

A una suspensión de pentaeritritol (160 g, 1175 mmol, 10 equiv.) en sulfóxido de dimetilo (320 ml) se le añadió hidróxido de potasio (65,9 g, 1175 mmol, 10 equiv.) seguido de agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, durante un período de 1,5 horas, se añadió una solución de 4-benciloxi-1-bromobutano (22,32 ml, 118 mmol, 1 equiv.) en sulfóxido de dimetilo (107 ml). Una vez completada la adición, la agitación de la mezcla de reacción continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó a pH = 2 mediante la adición de HCl acuoso 3 M, la suspensión de color blanco obtenida ahora se filtró sobre un filtro de vidrio. El filtrado se diluyó adicionalmente con agua (900 ml), se transfirió a un embudo de separación y el producto se extrajo con diclorometano (3x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (4x 200 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron al vacío. El aceite de color amarillo pálido se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc 50 - 100 % en heptano) para obtener 1 en forma de un aceite incoloro (20,46 gramos, rendimiento del 58 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,41 - 7,27 (m, 5H), 4,50 (s, 2H), 3,70 (s, 6H), 3,52 - 3,43 (m, 6H), 2,54 (s, 3H), 1,71 - 1,64 (m, 4H).

3,3'-((2-((4-(Benciloxi)butoxi)metil)-2-(((3-etoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)oxi)metil)propano-1,3-di-il)bis(oxi))diacrilato de dietilo (2)

A una solución de **1** (20,46 g, 68,6 mmol) en diclorometano (300 ml) se le añadió N-metilmorfolina (33,9 ml, 309 mmol, 4,5 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió sobre un baño de hielo y a la mezcla de reacción se le añadió propiolato

de etilo (27,8 ml, 274 mmol, 4 equiv.) a través de una única corriente. La agitación de la mezcla de reacción continuó durante 15 minutos, seguida de dejar que la mezcla de reacción se calentase a temperatura ambiente. Después de 2 horas de tiempo de reacción, la mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un aceite de color marrón oscuro. La purificación del material en bruto se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-37 % de EtOAc en heptano) para obtener 2 en forma de un aceite de color amarillo (31,56 g, rendimiento del 78 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,54 (d, J = 12,6 Hz, 3H), 7,39 - 7,28 (m, 5H), 5,23 (d, J = 12,6 Hz, 3H), 4,50 (s, 2H), 4,16 (c, J = 7,1 Hz, 6H), 3,87 (s, 6H), 3,53 - 3,33 (m, 6H), 1,69 - 1,55 (m, 4H), 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 12H).

3,3'-((2-((4-(Benciloxi)butoxi)metil)-2-((3-etoxi-3-oxopropoxi)metil)propano-1,3-di-il)bis(oxi))ipropanoato de dietilo (3)

A una solución de 2 (31,56 g, 53,2 mmol) en etanol (1463 ml) se añadió paladio al 10 % sobre carbono (2,83 g, 2,66 mmol, 0,05 equiv.) y piridina (2,153 ml, 26,6 mmol, 0,5 equiv.). La mezcla de reacción se cargó con hidrógeno (presión atmosférica) y la agitación de la mezcla continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de kieselguhr, seguido de concentración del filtrado al vacío. Esto proporcionó 3 en forma de un aceite de color amarillo (29,75 g, rendimiento del 93 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,38 - 7,27 (m, 5H), 4,51 (s, 2H), 4,13 (c, *J* = 7,1 Hz, 6H), 3,64 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H), 3,48 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 3,39 - 3,33 (m, 8H), 3,30 (s, 2H), 2,52 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H), 1,70 - 1,56 (m, 4H), 1,26 (t, *J* = 7,1 Hz, 9H).

3,3'-((2-((4-(Benciloxi)butoxi)metil)-2-((3-hidroxipropoxi)metil)propano-1,3-diil)bis(oxi))bis(propan-1-ol) (ST40)

Una solución de hidruro de litio y aluminio 2,4 M en tetrahidrofurano (76 ml, 183 mmol, 6,2 equiv.) en tetrahidrofurano seco (331 ml) se enfrió a una temperatura de 0 ºC. Después, a través de adición gota a gota, se añadió una solución de 3 (17,7 g, 29,6 mmol) en tetrahidrofurano seco (200 ml) a una velocidad de manera que la temperatura se mantuviese por debajo de 10 ºC. Tras completar la adición, se continuó agitando durante la noche mientras se permitía que la mezcla de reacción alcanzase lentamente la temperatura ambiente. La reacción se diluyó adicionalmente con tetrahidrofurano (100 ml) y se enfrió a una temperatura de 0 ºC. La inactivación de la mezcla de reacción se realizó mediante la adición lenta de agua (2,0 ml), NaOH acuoso 4 M (2,0 ml) y agua (6,0 ml). El precipitado de color blanco se retiró mediante filtración sobre un tapón de Na_2SO_4 seco seguido de aclarado dos veces con tetrahidrofurano. El filtrado se concentró al vacío y la purificación de este se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-10 % de MeOH en diclorometano) para obtener **ST40** en forma de un aceite incoloro (9,55 g, rendimiento del 68 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,39 - 7,27 (m, 5H), 4,51 (s, 2H), 3,74 (c, *J* = 5,2 Hz, 6H), 3,58 (t, *J* = 5,5 Hz, 6H), 3,49 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 3,40 (s, 8H), 3,33 (s, 2H), 3,27 (s, 3H), 1,79 (p, *J* = 5,3 Hz, 6H), 1,71 - 1,58 (m, 4H).

8,8-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)-1,1-bis(4-metoxifenil)-1,16-difenil-2,6,10,15-tetraoxahexadecano (ST40DMTrBn)

Se retiró el agua residual de **ST40** (9,55 g, 20,21 mmol) mediante extracción dos veces con piridina, seguido de redisolución en piridina (464 ml) en atmósfera de argón. A la mezcla de reacción se le añadieron tamices moleculares 3A (20 g) y se continuó agitando durante 15 minutos. Se añadió DMTrCl sólido (30,8 g, 91 mmol, 4,5 equiv.) y la agitación de la mezcla ahora de color naranja oscuro continuó durante la noche. La reacción se filtró sobre un tapón de algodón y el filtrado se aplicó como recubrimiento sobre, con Et_3N neutralizada, sílice. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-40 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener ST40DMTrBn en forma de un aceite espumoso de color amarillo (25,3 g, rendimiento del 84 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,43 - 7,37 (m, 6H), 7,33 - 7,21 (m, 23H), 7,19 - 7,13 (m, 3H), 6,82 - 6,75 (m, 12H), 4,46 (s, 2H), 3,74 (s, 18H), 3,43 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), 3,39 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H), 3,26 - 3,17 (m, 10H), 3,06 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,78 (p, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,64 - 1,49 (m, 4H).

4-(3-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)-2,2-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)propoxi)butan-1-ol (ST40DMTrOH)

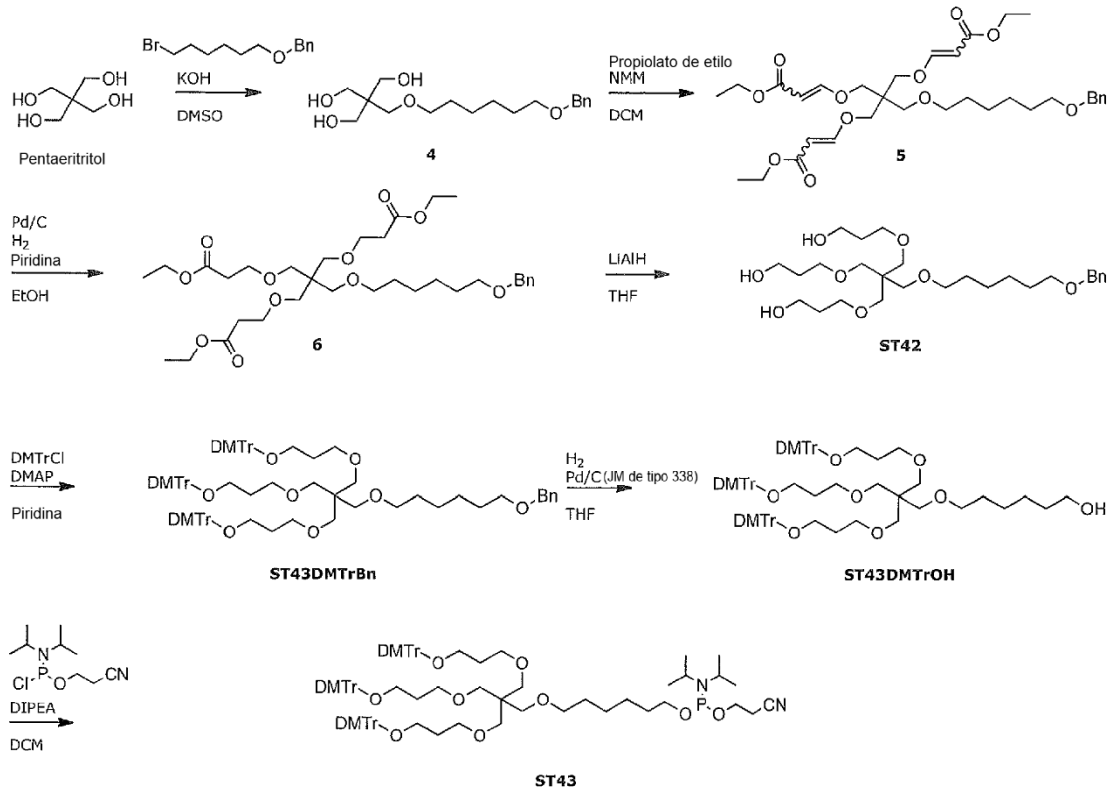
A una solución de **ST40DMTrBn** (25,3 g, 18,34 mmol) en tetrahidrofurano (275 ml) se le añadió de paladio al 5 % sobre carbono, Johnson Matthey de tipo 338 (5,85 g, 2,75 mmol, 0,15 equiv.). El matraz se cargó con hidrógeno (presión atmosférica) y después de 45 minutos de tiempo de reacción se lavó abundantemente con nitrógeno. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de kieselguhr y se concentró al vacío. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-40 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST40DMTrOH** en forma de un sólido de color espumoso de color blanco (11,95 g, rendimiento del 50 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,44 - 7,37 (m, 6H), 7,34 - 7,21 (m, 18H), 7,20 - 7,13 (m, 3H), 6,83 - 6,75 (m, 12H), 3,75 (s, 18H), 3,60 - 3,53 (m, 2H), 3,39 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 3,27 (t, 2H), 3,22 (s, 8H), 3,07 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 2,26 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 1,79 (p, *J* = 6,5 Hz, 6H), 1,60 - 1,51 (m, 4H).

4-(3-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)-2,2-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)propoxi)butil (2-cianoetil)diisopropilfosforamidita (ST41)

A una solución de **ST40DMtrOH** (11,95 g, 9,27 mmol) en diclorometano seco (162 ml) se le añadieron DIPEA (16,18 ml, 93 mmol, 10 equiv) y tamices moleculares 4A (25 g) seguido de enfriamiento a una temperatura de 0 ºC.

Después, a la reacción se le añadió 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (2,61 g, 11,03 mmol, 1,2 equiv.) a través de adición gota a gota durante un período de 15 minutos. La agitación de la mezcla de reacción continuó durante otros 15 minutos mientras se le permitía que alcanzase la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de algodón y el filtrado se aplicó como recubrimiento sobre, con Et_3N tratada, sílice (50 g). La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-35 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST41** en forma de un alquitrán incoloro (10,65 g, rendimiento del 77 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,44 - 7,37 (m, 6H), 7,33 - 7,21 (m, 18H), 7,20 - 7,13 (m, 3H), 6,83 - 6,75 (m, 12H), 3,86 - 3,70 (m, 20H), 3,67 - 3,50 (m, 4H), 3,39 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 3,29 - 3,16 (m, 10H), 3,06 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 2,57 (t, 2H), 1,78 (p, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,65 - 1,49 (m, 4H), 1,16 (dd, *J* = 9,1, 6,8 Hz, 12H).

ST43



2-(((6-(benciloxi)hexil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (4)

A una suspensión de pentaeritritol (55,2 g, 406 mmol, 10 equiv.) en sulfóxido de dimetilo (110 ml) se le añadió hidróxido de potasio (22,76 g, 406 mmol, 10 equiv.) seguido de agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, durante un período de 1,5 horas, se añadió una solución de bencil 6-bromohexil éter (11 g, 40,6 mmol, 1 equiv) en sulfóxido de dimetilo (36,6 ml). Una vez completada la adición, la agitación de la mezcla de reacción continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó a pH ~ 1 mediante la adición de HCl acuoso 3 M y la emulsión de color blanco obtenida ahora se diluyó adicionalmente con agua (700 ml), se transfirió a un embudo de separación y el producto se extrajo con diclorometano (4x 70 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3x 70 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron al vacío. El aceite de color amarillo pálido se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc 50 - 100 % en heptano) para obtener 4 en forma de un aceite incoloro (9,16 gramos, rendimiento del 67 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,38 - 7,27 (m, 5H), 4,50 (s, 2H), 3,70 (s, 6H), 3,49 - 3,39 (m, 6H), 2,83 (s, 3H), 1,66 - 1,52 (m, 4H), 1,45 - 1,28 (m, 4H).

3,3'-((2-(((6-(benciloxi)hexil)oxi)metil)-2-(((3-etoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)oxi)metil)propano-1,3-di-il)bis(oxi))diacrilato de dietilo (5)

A una solución de **2** (9,1 g, 27,9 mmol) en diclorometano (150 ml) se le añadió N-metilmorfolina (13,79 ml, 125 mmol, 4,5 equiv). La mezcla de reacción se enfrió sobre un baño de hielo y a la mezcla de reacción se le añadió propiolato de etilo (11,30 ml, 112 mmol, 4 equiv.) a través de una única corriente. La agitación de la mezcla de reacción continuó durante 15 minutos, seguida de dejar que la mezcla de reacción se calentase a temperatura ambiente. Después de 2 horas de tiempo de reacción, la mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un aceite de color marrón

oscuro. La purificación del material en bruto se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-30 % de EtOAc en heptano) para obtener **5** en forma de un aceite de color amarillo pálido (15,85 g, rendimiento del 79 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,54 (d, *J* = 12,6 Hz, 3H), 7,37 - 7,27 (m, 5H), 5,23 (d, *J* = 12,6 Hz, 3H), 4,50 (s, 2H), 4,16 (c, *J* = 7,1 Hz, 6H), 3,88 (s, 6H), 3,46 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,41 (s, 2H), 3,36 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 1,65 - 1,49 (m, 4H), 1,43 - 1,21 (m, 13H).

3,3'-((2-(((6-(benciloxi)hexil)oxi)metil)-2-((3-etoxi-3-oxopropoxi)metil)propano-1,3-di-il)bis(oxi))dipropanoato de dietilo (6)

A una solución de **5** (15,85 g, 25,5 mmol) en etanol (750 ml) se le añadió paladio al 10 % sobre carbono (1,359 g, 1,277 mmol, 0,05 equiv) y piridina (1,033 ml, 12,77 mmol, 0,5 equiv). La mezcla de reacción se cargó con hidrógeno (presión atmosférica) y la agitación de esto continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de kieselguhr seguido de concentración del filtrado al vacío que proporcionó 6 en forma de un aceite de color amarillo pálido (15,27 g, rendimiento del 91 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,37 - 7,27 (m, 5H), 4,50 (s, 2H), 4,14 (c, *J* = 7,1 Hz, 6H), 3,64 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H), 3,47 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,40 - 3,26 (m, 10H), 2,52 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H), 1,69 - 1,46 (m, 4H), 1,44 - 1,30 (m, 4H), 1,26 (t, *J* = 7,1 Hz, 9H).

3,3'-((2-(((6-(benciloxi)hexil)oxi)metil)-2-((3-hidroxipropoxi)metil)propano-1,3-diil)bis(oxi))bis(propan-1-ol) (ST42)

Una solución de **6** (19,27 g, 30,7 mmol) en tetrahidrofurano seco (360 ml) se enfrió a una temperatura de 0 ºC. Después, a través de adición gota a gota, se añadió hidruro de litio y aluminio 2,4 M en tetrahidrofurano (128 ml, 307 mmol, 10 equiv.) durante un período de 1 hora. Una vez completada la adición, se continuó agitando durante la noche mientras se permitía que la mezcla de reacción alcanzase lentamente la temperatura ambiente. Tras el enfriamiento, la reacción se interrumpió mediante la adición lenta de agua (11,7 ml), NaOH acuoso 4 M (11,7 ml) y agua (35 ml). El precipitado de color blanco se retiró mediante filtración sobre un tapón de Na_2SO_4 seco seguido de aclarado dos veces con tetrahidrofurano. El filtrado se concentró al vacío y la purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 0-6 % en diclorometano) para obtener **ST42** en forma de un aceite incoloro (11,64 g, rendimiento del 72 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,38 - 7,27 (m, 5H), 4,50 (s, 2H), 3,74 (t, *J* = 5,4 Hz, 6H), 3,58 (t, *J* = 5,5 Hz, 6H), 3,47 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,40 (s, 6H), 3,36 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,32 (s, 2H), 3,29 (s, 3H), 1,79 (p, *J* = 5,4 Hz, 6H), 1,70 - 1,49 (m, 4H), 1,44 - 1,28 (m, 4H).

8,8-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)-1,1-bis(4-metoxifenil)-1,18-difenil-2,6,10,17-tetraoxaoctadecano (ST43DMTrBn)

Se retiró el agua residual de **ST42** (4,00 g, 7,99 mmol) mediante extracción dos veces con piridina, seguido de redisolución en piridina (165 ml) en atmósfera de argón. A la mezcla de reacción se le añadieron tamices moleculares 4A (8 g) y se continuó agitando durante 15 minutos. Se añadió DMTrCl sólido (13,54 g, 39,9 mmol, 5 equiv.) y la agitación de la mezcla ahora de color naranja oscuro continuó a temperatura ambiente. Después de 2 horas, se añadió DMTrCl adicional (4,06 g, 11,98 mmol, 1,5 equiv.) y se continuó agitando durante la noche. La reacción se filtró sobre un tapón de algodón y el filtrado se aplicó como recubrimiento sobre, con Et_3N neutralizada, sílice (40 g). La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-35 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST43DMTrBn** en forma de un aceite espumoso amarillo (10,44 g, rendimiento del 86 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,43 - 7,37 (m, 6H), 7,34 - 7,21 (m, 23H), 7,19 - 7,12 (m, 3H), 6,82 - 6,76 (m, 12H), 4,47 (s, 2H), 3,74 (s, 18H), 3,41 (dt, *J* = 14,6, 6,5 Hz, 8H), 3,26 - 3,16 (m, 10H), 3,06 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,78 (p, *J* = 6,5 Hz, 6H), 1,56 (p, 2H), 1,45 (p, *J* = 6,6 Hz, 2H), 1,38 - 1,21 (m, 4H).

6-(3-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)-2,2-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)propoxi)hexan-1-ol (ST43DMTrOH)

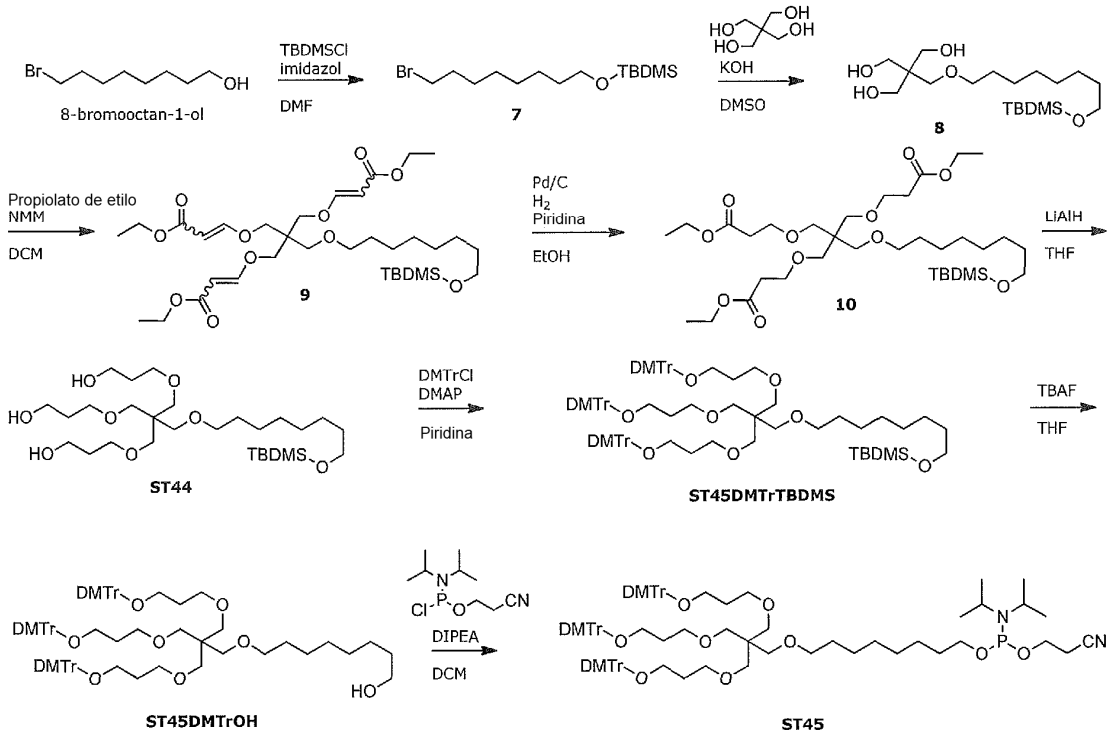
A una solución de **ST43DMTrBn** (10,2 g, 7,25 mmol) en tetrahidrofurano (200 ml) se le añadió de paladio al 5 % sobre carbono, Johnson Matthey de tipo 338 (2,313 g, 1,08 mmol, 0,15 equiv.). El matraz se cargó con hidrógeno (presión atmosférica) y después de 50 minutos de tiempo de reacción se lavó abundantemente con nitrógeno. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de Kieselguhr y se concentró al vacío. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-40 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST43DMTrOH** en forma de una espuma de color blanco (3,83 g, rendimiento del 38 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,44 - 7,36 (m, 6H), 7,34 - 7,21 (m, 18H), 7,20 - 7,13 (m, 3H), 6,84 - 6,73 (m, 12H), 3,75 (s, 18H), 3,62 - 3,53 (m, 2H), 3,40 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 3,27 - 3,16 (m, 10H), 3,07 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,79 (p, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,56 - 1,41 (m, 4H), 1,37 - 1,23 (m, 5H).

6-(3-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)-2,2-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)propoxi)hexil (2-cianoetil)diisopropilfosforamidita (ST43)

A una solución de **ST43DMtrOH** (3,83 g, 2,76 mmol) en diclorometano seco (50 ml) se le añadieron DIPEA (4,82 ml, 27,6 mmol, 10 equiv) y tamices moleculares 4A (7 g) seguido de enfriamiento a una temperatura de 0 ºC. Después, a la reacción se le añadió 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (0,948 g, 4,00 mmol, 1,45 equiv.) a través de

adición gota a gota durante un período de 15 minutos. La agitación de la mezcla de reacción continuó durante otros 15 minutos mientras se le permitía que alcanzase la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de algodón y el filtrado se aplicó como recubrimiento sobre, con Et_3N tratada, sílice (10 g). La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-30 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST43** en forma de un alquitrán incoloro (3,48 g, rendimiento del 83 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,44 - 7,37 (m, 6H), 7,33 - 7,20 (m, 18H), 7,19 - 7,13 (m, 3H), 6,83 - 6,75 (m, 12H), 3,87 - 3,69 (m, 20H), 3,66 - 3,51 (m, 4H), 3,39 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 3,28 - 3,15 (m, 10H), 3,07 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 2,60 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 1,79 (p, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,58 (p, *J* = 3,9 Hz, 2H), 1,46 (p, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,39 - 1,23 (m, 4H), 1,17 (t, *J* = 7,3 Hz, 12H).

ST45



((8-bromooctil)oxi)(*terc*-butil)dimetilsilano (7)

A una solución de 8-bromooctan-1-ol (8 g, 38,3 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (10 ml) se le añadió imidazol (6,51 g, 96 mmol, 2,5 equiv). Una vez que se obtuvo una solución transparente, se añadió TBDMS-Cl (7,50 g, 49,7 mmol, 1,2 equiv.) en porciones para observar una reacción exotérmica que alcanzó una temperatura máxima de 40 ºC. La agitación de la mezcla de reacción continuó durante la noche a temperatura ambiente. La suspensión de color amarillo obtenida se diluyó con Et_2O (40 ml) y se lavó con salmuera (40 ml). La capa acuosa se extrajo dos veces más con Et_2O (2x 40 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4. Después de concentrar al vacío, la purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-40 % de EtOAc en heptano) para obtener **7** en forma de un aceite incoloro (11,73 g, rendimiento del 95 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 3,60 (t, *J* = 6,6, 1,7 Hz, 2H), 3,41 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,85 (p, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,60 - 1,37 (m, 4H), 1,37 - 1,24 (m, 6H), 0,89 (s, 9H), 0,05 (s, 6H).

2-(((8-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)octil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (8)

A una suspensión de pentaeritritol (16,84 g, 124 mmol, 10 equiv.) en sulfóxido de dimetilo (45 ml) se le añadió hidróxido de potasio (6,94 g, 124 mmol, 10 equiv.) y esto se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, durante un período de 2 horas, se añadió 7 (4 g, 12,37 mmol, 1 equiv.). Una vez completada la adición, la agitación de la mezcla de reacción continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo tres veces con Et_2O (3x 150 ml) y todas las capas orgánicas se lavaron por separado con salmuera (50 ml). Las capas acuosas combinadas se extrajeron después una vez más con Et_2O (50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron al vacío. El aceite de color amarillo pálido se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-100 % de EtOAc en heptano) para obtener 8 en forma de un aceite incoloro (0,53 g, rendimiento del 11 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 3,72 (d, J = 3,7 Hz, 6H), 3,60 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,47 (s, 2H), 3,42 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,73 (s, 3H), 1,63 - 1,44 (m, 4H), 1,30 (s, 8H), 0,89 (s, 9H), 0,05 (s, 6H).

15,15-bis(((3-etoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)oxi)metil)-2,2,3,3-tetrametil-4,13,17-trioxa-3-silaicos-18-en-20-oato de

etilo (9)

A una solución de 8 (2,94 g, 7,76 mmol) en diclorometano (30 ml) se le añadió N-metilmorfolina (3,84 ml, 34,9 mmol, 4,5 equiv) y propiolato de etilo (3,7 ml, 36,5 mmol, 4,7 equiv.). Se observó una reacción exotérmica y se enfrió nuevamente a una temperatura de 20 ºC con el uso de un baño de hielo. La agitación de la mezcla de reacción continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un aceite de color marrón oscuro. La purificación de esto se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-40 % de EtOAc en heptano) para obtener 9 en forma de un aceite de color amarillo pálido (3,84 g, rendimiento del 73 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,54 (d, *J* = 12,6 Hz, 3H), 5,23 (d, *J* = 12,6 Hz, 3H), 4,16 (c, *J* = 7,1 Hz, 6H), 3,89 (s, 6H), 3,59 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,42 (s, 2H), 3,36 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 1,56 - 1,45 (m, 4H), 1,35 - 1,22 (m, 17H), 0,89 (s, 9H), 0,05 (s, 6H).

15,15-bis((3-etoxi-3-oxopropoxi)metil)-2,2,3,3-tetrametil-4,13,17-trioxa-3-silaicosan-20-oato de etilo (10)

A una solución de **9** (3,84 g, 5,71 mmol) en etanol (167 ml) se le añadió paladio al 10 % sobre carbono (0,304 g, 0,285 mmol, 0,05 equiv) y piridina (0,213 ml, 2,85 mmol, 0,5 equiv). La mezcla de reacción se cargó con hidrógeno (presión atmosférica) y la agitación de la mezcla continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de kieselguhr seguido de concentración del filtrado al vacío, lo que produjo 10 en forma de un aceite de color amarillo (3,86 g, rendimiento del 100 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 4,14 (c, *J* = 7,1 Hz, 6H), 3,64 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H), 3,59 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,40 - 3,28 (m, 10H), 2,53 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H), 1,55 - 1,46 (m, 4H), 1,35 - 1,23 (m, 17H), 0,89 (s, 9H), 0,05 (s, 6H).

15,15-bis((3-hidroxipropoxi)metil)-2,2,3,3-tetrametil-4,13,17-trioxa-3-silaicosan-20-ol (ST44)

Una solución de **10** (3,86 g, 5,69 mmol) en tetrahidrofurano seco (67 ml) se enfrió a una temperatura de -5 ºC. Después, a través de adición gota a gota, se añadió hidruro de litio y aluminio 2,4 M en tetrahidrofurano (24 ml, 57 mmol, 10 equiv.) durante un período de 1 hora. Tras completar la adición, se continuó agitando durante la noche mientras se permitía que la mezcla de reacción alcanzase lentamente la temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla de reacción se enfrió a una temperatura de 0 ºC y se inactivó mediante la adición discontinua de sulfato de sodio decahidratado (18,32 g, 56,9 mmol, 10 equiv.). El precipitado de color blanco se retiró mediante filtración sobre un tapón de Na_2SO_4 seco seguido de aclarado dos veces con tetrahidrofurano. El filtrado se concentró al vacío y la purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-7 % de MeOH en diclorometano) para obtener **ST44** en forma de un aceite de color amarillo pálido (1,96 g, rendimiento del 60 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 3,75 (t, *J* = 5,3 Hz, 6H), 3,64 - 3,55 (m, 8H), 3,48 - 3,27 (m, 13H), 1,80 (h, *J* = 5,4, 4,8 Hz, 6H), 1,58 - 1,46 (m, 4H), 1,36 - 1,25 (m, 8H), 0,89 (s, 9H), 0,05 (s, 6H).

8,8-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)-1,1-bis(4-metoxifenil)-20,20,21,21-tetrametil-1-fenil-2,6,10,19-tetraoxa-20-siladocosano (ST45DMTrTBDMS)

Se retiró el agua residual de **ST44** (1,94 g, 3,51 mmol) mediante extracción dos veces con piridina, seguido de redisolución en piridina (70 ml) en atmósfera de argón. A la mezcla de reacción se le añadieron tamices moleculares 4A (4 g) y se continuó agitando durante 15 minutos. Se añadió DMTrCl sólido (4,16 g, 12,28 mmol, 3,5 equiv.) en lotes durante un período de dos horas. Después de otras 1,5 horas, se añadió DMTrCl adicional (2,38 g, 7,02 mmol, 2 equiv.) y la agitación de la mezcla ahora de color naranja oscuro continuó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió mediante la adición de MeOH (4,4 ml, 109 mmol, 31 equiv.) y se agitó durante 15 minutos. Después, la mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de algodón y el filtrado se aplicó como recubrimiento sobre, con Et_3N neutralizada, sílice (20 g). La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-100 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST45DMTrTBDMS** en forma de un aceite espumoso amarillo (0,44 g, rendimiento del 8 %). El material de partida y los intermedios se recuperaron con un rendimiento del 60 %. RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,43 - 7,38 (m, 6H), 7,27 (c, *J* = 8,1, 7,3 Hz, 18H), 7,19 - 7,13 (m, 3H), 6,81 - 6,76 (m, 12H), 3,76 (s, 18H), 3,58 (td, *J* = 6,5, 3,0 Hz, 2H), 3,44 (dt, *J* = 33,9, 6,4 Hz, 6H), 3,35 - 3,16 (m, 10H), 3,07 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,79 (h, *J* = 6,3 Hz, 6H), 1,52 - 1,39 (m, 4H), 1,34 - 1,20 (m, 8H), 0,89 (s, 9H), 0,04 (s, 6H).

8-(3-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)-2,2-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)propoxi)octan-1-ol (ST45DMTrOH)

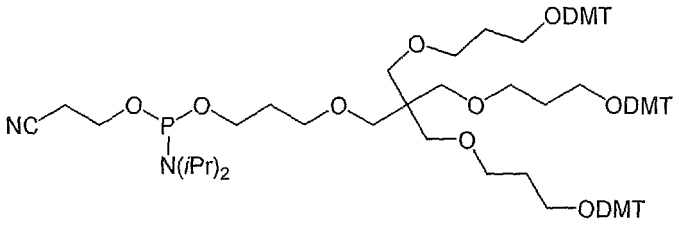
A una solución de **ST45DMTrTBDMS** (2,20 g, 1,507 mmol) en tetrahidrofurano seco (12 ml) se le añadió TBAF 1 M en tetrahidrofurano (1,688 ml, 1,688 mmol, 1,12 equiv.) y esto se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío y la purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-100 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST45DMTrOH** en forma de un aceite incoloro (1,74 g, rendimiento del 83 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,44 - 7,37 (m, 6H), 7,34 - 7,21 (m, 18H), 7,20 - 7,12 (m, 3H), 6,82 - 6,75 (m, 12H), 3,75 (s, 18H), 3,59 (c, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,40 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H), 3,26 - 3,15 (m, 10H), 3,07 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,79 (p, *J* = 6,4 Hz, 6H), 1,56 - 1,39 (m, 4H), 1,37 - 1,20 (m, 9H).

8-(3-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)-2,2-bis((3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)propoxi)metil)propoxi)octil (2-cianoetil)diisopropilfosforamidita (ST45)

A una solución de **ST45DMtrOH** (1,9 g, 1,412 mmol) en diclorometano seco (25 ml) se le añadió DIPEA (2,466 ml, 14,12 mmol, 10 equiv) y tamices moleculares 4A (3,8 g) seguido de enfriamiento a una temperatura de 0 ºC. Después, a la reacción se le añadió 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (0,401 g, 1,694 mmol, 1,2 equiv.) a través de adición gota a gota durante un período de 5 minutos. La agitación de la mezcla de reacción continuó durante otros 15 minutos mientras se le permitía que alcanzase la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre un tapón de algodón y el filtrado se aplicó como recubrimiento sobre, con Et_3N tratada, sílice (7,5 g). La purificación se realizó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (0-100 % de EtOAc en heptano, Et_3N al 5 %) para obtener **ST45** en forma de un aceite transparente (1,37 g, rendimiento del 59 %). RMN ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,44 - 7,37 (m, 6H), 7,33 - 7,20 (m, 18H), 7,19 - 7,13 (m, 3H), 6,82 - 6,74 (m, 12H), 3,88 - 3,70 (m, 20H), 3,68 - 3,52 (m, 4H), 3,39 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 3,30 - 3,15 (m, 10H), 3,07 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H), 2,61 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 1,79 (h, *J* = 6,5, 5,9 Hz, 6H), 1,63 - 1,54 (m, 2H), 1,50 - 1,40 (m, 2H), 1,37 - 1,21 (m, 8H), 1,17 (t, *J* = 6,4 Hz, 12H).

Ejemplo 3 - Síntesis de conjugados de ácido nucleico

Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador de oligopiloto AKTA. Se usaron soporte sólido disponible en el mercado y fosforamiditas de 2'O-Metil ARN, 2'Fluoro, 2'Desoxi ARN fosforamiditas y fosforamidita triple larga (STKS) (investigación de Glen) disponible en el mercado. La síntesis, la desprotección y la purificación de oligonucleótidos siguieron los procedimientos convencionales que se conocen en la técnica. La síntesis de oligonucleótidos y conjugados de oligonucleótidos fue realizada por un fabricante comercial de oligonucleótidos (Biospring, Frankfurt, Alemania).



STKS

La conjugación de los sintones de GalNAc (ST21, ST23, ST31) o sintones triples (STKS, ST41, ST43, ST45) se consiguió mediante el acoplamiento de la fosforamidita respectiva al extremo 5' de la oligocadena en condiciones convencionales de acoplamiento de fosforamidita. Se introdujeron fosforotioatos usando reactivos de tiolación convencionalaes disponibles en el mercado (EDITH, tecnologías Link).

Las cadenas individuales se separaron de la GPC usando metilamina acuosa y el oligonucleótido bruto resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico (Recurso Q, 6 ml, GE Healthcare) en un sistema de HPLC AKTA Pure usando un gradiente de cloruro de sodio. Las fracciones que contenían producto se agruparon, se desalaron en una columna de exclusión por tamaño (Zetadex, EMP Biotech) y se liofilizaron.

Para la Duplexación, se disolvieron cantidades equimolares de las cadenas individuales respectivas en agua y se calentaron a 80 ºC durante 5 min. Después de enfriar, el Dúplex resultante se liofilizó.

Tabla 2: Datos de espectrometría de masas para oligonucleótidos

Oligonucleótido	EM encontrado	EM calculado
cadena antisentido (TTR y STS016)	6943 Da	6943,33 Da
Cadena sentido TTR CF02	8603,17 Da	8604 Da
Cadena sentido TTR CF02V20	8490,38 Da	8490,62 Da
Cadena sentido TTR CF02V21	8554,87 Da	8554,62 Da
Cadena sentido TTR CF02V22	8310,02 Da	8310,47 Da
Cadena sentido TTR CF02V23	8374,13 Da	8374,47 Da
Cadena sentido STS016 L4	8388 Da	8388,47 Da
Cadena sentido STS016 L5	8471 Da	8472,47 Da
Cadena sentido STS016 L6	8415 Da	8416,47 Da
Cadena sentido STS016 L7	8500 Da	8500,47 Da
Cadena sentido STS016 L8	8444 Da	8444,47 Da
Cadena sentido STS016 L9	8528 Da	8528,47 Da
GN_Luc antisentido	6260 Da	6259,93 Da

(continuación)

Oligonucleótido	EM encontrado	EM calculado
GN_Luc sentido	7799 Da	7800,21 Da
GN_PTENV10F antisentido	6320,43 Da	6318 Da
GN_ PTENV10F sentido	7727,24 Da	7727,17 Da

Síntesis de molécula de conjugado de ácido nucleico comparativa - TTR CF02

Secuencia de oligonucleótidos:

Cadena antisentido 5'**u**(ps)u(ps)**a** u**a**g **a**g**c** a**a**g **a**a**c** a**c**u **g**(ps)u(ps)**u** 3'

Cadena sentido 3' aminohexil a**a**u **a**u**c** u**c**g **u**u**c** u**u**g **u**g**a** c(ps)**a**(ps)a 5'

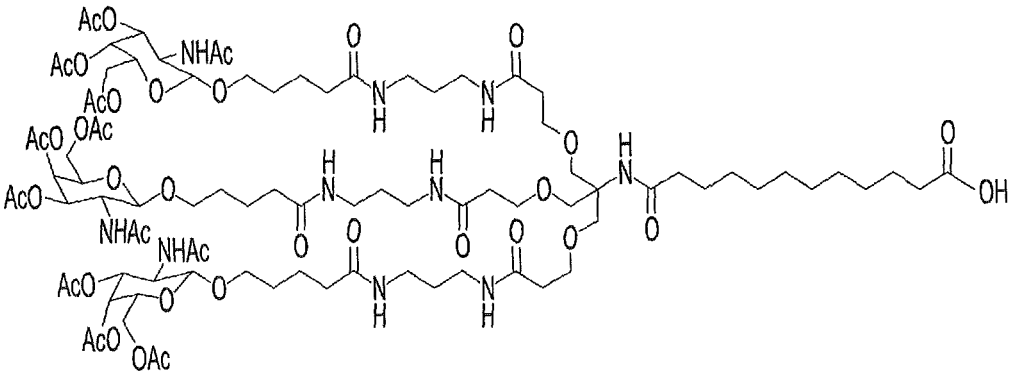
Clave de modificaciones:

negrita = 2'OMe ribonucleótido

subrayado = 2'F/2'desoxirribonucleótido

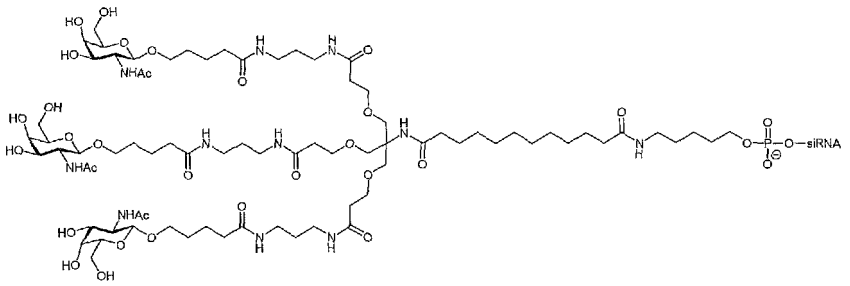
ps = fosforotioato

La cadena sentido se modificó después de la síntesis con un éster activado (NHS) del enlazador GalNAc ST13:



La síntesis de ST13 y el acoplamiento se realizaron de manera similar a los procedimientos publicados (Ostergaard, *Bioconjug Chem.* 19 de agosto de 2015; 26 (8):1451-5), con la diferencia de que se usó NHS en lugar de éster activo de PFP.

Estructura del conjugado final (TTR CF02):



Secuencias:

Clave de modificaciones para las siguientes secuencias:

negrita = 2'O-Metil ribonucleótido

subrayado = 2'Fluoro/2'desoxirribonucleótido

ps = enlace de fosforotioato

TTR CF02:

Cadena antisentido 5'**u**(ps)u(ps)**a** u**a**g a**g**c a**a**g **a**a**c** a**c**u **g**(ps)u(ps)**u** 3'
Cadena sentido 3'ST13 aminohexil a**a**u **a**u**c** u**c**g **u**u**c** u**u**g **u**g**a** c(ps)**a**(ps)a 5'

TTR CF02V20

Cadena antisentido 5'**u**(ps)u(ps)**a** u**a**g **a**g**c** a**a**g **a**a**c** a**cu** **g**(ps)u(ps)**u** 3'
Cadena sentido 3'a(ps)**a**(ps)u **a**uc u**c**g **u**u**c** u**u**g **u**g**a** c**a**a STKS $(ST21)_3$ 5'

TTR CF02V21

Cadena antisentido 5'**u**(ps)u(ps)**a** u**a**g **a**g**c** a**a**g **a**ac a**c**u **g**(ps)u(ps)**u** 3'
Cadena sentido 3'a(ps)**a**(ps)u **a**u**c** u**c**g **u**u**c** u**u**g **u**g**a** c**a**a (ps) STKS (ps) $(ST21)_3$ 5'

TTR CF02V22

Cadena antisentido 5'**u**(ps)u(ps)**a** u**a**g **a**g**c** a**a**g **a**a**c** a**c**u **g**(ps)u(ps)**u** 3'
Cadena sentido 3'a(ps)**a**(ps)u **a**u**c** u**c**g **u**u**c** u**u**g **u**g**a** c**a**a STKS $(ST23)_3$ 5'

TTR CF02V23

Cadena antisentido 5'**u**(ps)u(ps)**a** u**a**g **a**g**c** a**a**g **a**a**c** a**c**u **g**(ps)u(ps)**u** 3'
Cadena sentido 3'a(ps)**a**(ps)u **a**u**c** u**c**g **u**u**c** u**u**g **u**g**a** c**a**a (ps) STKS (ps) $(ST23)_3$ 5'

Clave de modificaciones para las siguientes secuencias:
f indica 2'Fluoro 2'desoxirribonucleótido
m indica 2'O Metil ribonucleótido
(ps) indica enlace de fosforotioato

STS016-L4

Cadena antisentido:

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3'

Cadena sentido:

5' $(ST23\ (ps))_3$ ST41 (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA 3'

STS016-L5

Cadena antisentido:

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3'

Cadena sentido:

5' (ST31 (ps))3 ST41 (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA 3'

STS016-L6

Cadena antisentido:

5’ mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3’

Cadena sentido:

5’ (ST23 (ps))$_3$ ST43 (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA 3’

STS016-L7

Cadena antisentido:

5’ mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3’

Cadena sentido:

5’ (ST31 (ps))$_3$ ST43 (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA 3’

STS016-L8

Cadena antisentido:

5’ mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3’

Cadena sentido:

5’ (ST23 (ps))$_3$ ST45 (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA

STS016-L9

Cadena antisentido:

5’ mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3’

Cadena sentido:

5' (ST31 (ps))$_3$ ST45 (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA 3'

GN_Luc (control no dirigido)

Cadena antisentido:

5'mU (ps)fC(ps)mGfAmAfGmUfAmUfUmCfCmGfCmGfUmA (ps) fC(ps)mG 3'

Cadena sentido:

5´(ST23(ps))$_3$ STKS (ps)fCmGfUmAfCmGfCmGfGmAfAmUfAmCfUmUfC (ps)mG (ps)fA 3´

GN_PTENV10F

Antisentido

5'mU(ps)fA(ps)fAmGfUmUmCfUmAfGmCfUmGfUmGfGmU(ps)fG(ps)mG 3'

Sentido

5´(ST23(ps))$_3$ STKS (ps) fCmCfAmCfCmAfCmAfGmCfUmAfGmAfAmCfU(ps)mU(ps)fA 3´

Ejemplo 4 - Ensayo *in vivo* y duración de inactivación de TTR en ratones

Se inyectaron ratones C57BL/6JOlaHsd macho de 8 semanas de edad con la dosis respectiva con una inyección subcutánea única de 300 ul/kg (4 animales por grupo).

En cada punto temporal se sacrificaron ratones, se recogió el hígado y se analizó para determinar el ARNm de TTR usando análisis TAQman.

Expresión génica objetivo *in vivo*:

Se aisló ARN total del tejido hepático fresco esencialmente como se describe en Fehring et al. 2014:
Para análisis de inactivación de ARNm objetivo, se diseccionaron los tejidos inmediatamente después del sacrificio de los ratones y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Se homogenizaron aproximadamente 20 mg de tejido en un Molino Mezclador MM 301 (Retsch GmbH, Haan, Alemania) usando perlas de carburo de wolframio (Qiagen, Hilden, Alemania). Se aisló ARNTotal del lisado con el Invisorb Spin Tissue RNA MiniKit (Invitek, Berlín, Alemania). Dependiendo del tejido, se usaron 25-100 ng de ARN total para RT-PCR cuantitativa TaqMan con los conjuntos de amplicón obtenidos en BioTez GmBH, Berlín, Alemania: Las reacciones de RT-PCR TaqMan se realizaron con un detector de secuencia ABI PRISM 7700 (Software: Sequence Detection System v1.6.3 (ABI Life Technologies)) o StepOnePlus Real Time PCR System (ABI) usando un protocolo estándar para RT-PCR (como se describe en Fehring et al. 2014) con cebadores y sondas a una concentración de 300 y 100 nmol/l respectivamente. Se calcularon datos de TaqMan usando el método Ct comparativo. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a PTEN.

Conjuntos de amplicón para la detección de ARNm de TTR

mmTTR: 467U22	TGGACACCAAATCGTACTGGAA
mmTTR: 550L22	CAGAGTCGTTGGCTGTGAAAAC
mmTTR: 492U27FL	ACTTGGCATTTCCCCGTTCCATGAATT

Conjuntos de amplicón para la detección de ARNm de PTEN

PTEN	CACCGCCAAATTTAACTGCAGA
PTEN	AAGGGTTTGATAAGTTCTAGCTGT
PTEN	TGCACAGTATCCTTTTGAAGACCATAACCCA

Se usó el anterior método, con una sola dosis subcutánea de 1 mg/kg. Los ratones se sacrificaron 2 días después de

la inyección. Los compuestos sometidos a ensayo fueron TTR CF02, TTR CF02V20, TTR CF02V21, TTR CF02V22 y TTR CF02V23. La introducción de fosforotioatos en el sistema enlazador GalNAc (TTR CF02V21 y TTR CF02V23) mostró una potencia sustancialmente mayor en comparación con el enlace fosfodiéster convencional (TTR CF02V20 y TTR CF02V22). Los resultados se muestran en la Figura 2.

Se usó el anterior método, con una sola dosis subcutánea de 2 mg/kg. Se sacrificaron ratones en puntos temporales dados (7, 14, 21 y 28 días después de la inyección). Los compuestos sometidos a ensayo fueron PTEN CF02 (control), TTR CF02, TTR CF02V21 y TTR CF02V23. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 5 - Titulación de dosis de TTR CF02V21 y TTR CF02V23

Se inyectaron ratones C57BL/6JOlaHsd macho de 8 semanas de edad con la dosis respectiva (3, 1, 0,3, 0,1 mg/kg) con una inyección subcutánea única de 300 ul/kg (4 animales por grupo). Se usó PBS como control. Después de dos días se sacrificaron los ratones, se recogió el hígado y se analizó para determinar el ARNm de TTR usando análisis TAQman. El análisis de las muestras se realizó como en el Ejemplo 4.

Ambos conjugados de GalNAc de ARNip TTR CF02V21 y TTR CF02V23 fueron muy eficaces para reducir los niveles de TTR de una manera dependiente de la dosis. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 6 - Determinación *in vitro* de inactivación de TTR de diversos conjugados de GalNAc de ARNip de TTR

La determinación *in vitro* de la inactivación de TTR de diversos conjugados de GalNAc de ARNip de TTR STS016 L4-L9 se determinó en un ensayo de hepatocitos.

Los hepatocitos primarios (tecnología Life) se sembraron en placas de 6 pocillos (600.000 células por pocillo) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se incubaron con la concentración respectiva del conjugado de GalNac. Las células se cosecharon 24 h después de la incubación y el ARN se aisló y analizó usando análisis Taqman como en el Ejemplo 4.

Todos los diferentes conjugados de GalNAc de ARNip STS016 L4-L9 fueron muy eficaces para reducir los niveles de TTR. Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6. TTR CF02V23 representa el control positivo. GN_Luc representa el control negativo.

Ejemplo 7 - Ensayo *in vivo* y duración de la inactivación de TTR en ratones

Se inyectaron ratones C57BL/6JOlaHsd macho de 8 semanas de edad con la dosis de 1 mg/kg con una inyección subcutánea única de 300 ul/kg (4 animales por grupo).

Se extrajo sangre después de cada punto temporal (día 8, 15, 22 después de la inyección) y se analizó el nivel de TTR usando el kit Elisa específico de TTR murino disponible en el mercado.

Todos los diferentes conjugados de GalNAc de ARNip STS016 L4-L9 fueron muy eficaces para reducir los niveles de TTR. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 8 - Ensayo *in vivo* de inactivación de PTEN en ratones

Se inyectaron ratones C57BL/6JOlaHsd macho de 8 semanas de edad con la dosis respectiva (1, 3, 10 mg/kg) con una inyección subcutánea única de 300 ul/kg (4 animales por grupo). Se usó PBS como control.

2 días después de la administración, se sacrificaron los ratones, se recogió el hígado y se analizó para determinar el ARNm de PTEN usando análisis TAQman.

<u>Expresión génica objetivo *in vivo*</u>:

Se aisló ARN total del tejido hepático fresco esencialmente como se describe en Fehring et al. 2014:
Para análisis de inactivación de ARNm objetivo, se diseccionaron los tejidos inmediatamente después del sacrificio de los ratones y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Se homogenizaron aproximadamente 20 mg de tejido en un Molino Mezclador MM 301 (Retsch GmbH, Haan, Alemania) usando perlas de carburo de wolframio (Qiagen, Hilden, Alemania). Se aisló ARNTotal del lisado con el Invisorb Spin Tissue RNA MiniKit (Invitek, Berlín, Alemania). Dependiendo del tejido, se usaron 25-100 ng de ARN total para RT-PCR cuantitativa TaqMan con los conjuntos de amplicón obtenidos en BioTez GmBH, Berlín, Alemania: Las reacciones de RT-PCR TaqMan se realizaron con un detector de secuencia ABI PRISM 7700 (Software: Sequence Detection System v1.6.3 (ABI Life Technologies)) o StepOnePlus Real Time PCR System (ABI) usando un protocolo estándar para RT-PCR (como se describe en Fehring et al. 2014) con cebadores y sondas a una concentración de 300 y 100 nmol/l respectivamente. Las sondas TaqMan para PTEN fueron las mismas que se describen en el Ejemplo 4.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Se demostró una inactivación clara dependiente de la dosis de PTEN.

Referencias:-

1. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391 (6669), 806-11.

2. Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T., *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. *Genes & development* 2001, 15 (2), 188-200.

3. Dubber, M.; Frechet, J. M., *Solid-phase synthesis of multivalent glycoconjugates on a DNA synthesizer*. *Bioconjugate chemistry* 2003, 14 (1), 239-46.

4. Weigel, P. H.; Yik, J. H., *Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chon- droitin sulfate receptors. Biochim Biophys Acta* 2002, 1572 (2-3), 341-63.

5. Ishibashi, S.; Hammer, R. E.; Herz, J., *Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the minor receptor subunit*. *J Biol Chem* 1994, 269 (45), 27803-6.

6. Biessen, E. A.; Broxterman, H.; van Boom, J. H.; van Berkel, T. J., *The cholesterol derivative of a triantennary galactoside with high affinity for hepatic asialoglycoprotein receptor: a potent cholesterol lowering agent. J Med Chem* 1995, 38 (11), 1846-52.

7. Akinc, A.; Querbes, W.; De, S.; Qin, J.; Frank-Kamenetsky, M.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Rajeev, K. G.; Cantley, W. L.; Dorkin, J. R.; Butler, J. S.; Qin, L.; Racie, T.; Sprague, A.; Fava, E.; Zeigerer, A.; Hope, M. J.; Zerial, M.; Sah, D. W.; Fitzgerald, K.; Tracy, M. A.; Manoharan, M.; Koteliansky, V.; Fougerolles, A. d.; Maier, M. A., *Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010, 18 (7), 1357-1364.

8. Fehring, V.; Schaeper, U.; Ahrens, K.; Santel, A.; Keil, O.; Eisermann, M.; Giese, K.; Kaufmann, J., *Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel Lipoplex formulation DACC. Mol Ther* 2014, 22 (4), 811-20.

9. Prakash, T. P.; Brad Wan, W.; Low, A.; Yu, J.; Chappell, A. E.; Gaus, H.; Kinberger, G. A.; Østergaard, M. E.; Migawa, M. T.; Swayze, E. E.; Seth, P. P., *Solid-phase synthesis of 5'-triantennary N-acetylgalactosamine conjugated antisense oligonucleotides using phosphoramidite chemistry. Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2015, 25 (19), 4127-4130.

10. Li, L.-C.; Okino, S. T.; Zhao, H.; Pookot, D.; Place, R. F.; Urakami, S.; Enokida, H.; Dahiya, R., *Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103 (46), 17337-17342.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Silence Therapeutics GmbH
<120> Conjugados novedosos

<130> P110399WO/KVC
<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TTR CF02 - Cadena antisentido

<400> 1
uuauagagca agaacacugu u 21

<210> 2
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TTR CF02 - Cadena sentido

<400> 2
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 3
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena antisentido GN_Luc

<400> 3
ucgaaguauu ccgcguacg 19

<210> 4
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena sentido GN_Luc

<400> 4
cguacgcgga auacuucga 19

<210> 5
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena antisentido GN_PTENV10F

<400> 5
uaaguucuag cuguggugg 19

<210> 6
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena sentido GN_PTENV10F

<400> 6
ccaccacagc uagaacuua 19

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> mmTTR:467U22

<400> 7
tggacaccaa atcgtactgg aa 22

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> mmTTR:550L22

<400> 8
cagagtcgtt ggctgtgaaa ac 22

<210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> mmTTR:492U27FL

<400> 9
acttggcatt tccccgttcc atgaatt 27

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón para la detección de ARNm de PTEN

<400> 10
caccgccaaa tttaactgca ga 22

<210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón para la detección de ARNm de PTEN

<400> 11
aagggtttga taagttctag ctgt 24

<210> 12
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón para la detección de ARNm de PTEN

<400> 12
tgcacagtat ccttttgaag accataaccc a 31

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula (I):

$$[S\text{-}X^1\text{-}P\text{-}X^2]_3\text{-}A\text{-}X^3\text{-}Z \qquad (I)$$

en la que:

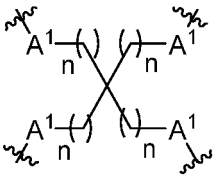
S representa un sacárido;
X^1 representa alquileno C_3-C_6 o un tallo de etilenglicol $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3;
P es un tiofosfato;
X^2 es alquileno o un alquilén éter de fórmula $(-CH_2)_n-O-CH_2-$ donde n = 1-6;
A es una unidad de ramificación;
X^3 representa una unidad de unión;
Z es un ácido nucleico;
y donde el enlace entre X^3 y Z es un fosfato o un tiofosfato.

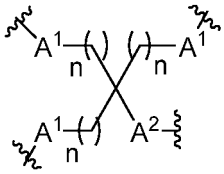
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de fórmula (II):

$$[S\text{-}X^1\text{-}P\text{-}X^2]_3\text{-}A\text{-}X^3\text{-}Z \ (II)$$

en la que:

S representa un sacárido;
X^1 representa alquileno C_3-C_6 o un tallo de etilenglicol $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3;
P es un tiofosfato;
X^2 es alquileno C_1-C_8;
A es una unidad de ramificación seleccionada entre:



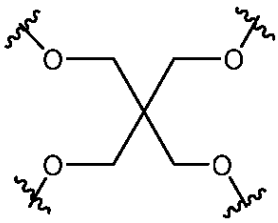


A^1 = O, NH
n = 1 a 4

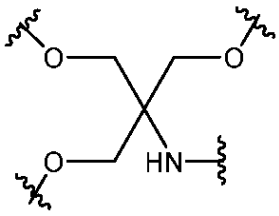
A^1 = O, NH A^2 = NH, CH_2, O
n = 1 a 4

X^3 es una unidad de unión;
Z es un ácido nucleico;
y donde el enlace entre X^3 y Z es un fosfato o un tiofosfato.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde A tiene la estructura:



; o



,

en las que X^3 está unido al átomo de nitrógeno.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X^3 se selecciona entre -alquilen C_1-C_{20}-, -alquenilen C_2-C_{20}-, un alquilén éter de fórmula -(alquilen C_1-C_{20})-O-(alquilen C_1-C_{20})-, -C(O)-alquilen C_1-C_{20}-, -alquilen C_0-C_4(Ci)alquilen C_0-C_4- en donde Ci representa un anillo cicloalquileno, arileno, heterociclileno o heteroarileno sustituido o sin sustituir de 5 o 6 miembros, -alquilen C_1-C_4-NHC(O)-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-C(O)NH-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-SC(O)-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-C(O)S-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-OC(O)-alquilen C_1-C_4-, -alquilen C_1-C_4-C(O)O-alquilen C_1-C_4- y -alquilen C_1-C_6-S-S-alquilen C_1-C_6-.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde X^3 es un alquilén éter de fórmula -(alquilen C_1-C_{20})-O-

(alquilen C_1-C_{20})-; opcionalmente en donde:

a) X^3 es un alquilén éter de fórmula -(alquilen C_1-C_{20})-O-(alquilen C_4-C_{20})-, en donde dicho (alquileno C_4-C_{20}) se une a Z; o
b) X^3 se selecciona entre el grupo que consiste en $-CH_2-O-C_3H_6-$, $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$, especialmente $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$, en donde en cada caso el grupo $-CH_2-$ está unido a A.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde X^3 es alquileno C_1-C_{20}; opcionalmente en donde X^3 se selecciona entre el grupo que consiste en $-C_3H_6-$, $-C_4H_8-$, $-C_6H_{12}-$ y $-C_8H_{16}-$, especialmente $-C_4H_8-$, $-C_6H_{12}-$ y $-C_8H_{16}-$.

7. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es de fórmula (III):

$$[S-X^1-P-X^2]_3-A-X^3-Z \qquad (III)$$

en donde:

S representa un sacárido;
X^1 representa alquileno C_3-C_6 o un tallo de etilenglicol $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3;
P es un tiofosfato;
X^2 es un alquilén éter de fórmula $-C_3H_6-O-CH_2-$;
A es una unidad de ramificación;
X^3 es un alquilén éter de fórmula seleccionada entre el grupo que consiste en $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-O-C_2H_4-$, $-CH_2-O-C_3H_6-$, $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_5H_{10}-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$, $-CH_2-O-C_7H_{14}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$, en donde en cada caso el grupo $-CH_2-$ está unido a A;
Z es un ácido nucleico;
y en donde el enlace entre X^3 y Z es un fosfato o un tiofosfato.

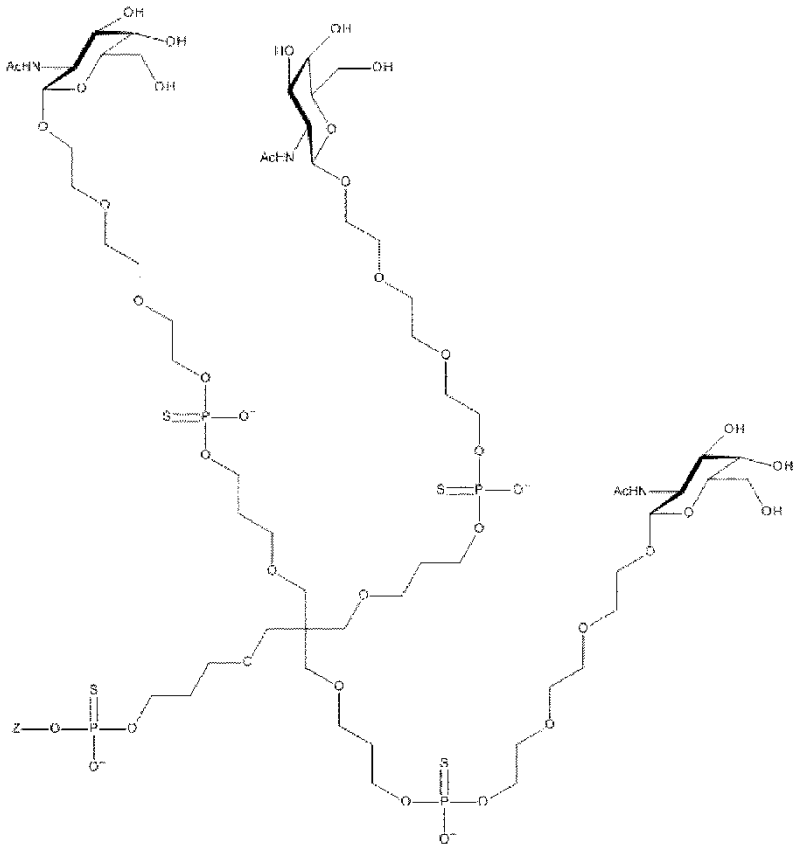
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la unidad de ramificación comprende carbono; opcionalmente en donde la unidad de ramificación es un átomo de carbono.

9. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en donde X^3 se selecciona entre el grupo que consiste en $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_5H_{10}-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$, $-CH_2-O-C_7H_{14}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$; opcionalmente en donde X^3 se selecciona entre el grupo que consiste en $-CH_2-O-C_4H_8-$, $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ y $-CH_2-O-C_8H_{16}-$.

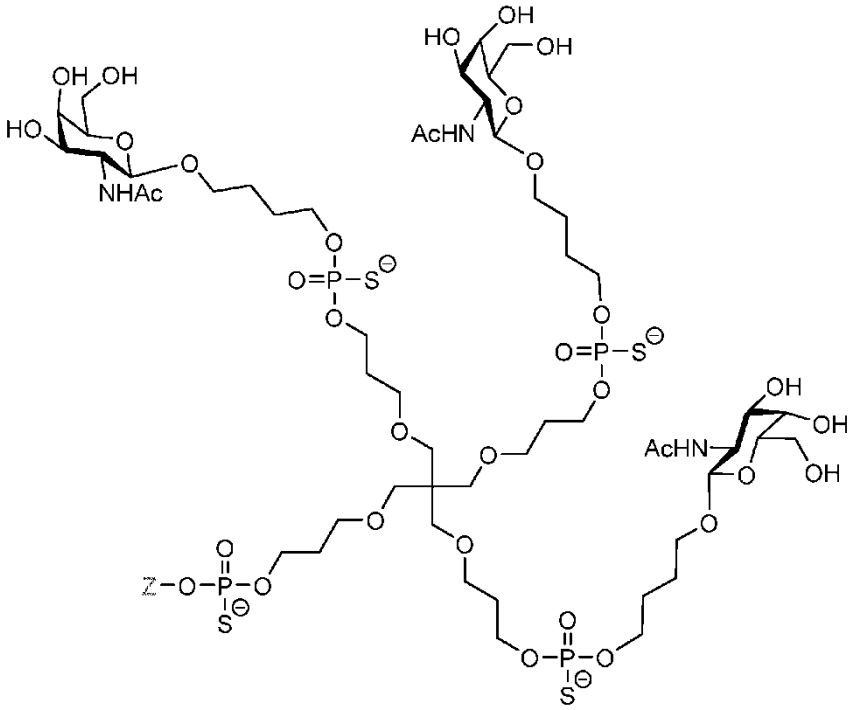
10. Un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el sacárido se selecciona entre N-acetil galactosamina, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina y fructosa; opcionalmente en donde el sacárido es N-acetil galactosamina.

11. Un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde X^1 representa alquileno C_3-C_6.

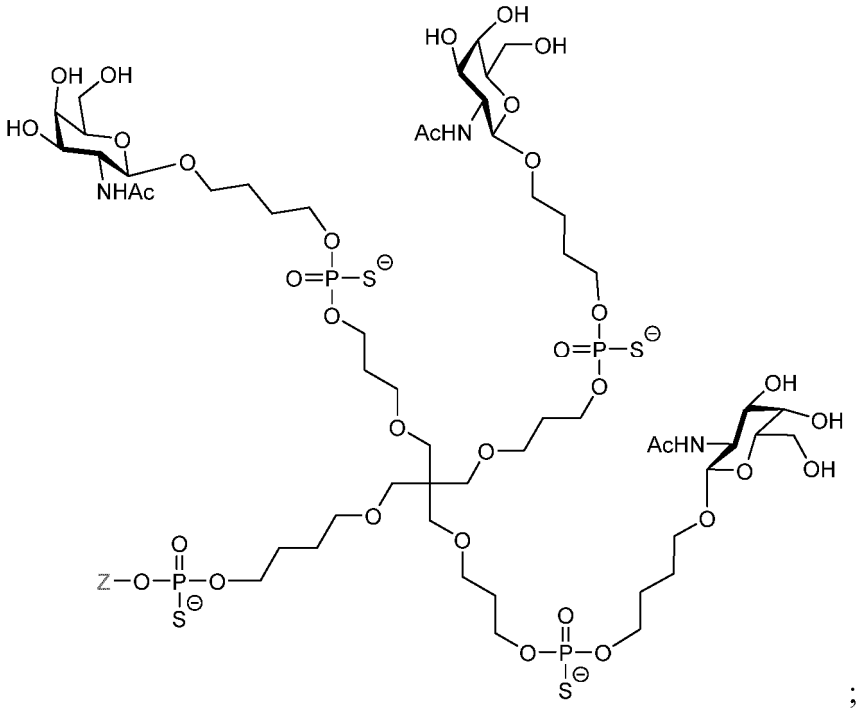
12. Un compuesto seleccionado entre las siguientes fórmulas:



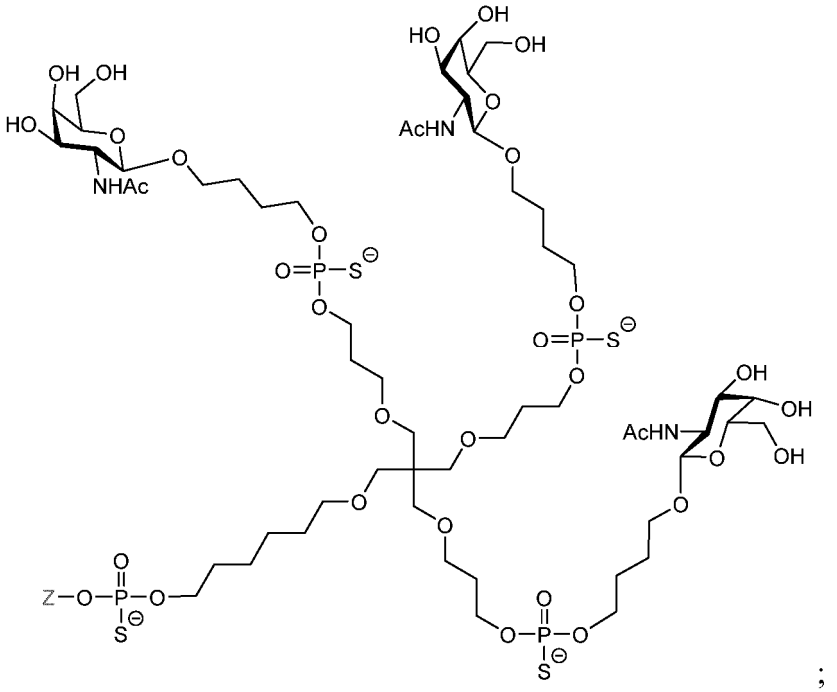
;



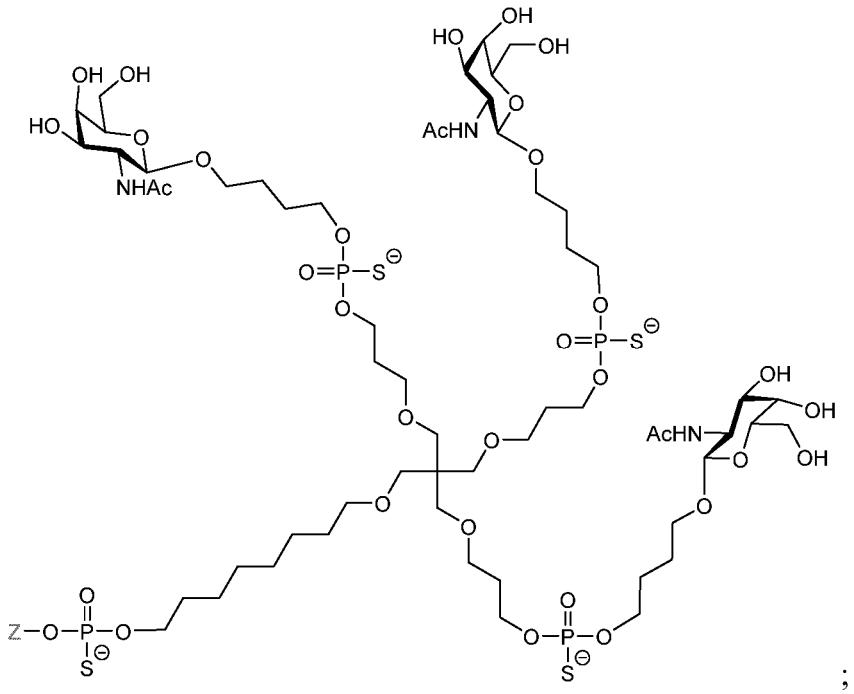
;



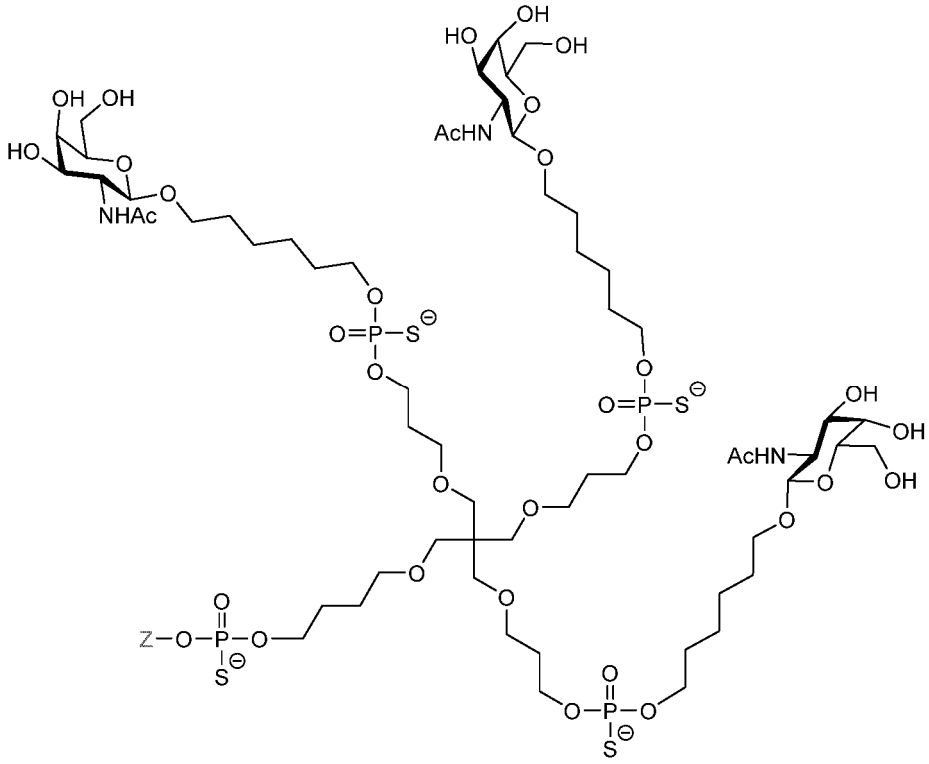
;



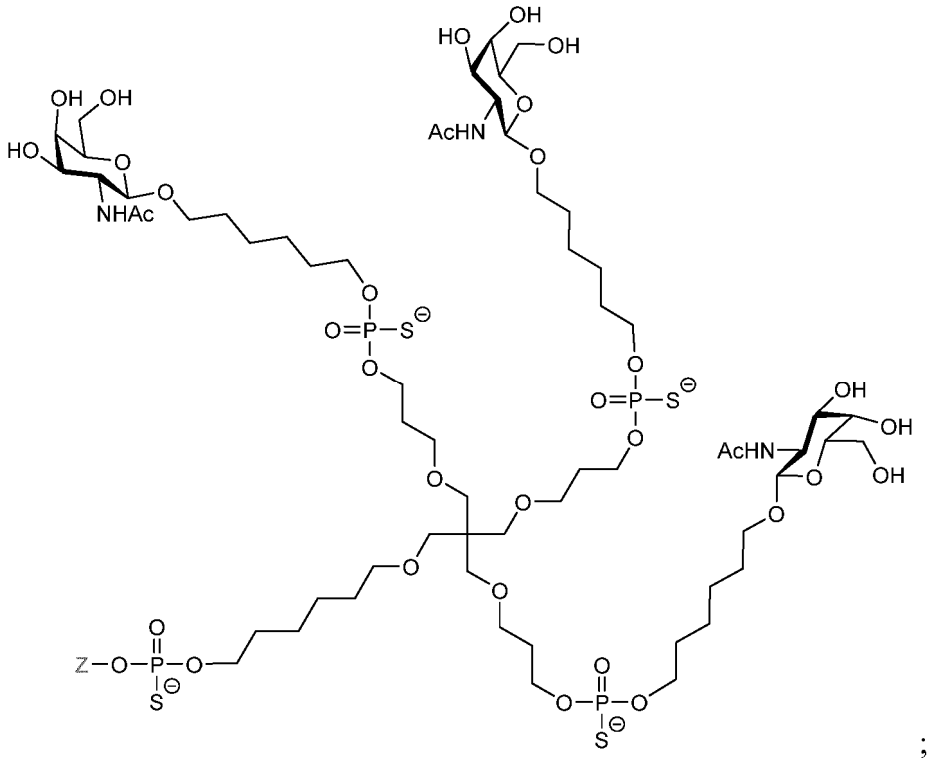
;



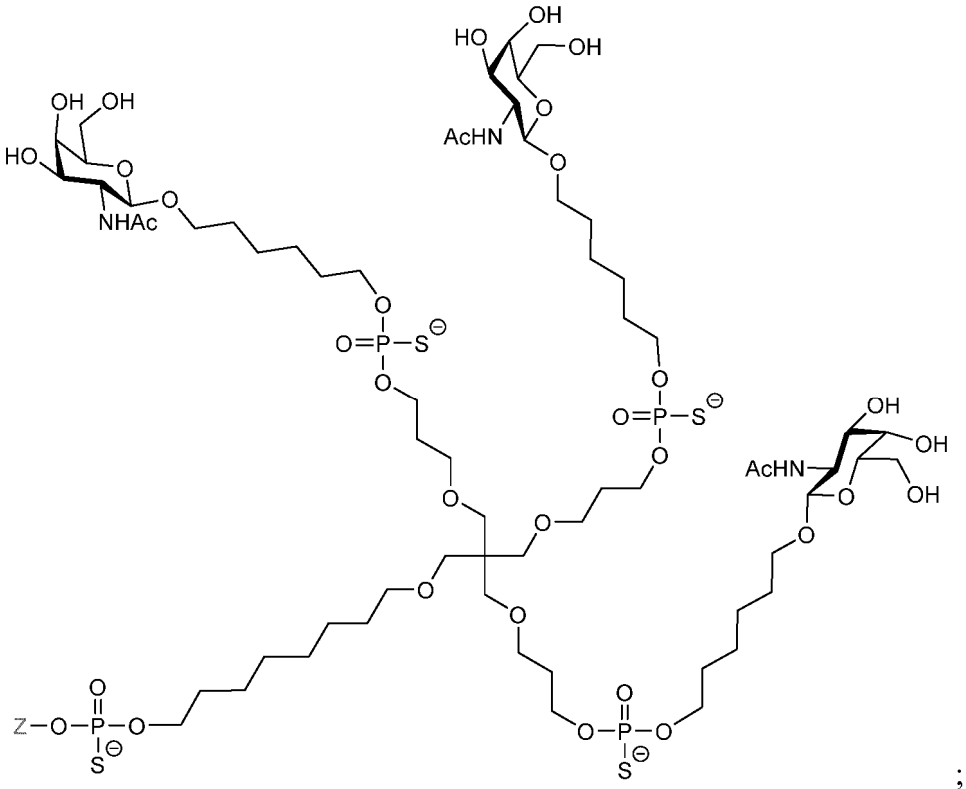
;



;



;



;

en donde Z es un ácido nucleico.

13. Un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde:

a) el ácido nucleico se selecciona entre ARNi, ARNip, ácido nucleico antisentido, ribozimas, aptámeros y espiegélmeros;
y/o
b) el ácido nucleico está modificado;
opcionalmente en donde la modificación se selecciona entre sustituciones o inserciones con análogos de ácidos

nucleicos o bases y modificación química de la base, el azúcar o los restos fosfato.

14. Una composición que comprende un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un vehículo o un excipiente adecuados.

15. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o una composición como se define en la reivindicación 14, para su uso en medicina.

16. El compuesto o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el compuesto o la composición son para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas, enfermedades genéticas, hemofilia y trastornos hemorrágicos, fibrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), hepatitis vírica, enfermedades raras (por ejemplo, acromegalia), enfermedades metabólicas (por ejemplo, hipercolesterolemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia), enfermedades cardiovasculares, obesidad, talasemia, daño hepático (por ejemplo, daño hepático inducido por fármacos), hemocromatosis, enfermedades hepáticas alcohólicas, dependencia del alcohol, anemia y anemia por enfermedades crónicas.

17. Un método *in vitro* para proporcionar ácidos nucleicos a hepatocitos, que comprende poner en contacto el hepatocito con un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

18. Un proceso para preparar un compuesto de fórmulas (I), (II) o (III) como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, comprendiendo el proceso sumar cada componente para formar el compuesto de fórmulas (I), (II) o (III).

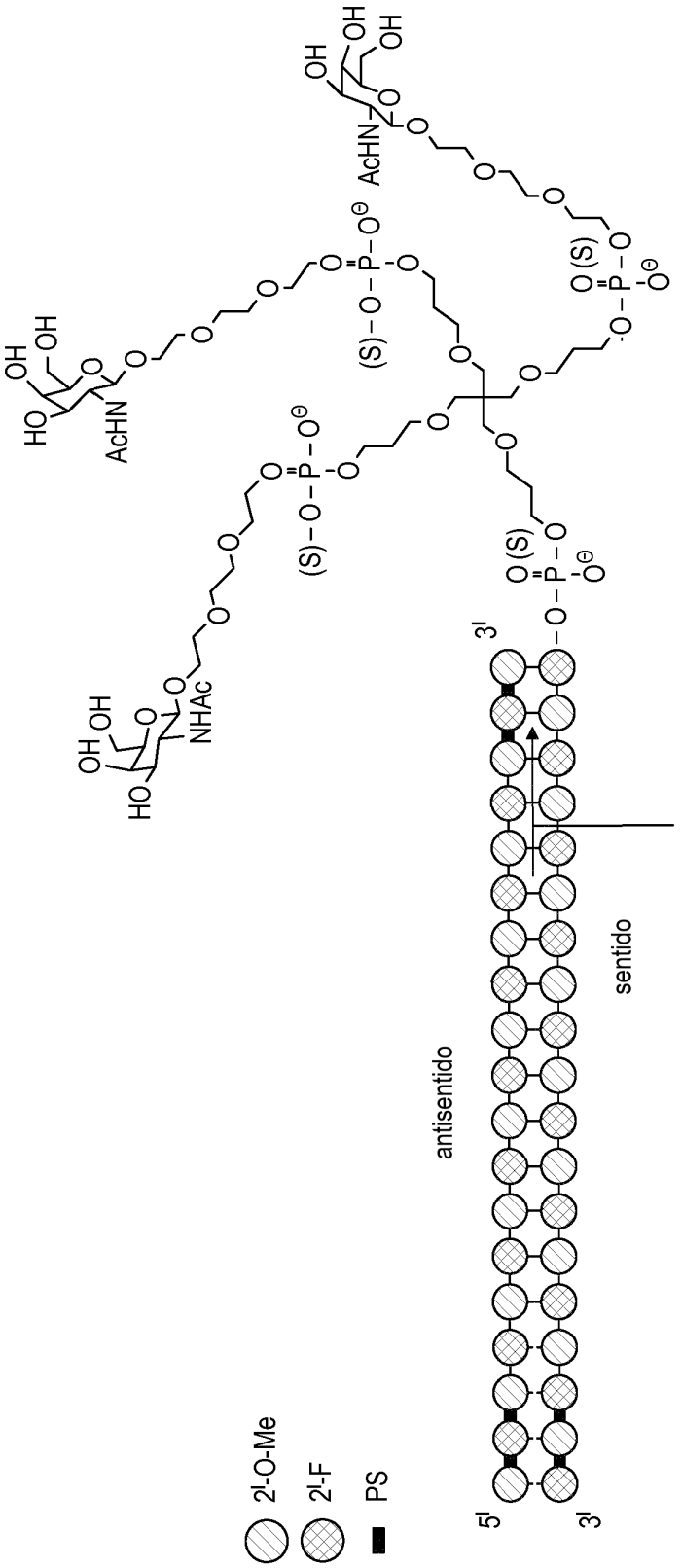


FIG. 1

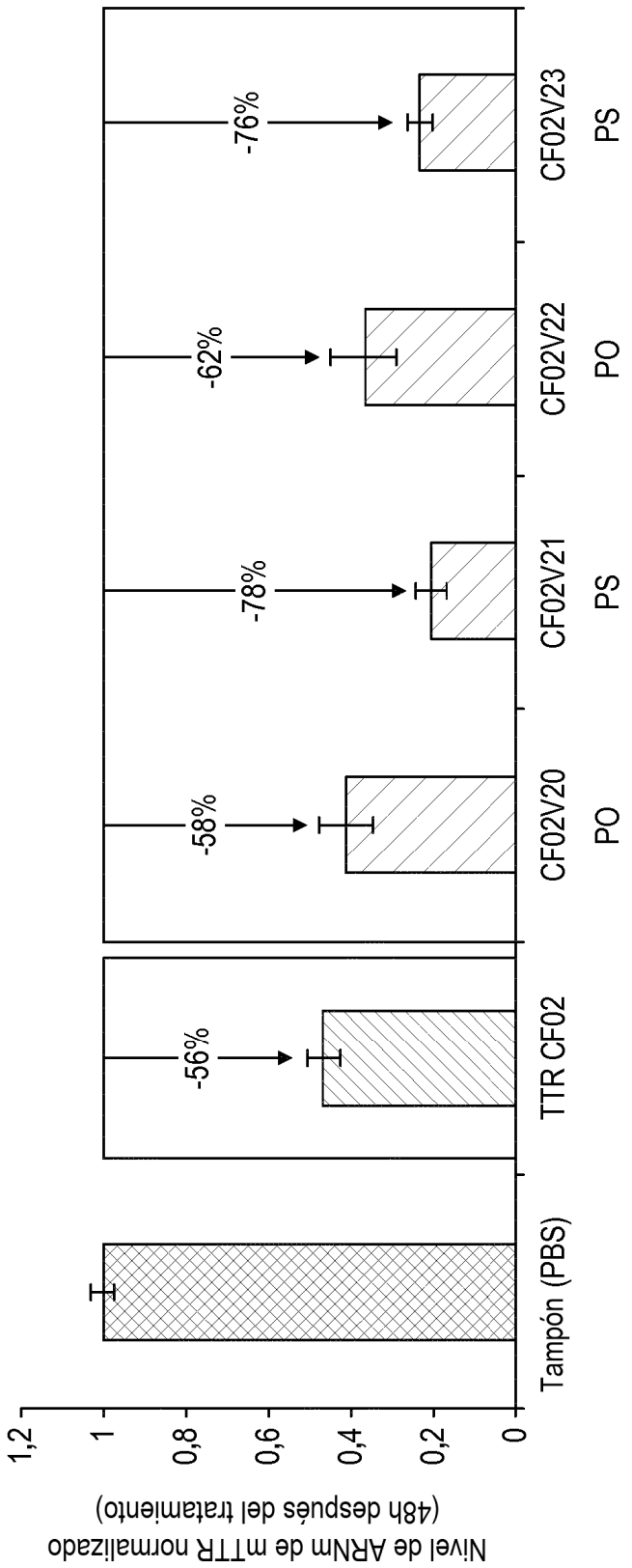

Nivel de ARNm de mTTR normalizado
(48h después del tratamiento)
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Tampón (PBS)
TTR CF02
CF02V20
CF02V21
CF02V22
CF02V23
PO
PS
PO
PS
-56%
-58%
-78%
-62%
-76%

FIG. 2

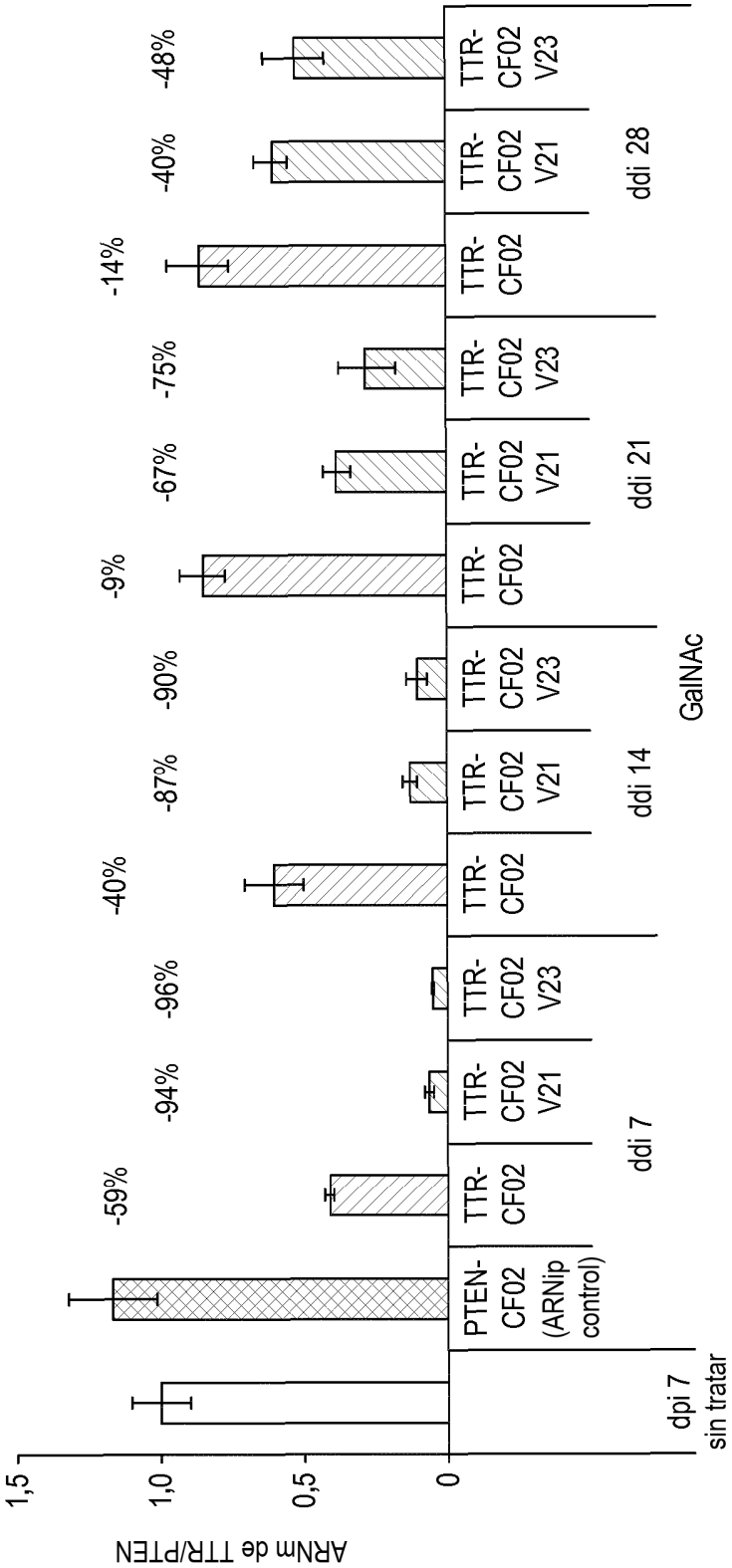

ARNm de TTR/PTEN
1,5
1,0
0,5
0
-59%
-94%
-96%
-40%
-87%
-90%
-9%
-67%
-75%
-14%
-40%
-48%
PTEN-CF02 (ARNip control)
TTR-CF02
TTR-CF02 V21
TTR-CF02 V23
TTR-CF02
TTR-CF02 V21
TTR-CF02 V23
TTR-CF02
TTR-CF02 V21
TTR-CF02 V23
TTR-CF02
TTR-CF02 V21
TTR-CF02 V23
dpi 7 sin tratar
ddi 7
ddi 14
ddi 21
ddi 28
GalNAc

FIG. 3

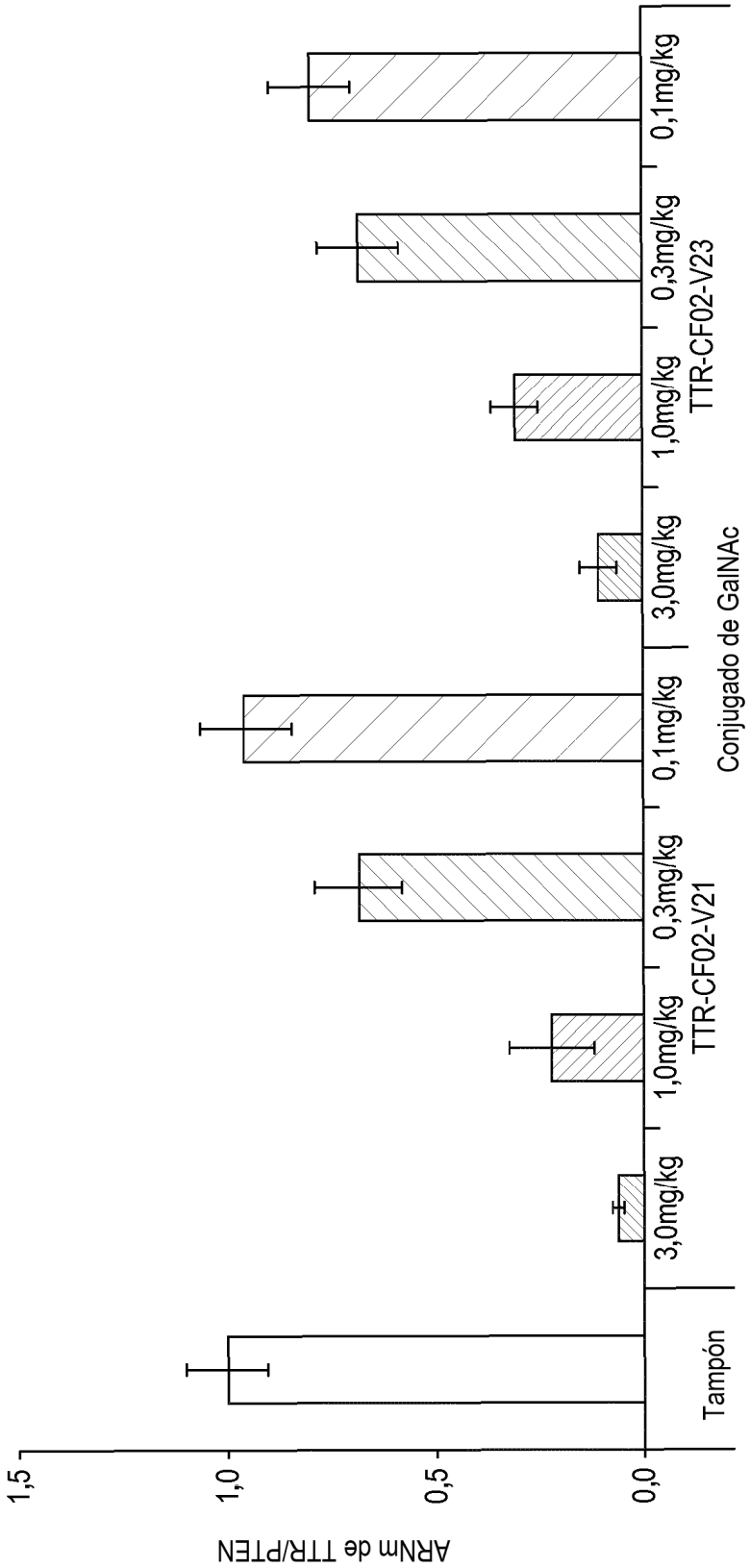

ARNm de TTR/PTEN
1,5
1,0
0,5
0,0
Tampón
3,0mg/kg
1,0mg/kg
0,3mg/kg
0,1mg/kg
TTR-CF02-V21
3,0mg/kg
1,0mg/kg
0,3mg/kg
0,1mg/kg
TTR-CF02-V23
Conjugado de GalNAc

FIG. 4

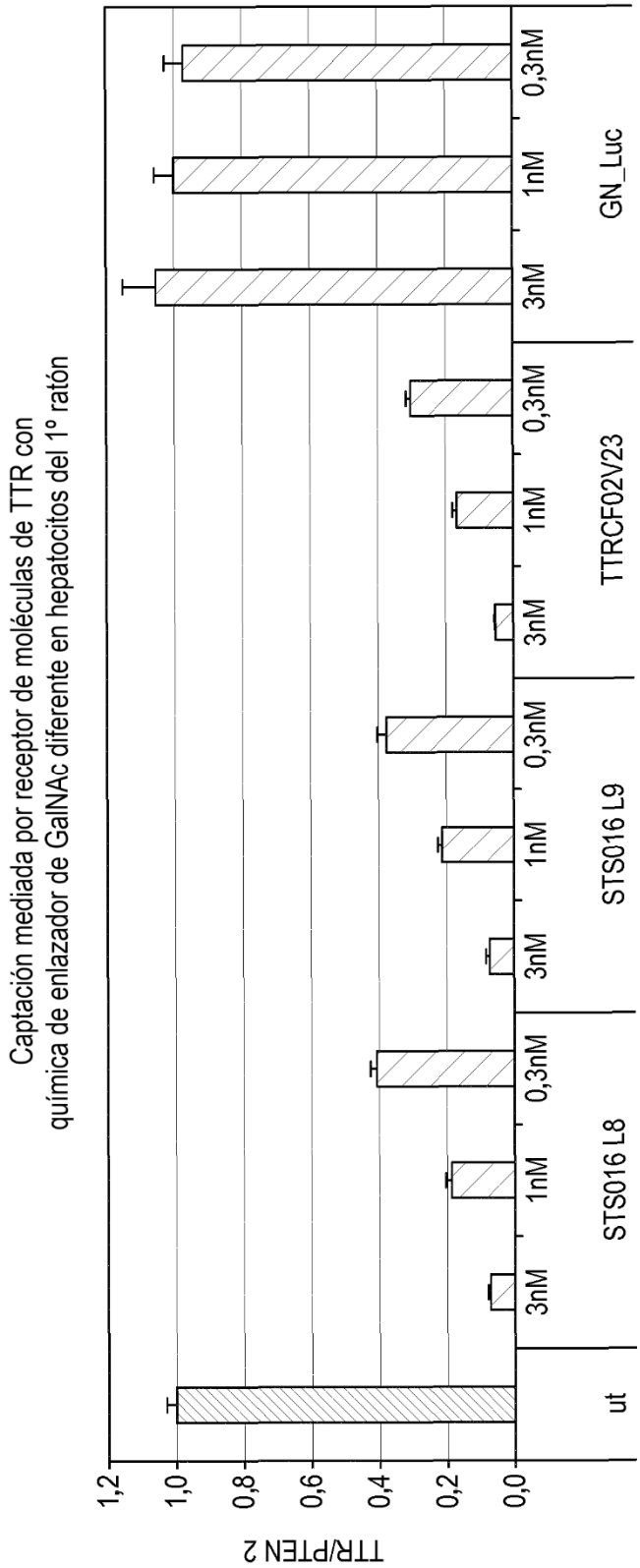

Captación mediada por receptor de moléculas de TTR con
química de enlazador de GalNAc diferente en hepatocitos del 1º ratón
TTR/PTEN 2
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
ut
3nM
1nM
0,3nM
STS016 L8
3nM
1nM
0,3nM
STS016 L9
3nM
1nM
0,3nM
TTRCF02V23
3nM
1nM
0,3nM
GN_Luc

FIG. 5

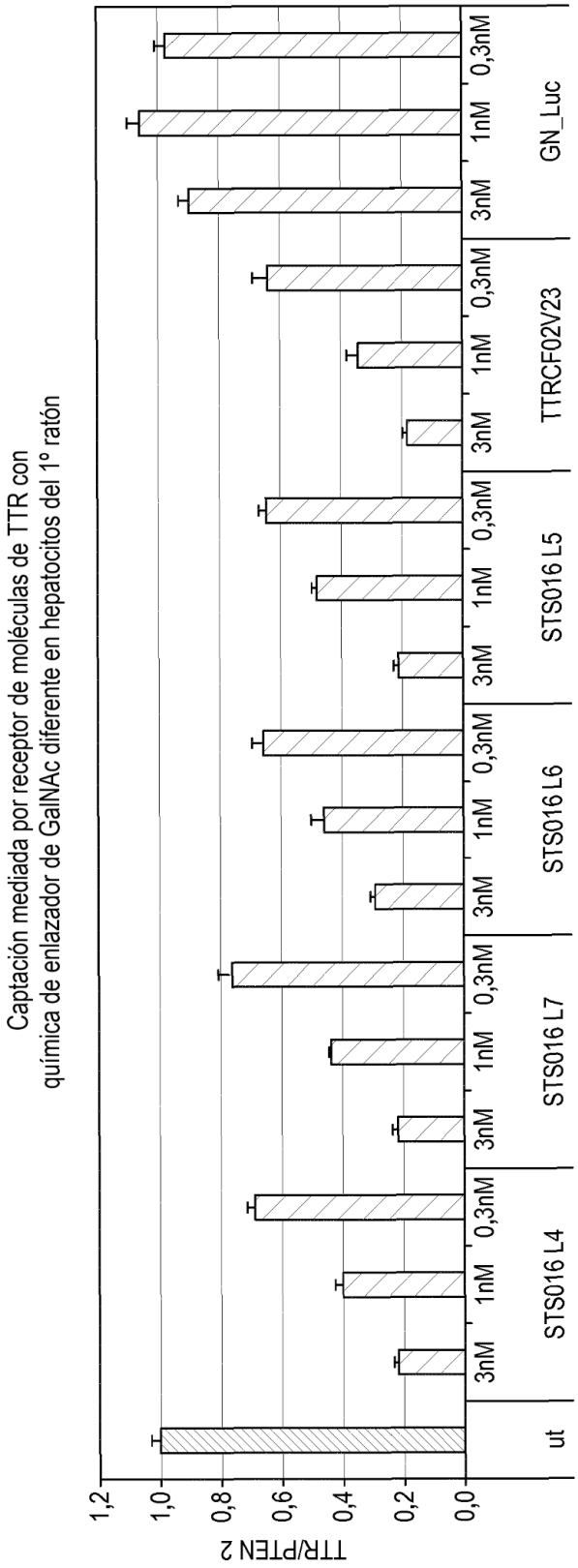

Captación mediada por receptor de moléculas de TTR con
química de enlazador de GalNAc diferente en hepatocitos del 1º ratón
TTR/PTEN 2
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
ut
3nM
1nM
0,3nM
STS016 L4
3nM
1nM
0,3nM
STS016 L7
3nM
1nM
0,3nM
STS016 L6
3nM
1nM
0,3nM
STS016 L5
3nM
1nM
0,3nM
TTRCF02V23
3nM
1nM
0,3nM
GN_Luc

FIG. 6

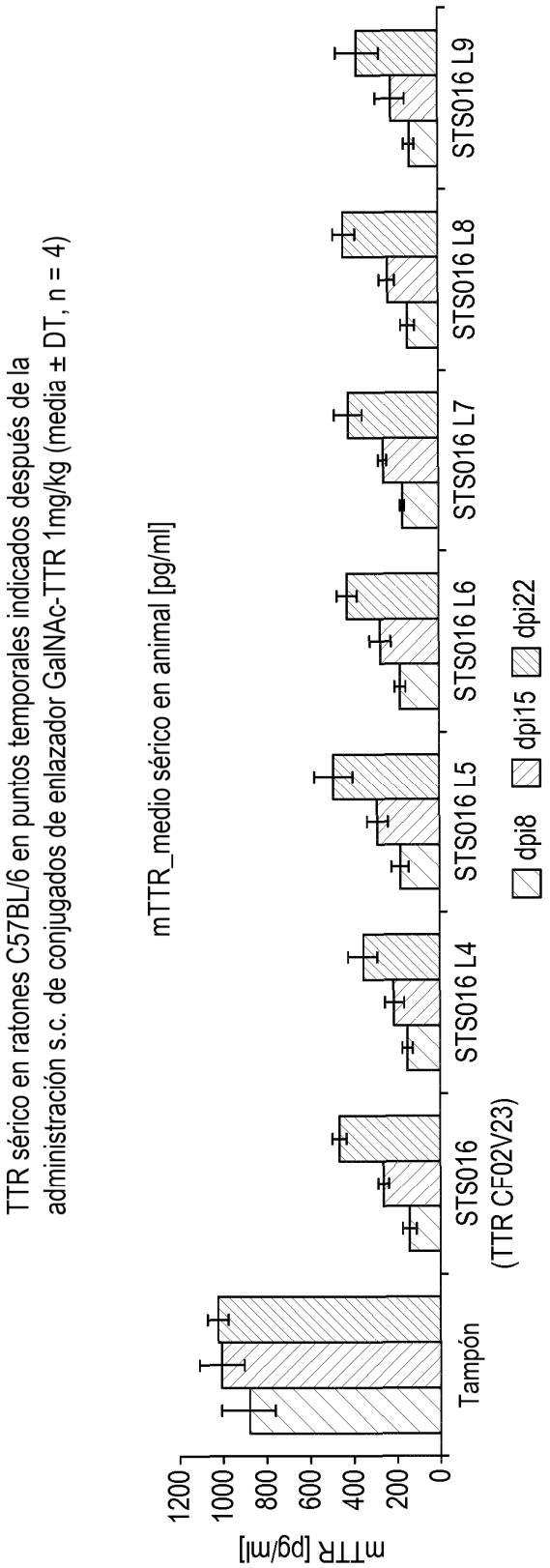

TTR sérico en ratones C57BL/6 en puntos temporales indicados después de la administración s.c. de conjugados de enlazador GalNAc-TTR 1mg/kg (media ± DT, n = 4)
mTTR_medio sérico en animal [pg/ml]
mTTR [pg/ml]
1200
1000
800
600
400
200
0
Tampón
STS016 (TTR CF02V23)
STS016 L4
STS016 L5
STS016 L6
STS016 L7
STS016 L8
STS016 L9
dpi8
dpi15
dpi22

FIG. 7

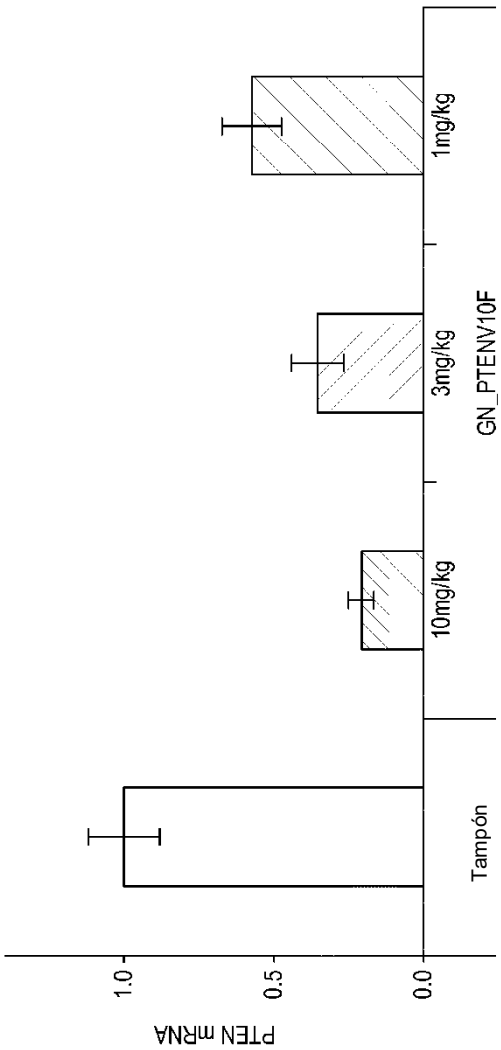


FIG. 8