Ácidos nucleicos para inhibir la expresión de *LPA* en una célula

Campo de la invención

La presente invención se refiere a productos y composiciones y sus usos. En particular, la invención se refiere a productos de ácido nucleico que interfieren con la expresión del gen *LPA* o inhibe su expresión. Tal terapia de disminución de Lp(a) terapéutica sirve para prevenir y reducir el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, aterosclerosis, trombosis y enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatía coronaria y estenosis de la aorta o cualquier otro trastorno, patología o síndrome relacionado con niveles elevados de partículas Lp(a).

Antecedentes

Se ha demostrado que el ARN de cadena doble (ARNcd) capaz de unirse de manera complementaria a ARNm expresado es capaz de bloquear la expresión génica (Fire et ál., 1998, Nature. febrero de 1998 19;391(6669):806-11 y Elbashir et ál., 2001, Nature. mayo de 2001 24;411(6836):494-8) mediante un mecanismo que se denominó ribointerferencia (iARN). Los ARNcd cortos dirigen el silenciamiento postranscripcional específico del gen en muchos organismos, lo que incluye vertebrados, y se han convertido en una herramienta útil para estudiar la función de los genes. La ribointerferencia es mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), una nucleasa de múltiples componentes específica de la secuencia que degrada ARN mensajeros homólogos al desencadenante del silenciamiento cargado en el complejo RISC. El ARN interferente (denominado ARNi en la presente), tal como ARNip, ARN antisentido y micro ARN, son oligonucleótidos que previenen la formación de proteínas mediante silenciamiento génico, es decir, la inhibición de la traducción génica de la proteína mediante la degradación de moléculas de ARNm. Los agentes de silenciamiento génico se están tornando cada vez más importantes para aplicaciones terapéuticas en medicina.

Según Watts y Corey en el Journal of Pathology (2012; vol. 226, págs. 365 379) existen algoritmos que se pueden usar para diseñar desencadenantes del silenciamiento del ácido nucleico, pero todos estos tiene marcadas limitaciones. Puede llevar diversos métodos experimentales identificar ARNi potentes dado que los algoritmos no toman en cuenta factores tales como la estructura terciaria del ARNm diana o el involucramiento de las proteínas de unión a ARN. Por lo tanto, el descubrimiento de un desencadenante del silenciamiento de

ácido nucleico potente con efectos fuera de la diana mínimos es un proceso complejo. Para el desarrollo farmacéutico de estas moléculas muy cargadas es necesario que se sinteticen de manera económica, se distribuyan a los tejidos diana, ingresen a las células y funcionen dentro de los límites de toxicidad aceptables.

Las partículas Lp(a) son partículas de lipoproteína de baja densidad heterogénea expresada predominantemente en el hígado (Witztum y Ginsberg, J Lipid Res. marzo de 2016;57(3):336-9). Se componen de la Apolipoproteína(a) (Apo(a) o Lp(a) codificada por el gen *LPA*) unida a una partícula similar LDL mediante el polipéptido ApoB. Los niveles de partículas Lp(a) en suero elevados definidos genéticamente no se ven afectados por dietas y ejercicio y se asocian con un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular debido al potencial aterosclerótico asociado (Alonso et ál., Journal of the American College of Cardiology vol. 63, n.º 19, 2014). En cuanto a diagnóstico y medicina preventiva, el nivel de suero de partículas Lp(a) del paciente es un factor de riesgo genético independiente muy prevalente para la cardiopatía coronaria y la estenosis de la aorta (Saeedi y Frohlich Clinical Diabetes and Endocrinology (2016) 2:7). No existe actualmente ninguna terapia de reducción de partículas Lp(a) específica aprobada más allá de las medidas de disminución de LDL generales estándar. Por consiguiente, actualmente se necesitan métodos eficaces para el tratamiento, prevención y reducción del riesgo de padecer de trastornos tales como accidente cerebrovascular, aterosclerosis, trombosis y enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatía coronaria, estenosis de la aorta, o asociados a estos, y otros trastornos, patologías o síndromes asociados aún no identificados. La presente invención aborda esta necesidad insatisfecha:

Compendio de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región de dúplex que comprende al menos una parte de una primera cadena y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de un ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43,

en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a las posiciones 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro.

La invención también proporciona una composición que comprende el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de cualquier aspecto de la invención y, opcionalmente, un excipiente fisiológicamente aceptable.

Un aspecto se refiere a un ácido nucleico que es capaz de inhibir la expresión de *LPA* para uso como un medicamento.

También se proporciona un ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de acuerdo con cualquier aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o síndrome y/o en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o síndrome.

La invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o síndrome que comprende la administración de una composición que comprende un ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de acuerdo con cualquier aspecto de la invención a un individuo que necesite tratamiento. El ácido nucleico o ácido nucleico conjugado se puede administrar al sujeto de manera subcutánea, intravenosa o utilizando cualquier otra vía de aplicación tal como oral, rectal o intraperitoneal.

También se incluye un método para elaborar el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de acuerdo con la invención.

El ácido nucleico o la composición que comprende el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención se puede utilizar en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o síndrome. El tratamiento puede ser para prevenir y reducir el riesgo a sufrir un accidente cerebrovascular, aterosclerosis, trombosis o enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatía coronaria o estenosis de la aorta y cualquier otra enfermedad o patología asociada con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un ácido nucleico de cadena doble y dirigido a una transcripción de ARN expresada de *LPA* y composiciones de esta. Estos ácidos nucleicos o ácidos nucleicos conjugados se pueden usar en el tratamiento y prevención de una variedad

de enfermedades, trastornos y síndromes en donde es deseable la expresión reducida del producto del gen *LPA*.

Un aspecto se refiere a un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región de dúplex que comprende al menos una parte de una primera cadena y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de un ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende, o consiste preferentemente en, una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43,

en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a las posiciones 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro.

Un aspecto se refiere a un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región de dúplex que comprende una primera cadena y una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de un ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende, o consiste preferentemente en, una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43,

en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a las posiciones 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro.

Tales ácidos nucleicos son capaces de reducir de manera eficaz la expresión de *LPA* en una célula y son muy estables. El ácido nucleico de la invención es preferiblemente capaz de inhibir la expresión de *LPA* en una célula a un nivel similar, tal como uno igual, o mayor que los mismos ácidos nucleicos con un patrón de modificación diferente en condiciones comparables. Más específicamente, el ácido nucleico de la invención es preferiblemente

capaz de inhibir la expresión de *LPA* en una célula en 80, 90, 100, 105, 110 por ciento o más en comparación con el mismo ácido nucleico con un patrón de modificación diferente en condiciones comparables.

Un aspecto se refiere a un ácido nucleico en donde todos los nucleótidos del ácido nucleico se modifican en la posición 2’ del azúcar.

Un aspecto se refiere a un ácido nucleico en donde el ácido nucleico se modifica preferentemente en la longitud total de la primera cadena con modificaciones de 2’ O-metilo y modificaciones 2’ fluoro alternantes.

Un aspecto se refiere a un ácido nucleico en donde las modificaciones restantes de la segunda cadena son modificaciones de origen natural, preferentemente 2’ O-metilo. En otras palabras, los nucleótidos en la segunda cadena que corresponde a las posiciones 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y todos los otros nucleótidos de la segunda cadena se modifican con una modificación de origen natural, que es preferentemente 2’ O-metilo.

La segunda cadena puede comprender una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42 o 44.

El ácido nucleico puede: a) tener el extremo romo en ambos extremos, b) tener un excedente en un extremo y un extremo romo en el otro o c) tener un excedente en ambos extremos. El ácido nucleico preferentemente tiene un extremo romo en ambos extremos.

Estos ácidos nucleicos entre otros tienen la ventaja de ser activos en diversas especies que son relevantes para el desarrollo clínico o pre-clínico y/o tienen pocos efectos relevantes fuera de la diana y también son estables *in vivo* y tienen una larga duración de acción. También comprenden relativamente pocos nucleótidos modificados de origen no natural, pero sin embargo pueden inhibir de manera eficaz el gen diana durante largos períodos de tiempo. El patrón de modificación específico con pocos nucleótidos modificados de origen no natural (nucleótidos modificados con 2’ F) también hace que sean más fáciles de sintetizar.

El ácido nucleico puede comprender una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 y, opcionalmente, una segunda cadena que

comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, o una primera cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 14, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 18, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 19 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 20, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 21 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 22, o una primera cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 23 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 24, o una primera cadena que comprende o

preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 25 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 26, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 27 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 28, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 29 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 30, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 31 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 32, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 33 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 34, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 35 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 36, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 37 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 38, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 39 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 40, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 41 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 42, o una primera cadena que comprende o consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 43 y, opcionalmente, una segunda cadena que comprende o preferentemente consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 44.

El ácido nucleico en donde dicha primera cadena comprende, y preferentemente consiste en, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 y, opcionalmente, en donde dicha segunda cadena comprende, y preferentemente consiste en, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10.

El gen *LPA* comprende secuencias muy repetitivas. Los ácidos nucleicos de la primera cadena con secuencias muy similares pueden, por lo tanto, tener complementariedad de secuencia perfecta a regiones diana muy diferentes del ARNm.

Un aspecto es un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, en donde el ácido nucleico comprende al menos una región de dúplex que comprende: una primera cadena y una segunda cadena, en donde dicha segunda cadena es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de al menos 15, preferentemente al menos 16, más preferentemente al menos 17, aún más preferentemente al menos 18 y todavía más preferentemente al menos 19 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de referencia SEQ ID NO: 9, 5, 1, 3, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, o 43, y en donde la cantidad de inserciones y/o eliminaciones y/o errores de apareamiento de un único nucleótido en la secuencia de la primera cadena con respecto a la parte de la secuencia de referencia que está comprendida en la secuencia de la primera cadena es como máximo tres, preferentemente como máximo dos, más preferentemente como máximo uno y todavía más preferentemente cero. Sin embargo, la secuencia puede modificarse mediante una cantidad de modificaciones que no cambian la identidad del nucleótido. Por ejemplo, las modificaciones de la estructura principal del ácido nucleico no cambian la identidad del nucleótido dado que la base misma permanece igual que en la secuencia de referencia.

En un aspecto, la primera cadena del ácido nucleico comprende una secuencia de al menos 18 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de referencia, preferentemente de cualquiera de las secuencias de referencia SEQ ID NO: 9 y 5, y en donde la cantidad de inserciones y/o eliminaciones y/o errores de apareamiento de un único nucleótido en la secuencia de la primera cadena con respecto a la parte de la secuencia de referencia que está comprendida en la secuencia de la primera cadena es como máximo uno y preferentemente cero.

En un aspecto, la primera cadena del ácido nucleico comprende una secuencia de al menos 19 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de referencia SEQ ID NO: 9 y 5.

Cuando se realiza una referencia en la presente a una secuencia de referencia que comprende o consiste en nucleótidos no modificados, esta referencia no está limitada a la secuencia con nucleótidos no modificados. La misma referencia también comprende la misma secuencia de nucleótidos en la cual uno, varias, tales como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más, lo que incluye todos, los nucleótidos se modifican mediante modificaciones tales como una modificación 2'-OMe, 2'-F, un ligando, un enlazador, una modificación del extremo 3' o el extremo 5' o cualquier otra modificación. También se refiere a secuencias en las cuales dos o más nucleótidos se enlazan entre sí mediante el enlace de fosfodiéster natural o cualquier otro enlace tal como un enlace fosforotioato o fosforoditioato.

Un ácido nucleico de cadena doble es un ácido nucleico en el cual la primera cadena y la segunda cadena se hibridan entre sí en al menos parte de sus longitudes y, por lo tanto, son capaces de formar una región de dúplex en condiciones fisiológicas, tales como en PBS a 37 °C a una concentración de 1 μM de cada cadena. La primera y segunda cadenas preferentemente pueden hibridarse entre sí y, por lo tanto, formar una región de dúplex en una región de al menos 15 nucleótidos, preferentemente 16, 17, 18 o 19 nucleótidos. Esta región de dúplex comprende apareamientos de bases de nucleótidos entre las dos cadenas, preferentemente en función al apareamiento de bases Watson-Crick y/o apareamiento de bases wobble (tal como apareamiento de bases GU). Todos los nucleótidos de las dos cadenas dentro de una región de dúplex no tienen que realizar un apareamiento de bases entre sí para formar una región de dúplex. Un determinado número de errores de apareamiento, eliminaciones o inserciones entre las secuencias de nucleótidos de las dos cadenas es aceptable. Los excedentes en cualquiera de los extremos de la primera o segunda cadena o nucleótidos no apareados en cualquiera de los extremos del ácido nucleico de cadena doble también son posibles. El ácido nucleico de cadena doble es preferentemente un ácido nucleico de cadena doble estable en condiciones fisiológicas y preferentemente tiene un punto de fusión (pf) de 45 °C o más, preferentemente 50 °C o más y, más preferentemente 55 °C o más, por ejemplo, en PBS a una concentración de 1 μM de cada primera cadena y la segunda cadena son preferentemente capaces de formar una región de dúplex (es decir, son complementarias entre sí) en i) al menos una parte de las longitudes, preferentemente en al menos 15 nucleótidos de ambas de sus longitudes, ii) en la longitud total de la primera cadena, iii) en la longitud total de la segunda cadena y/o iv) en la longitud total de tanto la

primera como la segunda cadena. Si las cadenas son complementarias entre sí en una longitud determinada significa que las cadenas pueden realizar un apareamiento de bases entre sí, ya sea mediante apareamiento de bases Watson-Crick o wobble, en esa longitud. Cada nucleótido de la longitud no tiene que poder realizar necesariamente un apareamiento de bases con su contraparte en la otra cadena en la longitud total dada siempre que pueda formarse un nucleótido de cadena doble estable en condiciones fisiológicas. Sin embargo, esto se prefiere.

Se puede tolerar una cantidad determinada de errores de apareamiento, eliminaciones o inserciones entre la primera cadena (antisentido) y la secuencia diana o entre la primera cadena y la segunda cadena (de sentido) en el contexto de ARNip e incluso en algunos casos puede tener el potencial de aumentar la actividad.

Ácido nucleico significa un ácido nucleico que comprende dos cadenas que comprenden nucleótidos, que es capaz de interferir con la expresión génica. La inhibición puede ser total o parcial y dar como resultado la regulación por disminución de la expresión génica de 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 pasajera. La primera cadena y la segunda cadena pueden ser parte de la misma molécula de polinucleótido que es autocomplementaria y se «pliega» para formar una molécula de cadena doble. El ácido nucleico puede ser una molécula de ARNip.

El ácido nucleico puede comprender ribonucleótidos, ribonucleótidos modificados, desoxinucleótidos, desoxirribonucleótidos o no nucleótidos análogos de nucleótidos que son capaces de imitar nucleótidos de tal forma que pueden «aparearse» con la base correspondiente en la secuencia diana o cadena complementaria. El ácido nucleico puede además comprender una región de dúplex o parte de un ácido nucleico de cadena doble formada por toda la primera cadena o una parte de esta (también conocida en la técnica como cadena guía) y toda la segunda cadena o una parte de esta (también conocida en la técnica como cadena pasajera). La región de dúplex se define como que comienza con el primer par de bases formado entre la primera cadena y la segunda cadena y que termina con el último par de bases formado entre la primera cadena y la segunda cadena, inclusive.

Región de dúplex significa la región en dos oligonucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios que forman pares de bases el uno con el otro, ya sea

mediante el apareamiento de bases Watson-Crick o cualquier otra forma que permita un dúplex entre cadenas de oligonucleótidos que son complementarias o sustancialmente complementarias. Por ejemplo, una cadena de oligonucleótidos que tiene 21 unidades de nucleótidos puede formar par de bases con otro oligonucleótido con 21 unidades de nucleótidos, sin embargo, solo 19 nucleótidos en cada cadena son complementarios o sustancialmente complementarios, de tal forma que la «región de dúplex» consiste en 19 pares de bases. Los pares de bases restantes pueden existir como excedentes 5’ y 3’ o como regiones de cadena simple. Además, dentro de la región de dúplex, no es necesario un 100 % de complementariedad; se permite la complementariedad sustancial dentro de una región de dúplex. La complementariedad sustancial se refiere a la complementariedad entre las cadenas de tal forma que sean capaces de hibridarse en condiciones biológicas. Las técnicas para determinar empíricamente si dos cadenas son capaces de hibridarse en condiciones biológicas son conocidas en la técnica. De manera alternativa, se pueden sintetizar dos cadenas y combinarse en condiciones biológicas para determinar si se hibridan entre sí.

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

Dependiendo de la longitud de un ácido nucleico, no necesariamente se necesita una coincidencia perfecta en cuanto a complementariedad de bases entre la primera cadena y la segunda cadena. Sin embargo, la primera y segunda cadenas deben poder hibridarse en condiciones fisiológicas.

La complementariedad entre la primera cadena y la segunda cadena en la al menos una región de dúplex puede ser perfecta en que no hay errores de apareamiento de nucleótido ni nucleótidos adicionales/eliminados en ninguna de las dos cadenas. De manera alternativa, la complementariedad puede no ser perfecta. La complementariedad puede ser de alrededor de 70 % a alrededor de 100 %. Más específicamente, la complementariedad puede ser de al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % y valores intermedios.

En el contexto de la presente invención, «una parte de» como, por ejemplo, en «una región de dúplex que comprende al menos una parte de una primera cadena» debería entenderse como que significa que la región de dúplex comprende al menos 10, preferentemente al menos 12, más preferentemente al menos 14, aún más preferentemente al menos 16, incluso más

preferentemente al menos 18 y todavía más preferentemente todos los nucleótidos de una secuencia de cadena de referencia dada. La parte de la secuencia de referencia en la región de dúplex es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, aún más preferentemente al menos 95 % y todavía más preferentemente 100 % idéntica a la parte correspondiente de la secuencia de referencia. De manera alternativa, la cantidad de errores de apareamiento de un único nucleótido con respecto a la parte de la secuencia de referencia es como máximo tres, preferentemente como máximo dos, más preferentemente como máximo uno y todavía más preferentemente cero.

La primera cadena y la segunda cadena pueden cada una comprender una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 1.

El uso de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención implica la formación de una región de dúplex entre toda la primera cadena o una parte de esta y una parte de un ácido nucleico diana. La parte del ácido nucleico diana que forma una región de dúplex con la primera cadena, definido como que comienza con el primer par de bases formado entre la primera cadena y la secuencia diana y que termina con el último par de bases formado entre la primera cadena y la secuencia diana, inclusive, es la secuencia de ácido nucleico diana o, simplemente, la secuencia diana. No es necesario que la región de dúplex formada entre la primera cadena y la segunda cadena sea la misma que la región de dúplex formada entre la primera cadena y la secuencia diana. Es decir que la segunda cadena puede tener una secuencia diferente a la secuencia diana; sin embargo, la primera cadena debe poder formar una estructura de dúplex con tanto la segunda cadena como con la secuencia diana, al menos en condiciones fisiológicas.

La complementariedad entre la primera cadena y la secuencia diana puede ser perfecta (sin errores de apareamiento de nucleótidos ni nucleótidos adicionales/eliminados en ninguno de los ácidos nucleicos).

La complementariedad entre la primera cadena y la secuencia diana puede no ser perfecta. La complementariedad puede ser de alrededor de 70 % a alrededor de 100 %. Más específicamente, la complementariedad puede ser de al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % y valores intermedios.

La identidad entre la primera cadena y la secuencia complementaria de la secuencia diana puede variar entre alrededor de 75 % a alrededor de 100 %. Más específicamente, la complementariedad puede ser de al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % y valores intermedios, siempre que un ácido nucleico sea capaz de reducir o inhibir la expresión de *LPA*.

Un ácido nucleico que tiene menos de 100 % de complementariedad entre la primera cadena y la secuencia diana puede ser capaz de reducir la expresión de *LPA* al mismo nivel que un ácido nucleico con complementariedad perfecta entre la primera cadena y la secuencia diana. De manera alternativa, puede ser capaz de reducir la expresión de *LPA* a un nivel que se encuentre entre 15 % - 100 % del nivel de reducción logrado por el ácido nucleico con complementariedad perfecta.

En un aspecto, el ácido nucleico comprende una primera cadena de ácido nucleico y una segunda cadena de ácido nucleico, en donde la primera cadena es capaz de hibridarse en condiciones fisiológicas a un ácido nucleico de la secuencia SEQ ID NO: 10, 6, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 o 44;

en donde la segunda cadena es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas a la primera cadena para formar una región de dúplex y

en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a las posiciones 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro.

Los ácidos nucleicos que son capaces de hibridarse en condiciones fisiológicas son ácidos nucleicos que son capaces de formar pares de bases, preferentemente pares de bases Watson-Crick o wobble, entre al menos una parte de los nucleótidos opuestos en las cadenas para formar al menos una región de dúplex. Tal ácido nucleico de cadena doble es preferentemente un ácido nucleico de cadena doble estable en condiciones fisiológicas (por ejemplo, en PBS a 37 °C a una concentración de 1 μM de cada cadena), lo que significa que en tales condiciones, las dos cadenas se mantienen hibridadas entre sí. El pf del nucleótido de cadena doble es preferentemente 45 °C o más, preferentemente 50 °C o más y más preferentemente 55 °C o más.

Un aspecto se refiere a un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA*, en donde el ácido nucleico comprende una primera secuencia de al menos 15, preferentemente al menos 16, más preferentemente al menos 17, aún más preferentemente al menos 18 y todavía más preferentemente todos los nucleótidos difieren en no más de 3 nucleótidos, preferentemente en no más de 2 nucleótidos, más preferentemente en no más de 1 nucleótido y más preferentemente no difieren en ningún nucleótido de cualquiera de las secuencias de la Tabla 1, la primera secuencia se puede hibridar a una transcripción de gen diana (tal como un ARNm) en condiciones fisiológicas. Preferentemente el ácido nucleico comprende además una segunda secuencia de al menos 15, preferentemente al menos 16, más preferentemente al menos 17, aún más preferentemente al menos 18 y todavía más preferentemente todos los nucleótidos difieren en no más de 3 nucleótidos, preferentemente en no más de 2 nucleótidos, más preferentemente en no más de 1 nucleótido y más preferentemente no difieren en ningún nucleótido de cualquiera de las secuencias de la Tabla 1, la segunda secuencia se puede hibridar a la primera secuencia en condiciones fisiológicas y preferentemente el ácido nucleico es un ARNip que es capaz de inhibir la expresión de *LPA* mediante la vía de ribointerferencia.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente pueden ser capaces de inhibir la expresión de *LPA*. La inhibición puede ser total, es decir, 0 % de expresión restante en comparación con el nivel de expresión de *LPA* en ausencia del ácido nucleico de la invención. La inhibición de la expresión de *LPA* puede ser parcial, es decir, puede ser 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o valores intermedios de expresión de *LPA* en ausencia de un ácido nucleico de la invención. El nivel de inhibición puede medirse al comparar una muestra tratada con una muestra no tratada o con una muestra tratada con un control tal como por ejemplo un ARNip que no se dirige a *LPA*. La inhibición puede medirse al medir los niveles de proteínas y/o ARNm de *LPA* o los niveles de un biomarcador o indicador que se correlaciona con la presencia o actividad de *LPA*. Se puede medir en células que pueden tratarse in vitro con un *ácido nucleico* descrito en la presente. De manera alternativa, o además, la inhibición puede medirse en células, tales como hepatocitos, o tejido, tal como tejido hepático, o un órgano, tal como el hígado, o un fluido corporal, suero, linfa o cualquier otra parte del cuerpo que se toma de un sujeto previamente tratado con una ácido nucleico descrito en la presente. Preferentemente, la inhibición de la expresión de *LPA* se determina al comparar el nivel de ARNm de *LPA* medido en células que expresan *LPA* después de 24 o 48

horas de tratamiento *in vitro* en condiciones ideales (ver los ejemplos para concentraciones y condiciones apropiadas) con un ácido nucleico descrito en la presente para el nivel de ARNm de *LPA* medido en las mismas células que no se trataron o se trataron de forma simulada o se trataron con un ácido nucleico de control.

Tal como se usa en la presente, las expresiones «inhibir», «regular por disminución» o «reducir» con respecto a la expresión génica significan 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 (p. ej., ARNm), o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, se ven reducidas por debajo de lo que se observa en ausencia del ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención o con respecto a una molécula de ARNip sin homología conocida con respecto a transcripciones humanas (denominado en el presente control no silenciante). Tal control se puede conjugar y modificar de forma análoga a la molécula de la invención y administrarse a la célula diana mediante la misma vía; por ejemplo, la expresión se puede reducir a un 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, o a valores intermedios, o menos que lo que se observa en ausencia del ácido nucleico o ácido nucleico conjugado o en presencia de un control no silenciante.

El ácido nucleico puede comprender una primera cadena y una segunda cadena, cada una con 19-25 nucleótidos de longitud. La primera cadena y la segunda cadena pueden tener longitudes diferentes.

La primera cadena y/o la segunda cadena pueden tener cada una 17-35, preferentemente 18-30, más preferentemente 19-25 y más preferentemente 19 nucleótidos de longitud y al menos una región de dúplex puede tener 10-25 nucleótidos, preferentemente 18-23 nucleótidos de longitud. El dúplex puede comprender dos cadenas separadas o puede comprender una única cadena que comprende la primera cadena y la segunda cadena.

La primera cadena puede tener 17-25 nucleótidos de longitud, preferentemente puede tener 18-24 nucleótidos de longitud, puede tener 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, la primera cadena tiene 19 nucleótidos de longitud. La segunda cadena puede tener independientemente 17-25 nucleótidos de longitud, preferentemente puede tener 18-24 nucleótidos de longitud, puede tener 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, la segunda cadena tiene 18 o 19 en longitud y, aún más preferentemente, tiene 18 nucleótidos de longitud.

El ácido nucleico puede tener 15-25 pares de nucleótidos de longitud. El ácido nucleico puede tener 17-23 pares de nucleótidos de longitud. El ácido nucleico puede tener 17-25 pares de nucleótidos de longitud. El ácido nucleico puede tener 23-24 pares de nucleótidos de longitud. El ácido nucleico puede tener 19-21 pares de nucleótidos de longitud. El ácido nucleico puede tener 21-23 pares de nucleótidos de longitud.

El ácido nucleico puede comprender una región de dúplex que consiste en 19-25 pares de bases de nucleótidos. La región de dúplex puede consistir en 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de bases, los cuales pueden ser contiguos. Preferentemente, la región de dúplex consiste en 19 pares de bases.

Preferentemente, el ácido nucleico media la interferencia de ARN.

En una modalidad, el ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula comprende al menos una región de dúplex que comprende una primera cadena y una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de al menos 15, preferentemente al menos 16, más preferentemente al menos 17, aún más preferentemente al menos 18 y todavía más preferentemente al menos 19 nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, aún más preferentemente al menos 95 % y todavía más preferentemente 100 % de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 9, 5, 1, 3, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43.

En un aspecto adicional, el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado descrito puede reducir la expresión de *LPA* en al menos un 15 % en comparación a la expresión observada en ausencia del ácido nucleico o ácido nucleico conjugado. Todas las características preferidas de cualquiera de los aspectos que preceden también aplican a este aspecto. En particular, la expresión de *LPA* se puede reducir a al menos los siguientes % dados o menos que 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 % o menos, y valores intermedios, que lo observado en ausencia del ácido nucleico o ácido nucleico conjugado o en presencia de un control no silenciante.

El ácido nucleico puede tener un excedente en un extremo y un extremo romo en el otro. El ácido nucleico puede tener un excedente en ambos extremos. El ácido nucleico puede tener un extremo romo en ambos extremos. El ácido nucleico puede tener un extremo romo 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.

Un «excedente», tal como se usa en la presente, tiene su significado normal y habitual en la técnica, es decir, una parte de cadena simple de un ácido nucleico que se extiende más allá del nucleótido del extremo de una cadena complementaria en un ácido nucleico de cadena doble. La expresión «extremo romo» incluye ácido nucleico de cadena doble en el cual ambas cadenas terminan en la misma posición, independientemente de si el o los nucleótidos del extremo forman pares de bases. El nucleótido del extremo de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo puede ser parte de un par de bases. El nucleótido del extremo de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden no estar apareados. Los dos nucleótidos del extremo de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden ser parte de un par de bases. Los dos nucleótidos del extremo de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden no estar apareados.

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

Un excedente en el extremo 3’ o en el extremo 5’ de la segunda cadena o la primera cadena se puede seleccionar de los que consisten en 1, 2, 3, 4 y 5 nucleótidos de longitud. De manera opcional, un excedente puede consistir en 1 o 2 nucleótidos, los cuales pueden estar modificados o no.

Preferentemente, el ácido nucleico es un ARNip. Los ARNip son ARN interferentes cortos o de silenciamiento cortos que pueden inhibir la expresión de un gen diana mediante la vía de

interferencia de ARN (ribointerferencia). La inhibición ocurre mediante la degradación dirigida de las transcripciones de ARNm del gen diana después de la transcripción. El ARNip forma parte del complejo RISC. El complejo RISC se dirige específicamente al ARN diana mediante complementariedad de secuencia de la primera cadena (antisentido) con la secuencia diana. Preferentemente, el ácido nucleico media la interferencia de ARN (ribointerferencia). Por lo tanto, el ácido nucleico, o al menos la primera cadena del ácido nucleico, preferentemente puede incorporarse en el complejo RISC. Como resultado, por lo tanto, el ácido nucleico, o al menos la primera cadena de ácido nucleico, puede guiar el complejo RISC a un ARN diana específico con el cual el ácido nucleico o al menos la primera cadena del ácido nucleico es al menos parcialmente complementaria. El complejo RISC luego escinde específicamente este ARN diana y como resultado conduce a la inhibición de la expresión del gen del cual se deriva el ARN.

Modificaciones de ácido nucleico

Los polinucleótidos no modificados, particularmente los ribonucleótidos, pueden ser susceptibles de degradación por parte de nucleasas celulares y, como tal, se pueden incluir modificaciones/ nucleótidos modificados en el ácido nucleico de la invención. Tales modificaciones pueden ayudar a estabilizar el ácido nucleico al tornarlo más resistente a las nucleasas. Esta mejora en la resistencia permite que los ácidos nucleicos se encuentren activos en la mediación de la interferencia de ARN por períodos de tiempo más largos y es especialmente deseable cuando los ácidos nucleicos se usarán para tratamiento.

Las modificaciones del ácido nucleico de la presente invención generalmente proporcionan una herramienta potente para superar las limitaciones potenciales, lo que incluye, de manera no taxativa, la biodisponibilidad y estabilidad *in vitro* e *in vivo* inherentes a las moléculas de ARN naturales. El ácido nucleico de acuerdo con la invención se puede modificar mediante modificaciones químicas. El ácido nucleico modificado también puede minimizar la posibilidad de inducir la actividad del interferón en seres humanos. La modificación puede además mejorar 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 cualquiera de la primera cadena o la segunda cadena o de ambas. Un ribonucleótido puede comprender una modificación química de la base, azúcar o

restos de fosfato. El ácido ribonucleico se puede modificar mediante sustitución o inserción con análogos de ácidos nucleicos o bases.

Preferentemente, al menos un nucleótido de la primera o segunda cadenas del ácido nucleico es un nucleótido modificado, preferentemente un nucleótido de origen no natural tal como un nucleótido modificado por 2’-F.

Se puede modificar 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 encontrarse en la primera cadena. El nucleótido modificado puede encontrarse en la segunda cadena. El nucleótido modificado puede encontrarse en la región de dúplex. El nucleótido modificado puede encontrarse fuera de la región de dúplex, es decir, en una región de cadena simple. El nucleótido modificado puede encontrarse en la primera cadena y puede encontrarse fuera de la región de dúplex. El nucleótido modificado puede encontrarse en la segunda cadena y puede encontrarse fuera de la región de dúplex. El nucleótido del extremo 3’ de la primera cadena puede ser un nucleótido modificado. El nucleótido del extremo 3’ de la segunda cadena puede ser un nucleótido modificado. El nucleótido del extremo 5’ de la primera cadena puede ser un nucleótido modificado. El nucleótido del extremo 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 alrededor de 2-4 nucleótidos modificados o un ácido nucleico puede tener alrededor de 4-6 nucleótidos modificados, alrededor de 6-8 nucleótidos modificados, alrededor de 8-10 nucleótidos modificados, alrededor de 10-12 nucleótidos modificados, alrededor de 12-14 nucleótidos modificados, alrededor de 14-16 nucleótidos modificados, alrededor de 16-18 nucleótidos modificados, alrededor de 18-20 nucleótidos modificados, alrededor de 20-22 nucleótidos modificados, alrededor de 22-24 nucleótidos modificados, 24-26 nucleótidos modificados o alrededor de 26-28 nucleótidos modificados o todos los nucleótidos pueden modificarse. En cada caso, el ácido nucleico que comprende dichos nucleótidos modificados retiene al menos 50 % de su actividad en comparación con el mismo ácido nucleico, pero sin dichos nucleótidos modificados o viceversa. El ácido nucleico puede retener 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % y valores intermedios de su actividad en comparación con el mismo ácido nucleico, pero sin dichos

nucleótidos modificados, o puede tener más de 100 % de la actividad del mismo ácido nucleico sin dichos nucleótidos modificados.

El nucleótido modificado puede ser una purina o una pirimidina. Se pueden modificar al menos la mitad de las purinas. Se pueden modificar al menos la mitad de las pirimidinas. Se pueden modificar todas las purinas. Se pueden modificar todas las pirimidinas. Los nucleótidos modificados se pueden seleccionar del grupo que consiste en un nucleótidos de la desoxi-timina (dT) del extremo 3’, un nucleótido modificado de 2'-O-metilo, un nucleótido modificado 2’, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado con 2'-amino, un nucleótido modificado con 2'-alquilo, un nucleótido morfolino, un fosforamidato, un nucleótido que comprende una base no natural, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleótido que comprende un 5' fosfato o una imitación de 5’ fosfato y un nucleótido del extremo enlazado a un derivado del colesterilo o a un grupo bisdecilamido del ácido dodecanoico.

El ácido nucleico puede comprender un nucleótido que comprende un nucleótido modificado, en donde la base se selecciona de 2-aminoadenosina, 2,6-diaminopurina,inosina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxi benceno, 3-metil uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitidina (p. ej., 5-metilcitidina), 5-alquiluridina (p. ej., ribotimidina), 5-halouridina (p. ej., 5-bromouridina), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidina (p. ej., 6-metiluridina), propina, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wibutosina, wibutoxosina, 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 tratados en la presente incluyen ARN no modificado así como ARN que se ha modificado, p. ej., para mejorar la eficacia, y polímeros de sustitutos de nucleósidos. El ARN no modificado se refiere a una molécula en la cual los componentes del ácido nucleico, a saber, restos de fosfato, azúcares y bases, son iguales o esencialmente iguales a las que se producen en la naturaleza, por ejemplo, como se producen naturalmente en el cuerpo humano. Nucleótido modificado, tal como se usa en la presente, se refiere a un nucleótido en

el cual uno o más de los componentes de los nucleótidos, a saber, restos de fosfato, bases y azúcares, son distintos a los que se producen en la naturaleza. Aunque se denominan nucleótidos modificados, por supuesto, debido la modificación, el término también incluye moléculas que no son nucleótidos, por ejemplo, una molécula de polinucleótido en la cual la estructura principal de ribofosfato se reemplaza con una construcción que no es un ribofosfato que permite la hibridación entre cadenas, es decir, los nucleótidos modificados imitan la estructura principal del 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 o de un resto de fosfato o de un O no enlazado de un resto de fosfato. En algunos casos, la modificación se producirá en todas las posiciones/nucleótidos posibles en el polinucleótido, pero en muchos casos no será así. Una modificación se puede producir solo en una posición del extremo 3′ o 5′, se puede producir solo en regiones del extremo, tal como en una posición de un nucleótido del extremo o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de una cadena. Una modificación se puede producir en una región de cadena doble, una región de cadena simple o en ambas. Una modificación se puede producir solo en la región de cadena doble de un ácido nucleico de la invención o se puede producir solo en una región de cadena simple de un ácido nucleico de la invención. Una modificación fosforotioato en una posición de O no enlazado se puede producir solo en uno o ambos extremos, se puede producir en una región del extremo, p. ej., en una posición en un nucleótido del extremo o en los últimos 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de una cadena, o se puede producir en regiones de dúplex y/o de cadena simple, particularmente en los extremos. El extremo 5’ o los extremos 3’ pueden estar fosforilados.

La estabilidad de un ácido nucleico de la invención se puede aumentar al incluir determinadas bases en los excedentes, o para incluir nucleótidos modificados, en excedentes de cadena simple, p. ej., en un excedente 5’ o 3’ o en ambos. Se pueden incluir nucleótidos de purina en los excedentes. Se pueden modificar todas o algunas de las bases en un excedente 3’ o 5’. Las modificaciones pueden incluir el uso de modificaciones en el grupo 2′ OH del azúcar ribosa, el uso de desoxirribonucleótidos en vez de ribonucleótidos y modificaciones en el grupo fosfato, tal como modificaciones de fosforotioato. Los excedentes no necesitan ser homólogos a la secuencia diana.

Las nucleasas pueden hidrolizar enlaces de fosfodiéster de ácido nucleico. Sin embargo, las modificaciones químicas a ácidos nucleicos pueden conferir una mejora en las propiedades y tornar los oligorribonucleótidos más estables con respecto a las nucleasas.

Los ácidos nucleicos modificados, tal como se usan en la presente, pueden incluir una o más:

(i) alteraciones, p. ej., reemplazos, de uno o ambos oxígenos de fosfato no enlazados y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato enlazados (a los que se refiere como enlazados incluso si se encuentran en el extremo 5' y 3' del ácido nucleico de la invención);

(ii) alteraciones, p. ej., reemplazos, de un constituyente del azúcar ribosa, p. ej., del 2’ hidroxilo en el azúcar ribosa;

(iii) reemplazos del resto de fosfato con enlazadores «defosfo»;

(iv) modificaciones o reemplazos de una base de origen natural;

(v) reemplazos o modificaciones de la estructura principal de ribosa-fosfato;

(vi) modificaciones del extremo 3’ o el extremo 5’ del ARN, p. ej., eliminaciones, modificaciones o reemplazos de un grupo fosfato del extremo o conjugaciones de un resto, p. ej., un resto etiquetado de forma fluorescente, con el extremo 3’ o 5’ del ARN.

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

A continuación se describen más detalladamente modificaciones específicas.

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

El enlazador de fosfato también se puede modificar mediante el reemplazo de un oxígeno enlazado con nitrógeno (fosforamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (metilenfosfonatos puenteados). El reemplazo se puede producir en un oxígeno del extremo. Es posible reemplazar los oxígenos no enlazados con nitrógeno.

Un nucleótido modificado puede incluir la modificación de los grupos de azúcar. El grupo 2’ hidroxilo (OH) se puede modificar o reemplazar con una cantidad de sustituyentes «oxi» o «desoxi» diferentes.

Los ejemplos de modificaciones del grupo “oxi”-2′ hidroxilo incluyen alcoxi o ariloxi (OR, p. ej., R=H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), O(CH2CH2O)nCH2CH2OR; ácidos nucleicos «bloqueados» (ANB) en los que el 2′ hidroxilo está conectado, p. ej., mediante un puente de metileno, al 4′ carbono del mismo azúcar ribosa; O-AMINA (AMINA=NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroaril amino o diheteroaril amino, etileno diamina, poliamino) y aminoalcoxi, O(CH2)nAMINA, (p. ej., AMINA=NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroaril amino o diheteroaril amino, etileno diamina, poliamino).

Las modificaciones de «desoxi» incluyen hidrógeno, halógeno, amino (p. ej., NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, diheteroaril amino o aminoácido); NH(CH2CH2NH)nCH2CH2-AMINA (AMINA=NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroaril amino o diheteroaril amino), —NHC(O)R (R=alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alquenilo y alquinilo, que pueden estar sustituidos opcionalmente con, p. ej., una funcionalidad de amino. Otros sustituyentes de determinadas modalidades incluyen 2′-metoxietilo, 2′-OCH3, 2′-O-alilo, 2′-C-alilo y 2′-fluoro.

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

Los nucleótidos modificados también pueden incluir azúcares «abásicos» a los que les falta una nucleobase en C—1′. Estos azúcares abásicos pueden contener además modificaciones en uno o más de los átomos de azúcar constituyentes.

Las modificaciones 2’ se pueden usar en combinación con una o más modificaciones de enlazador de fosfato (p. ej., fosforotioato).

Los grupos fosfato se pueden reemplazar de manera individual mediante conectores que no contienen 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 modalidades, los reemplazos pueden incluir grupos metilencarbonilamino y metilenmetilimino.

El enlazador de fosfato y el azúcar ribosa se pueden reemplazar con nucleótidos resistentes a nucleasas.

Los ejemplos incluyen sustitutos nucleósidos de ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés), morfolino, ciclobutilo y/o pirrolidina. En determinadas modalidades, se pueden usar sustitutos de PNA.

Los extremos 3’ y 5’ de un oligonucleótido se pueden modificar. Tales modificaciones se pueden encontrar 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 del extremo entero o de uno o más de los átomos del grupo fosfato. Por ejemplo, los extremos 3′ y 5′ de un oligonucleótido se pueden conjugar con otras entidades moleculares funcionales tales como restos de marcado, p. ej., fluoróforos (p. ej., tintes de pireno, TAMRA, fluoresceína, Cy3 o Cy5) o grupos protectores (con base, p. ej. en azufre, silicio, boro o éster). Las entidades moleculares funcionales se pueden unir al azúcar mediante un grupo fosfato y/o un enlazador. El átomo del extremo del enlazador se puede conectar a o reemplazar el átomo enlazador del grupo fosfato o el grupo C-3′ o C-5′ O, N, S o C del azúcar. De manera alternativa, el enlazador se puede conectar o reemplazar el átomo del extremo de un sustituto de nucleótido (p. ej., PNA). Estos espaciadores o enlazadores pueden incluir, p. ej., —$(CH_2)_n$—, —$(CH_2)_n$N—, —$(CH_2)_n$O—, —$(CH_2)_n$S—, — $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O$— (p. ej., 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 del extremo incluyen tintes, agentes intercalantes (p. ej., acridinas), agentes reticulantes (p. ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p. ej., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales, EDTA, portadores lipofílicos (p. ej., 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)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados de péptidos (p. ej., péptido antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (p. ej., PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (p. ej., biotina), facilitadores de transporte/absorción (p. ej., aspirina, vitamina E, ácido fólico),

ribonucleasas sintéticas (p. ej., imidazol, bisimidazol, histamina, grupos de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu3+ de tetraazamacrociclos).

Se pueden agregar modificaciones en el extremo por una variedad de razones, lo que incluye modular la actividad o modular la resistencia a la degradación. Las modificaciones en el extremo 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 el extremo 5’ o incluir un análogo de fosforilo en el extremo 5’ de cebado. Las modificaciones de 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′); casquete de guanosina 5′ (7-metilado o no metilado) (7m-G-O-5′-(HO)(O)P—O—(HO)(O)P—O—P(HO)(O)—O-5′); casquete de adenosina 5′ (Appp) y cualquier estructura de casquete de nucleótido modificada o no modificada (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 de monofosfatos, difosfatos y trifosfatos reemplazados con oxígeno/azufre (p. ej., 5′-alfa-tiotrifosfato, 5′-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5′-fosforamidatos ((HO)2(O)P—NH-5′, (HO)(NH2)(O)P—O-5′), 5′-alquilfosfonatos (R=alquilo=metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., p. ej., RP(OH)(O)—O-5′-, $(OH)_2(O)P$-5′-CH_2-), 5'vinilfosfonato, 5′-alquileterfosfonatos (R=alquiléter=metoximetilo ($MeOCH_2$-), etoximetilo, etc., p. ej., RP(OH)(O)—O-5′-).

Las modificaciones en el extremo también pueden ser útiles para monitorear la distribución y en tales casos los grupos a incluir pueden incluir fluoróforos, p. ej., fluoresceína o un tinte Alexa. Las modificaciones en el extremo también pueden ser útiles para mejorar la absorción, las modificaciones útiles para esto incluyen colesterol. Las modificaciones en el extremo también pueden ser útiles para reticular un agente de ARN a otro resto.

Las bases más comunes que se encuentran en el ARN son adenina, guanina, citosina y uracilo. Estas bases se pueden modificar o reemplazar para proporcionar ARN con propiedades mejoradas. P. ej., los oligorribonucleótidos resistentes a nucleasas se pueden preparar con estas bases o con nucleobases naturales y sintéticas (p. ej., inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina o tubercidina) y cualquiera de las

modificaciones que preceden. De manera alternativa, se pueden emplear análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases que preceden y de las «bases universales». Los ejemplos incluyen 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo 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 sustituidas con N-2, N-6 y O-6, lo que incluye 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-deaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquil citosina, 7-deazaadenina, N6,N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-amino-alil-uracilo, N3-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrolo, 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.

Tal como se usa en la presente, la expresión «análogo de nucleótido que no se aparea» significa un análogo de nucleótido que incluye un resto sin apareamiento de bases que incluye, de manera no taxativa: 6 des amino adenosina (Nebularina), 4-Me-indol, 3-nitropirrolo, 5-nitroindol, Ds, Pa, N3-Me ribo U, N3-Me riboT, N3-Me dC, N3-Me-dT, N1-Me-dG, N1-Me-dA, N3-etil-dC, N3-Me dC. En algunas modalidades, el análogo de nucleótido sin apareamiento de bases es un ribonucleótido. En otras modalidades es un desoxirribonucleótido.

Tal como se usa en la presente, la expresión «grupo funcional del extremo» incluye, de manera no taxativa, un grupo halógeno, alcohol, amina, carboxílico, éster, amida, aldehído, cetona, éter.

Determinados restos se pueden enlazar al extremo 5’ de la primera cadena o la segunda cadena. Estos incluyen un resto de ribosa abásica, resto de desoxirribosa abásica, modificaciones a restos de ribosa abásica y desoxirribosa abásica, lo que incluye modificaciones de 2′ O alquilo; restos de ribosa abásica y desoxirribosa abásica invertidos y modificaciones de estos, C6-imino-Pi; un nucleótido especular, lo que incluye L-ADN y L-ARN;

5′OMe nucleótido; y análogos de nucleótidos que incluyen nucleótido 4′,5′-metileno; 1-(β-D-eritrofuranosil)nucleótido; nucleótido 4′-tio, 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 1,5-anhidrohexitol; alfa-nucleótido; nucleótido treo-pentofuranosilo; nucleótido 3′,4′-seco acíclico; nucleótido 3,4-dihidroxibutilo; nucleótido 3,5-dihidroxipentilo, resto abásico 5′-5′-invertido; fosfato de 1,4-butanediol; 5′-amino; y restos de 5′-mercapto y metilfosfonato puenteado o no puenteado.

El ácido nucleico de la presente invención puede comprender un nucleótido abásico. El término «abásico», tal como se usa en la presente, se refiere a restos que carecen de una base o que tienen otros grupos químicos en vez de una base en la posición 1', por ejemplo, un derivado de la ribosa desoxiabásica 3',3'-enlazado o 5',5'-enlazado.

El ácido nucleico puede comprender uno o más nucleótidos en la segunda y/o la primera cadena que estén modificados. Los nucleótidos alternados se pueden modificar para formar nucleótidos modificados.

Alternados, tal como se describe en la presente, significa que se producen uno después del otro de forma regular. En otras palabras, alternante significa que se producen sucesivamente de manera repetida. Por ejemplo, si se modifica un nucleótido, el siguiente nucleótido contiguo no se modifica y el siguiente nucleótido contiguo se modifica y así sucesivamente. Se puede modificar un nucleótido con una primera modificación, el siguiente nucleótido contiguo se puede modificar con una segunda modificación y el siguiente nucleótido contiguo se modifica con la primera modificación y así sucesivamente, donde la primera y la segunda modificaciones son diferentes.

Se puede modificar uno o más de los nucleótidos impares de la primera cadena del ácido nucleico de la invención, en donde la primera cadena se numera de 5’ a 3’, el nucleótido más cercano a 5’ es el nucleótido número 1 de la primera cadena. El término «impar», tal como se describe en la presente, significa un número que no se puede dividir entre dos. Los ejemplos de números impares son 1, 3, 5, 7, 9, 11 y así sucesivamente. Se puede modificar uno o más de los nucleótidos pares de la primera cadena del ácido nucleico de la invención, en donde la primera cadena se numera de 5’ a 3’. El término «par», tal como se describe en la presente, significa un número que se puede dividir uniformemente entre dos. Los ejemplos de números pares son 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y así sucesivamente. Se puede modificar uno o más de los

nucleótidos impares de la segunda cadena del ácido nucleico de la invención, en donde la segunda cadena se numera de 3’ a 5’, el nucleótido más cercano a 3’ es el nucleótido número 1 de la segunda cadena. Se puede modificar uno o más de los nucleótidos pares de la segunda cadena del ácido nucleico de la invención, en donde la segunda cadena se numera de 3' a 5'.

Se pueden modificar uno o más nucleótidos en la primera y/o la segunda cadena para formar nucleótidos modificados. Se puede modificar uno o más de los nucleótidos impares de la primera cadena. Se pueden modificar 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 el uno o más nucleótidos impares. Al menos uno del uno o más nucleótidos pares modificados puede ser adyacente a al menos uno del uno o más nucleótidos impares modificados.

Se pueden modificar múltiples nucleótidos impares en la primera cadena en el ácido nucleico de la invención. Se pueden modificar múltiples nucleótidos pares en la primera cadena mediante una segunda modificación. La primera cadena puede comprender nucleótidos adyacentes modificados por una modificación común. La primera cadena puede además comprender nucleótidos adyacentes modificados por una segunda modificación diferente.

Se puede modificar uno o más de los nucleótidos impares de la segunda cadena mediante una modificación que es diferente a la modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena y/o se puede modificar uno o más de los nucleótidos pares de la segunda cadena mediante la misma modificación que los nucleótidos impares de la primera cadena. Al menos uno del uno o más nucleótidos pares modificados de la segunda cadena puede ser adyacente al uno o más nucleótidos impares modificados. Se pueden modificar múltiples nucleótidos impares de la segunda cadena mediante una modificación común y/o se pueden modificar múltiples nucleótidos pares mediante la misma modificación que se encuentra presente en los nucleótidos impares de la primera cadena. Se pueden modificar múltiples nucleótidos impares de la segunda cadena 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 modificados por una modificación común, la cual puede ser una segunda modificación que es 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 se pueden modificar mediante una modificación común y cada uno de los nucleótidos pares se puede modificar en la primera cadena con una segunda modificación y cada uno de los nucleótidos impares se puede modificar 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 en al menos un nucleótido con respecto a los nucleótidos no modificados o modificados de manera diferente de la segunda cadena.

Uno o más o cada uno de los nucleótidos impares se puede modificar en la primera cadena y uno o más o cada uno de los nucleótidos pares se puede modificar en la segunda cadena. Uno o más o cada uno de los nucleótidos alternantes en cualquiera o ambas cadenas se pueden modificar mediante una segunda modificación. Uno o más o cada uno de los nucleótidos pares se puede modificar en la primera cadena y uno o más o cada uno de los nucleótidos pares se puede modificar en la segunda cadena. Uno o más o cada uno de los nucleótidos alternantes en cualquiera o ambas cadenas se pueden modificar mediante una segunda modificación. Uno o más o cada uno de los nucleótidos impares se puede modificar en la primera cadena y uno o más de los nucleótidos impares se puede modificar en la segunda cadena mediante una modificación común. Uno o más o cada uno de los nucleótidos alternantes en cualquiera o ambas cadenas se pueden modificar mediante una segunda modificación. Uno o más o cada uno de los nucleótidos pares se puede modificar en la primera cadena y uno o más o cada uno de los nucleótidos impares se puede modificar en la segunda cadena mediante una modificación común. Uno o más o cada uno de los nucleótidos alternantes en cualquiera o ambas cadenas se pueden modificar mediante una segunda modificación.

El ácido nucleico de la invención puede comprender construcciones de cadena simple o doble que comprenden al menos dos regiones de modificaciones alternantes en una o ambas cadenas. Estas regiones alternantes pueden comprender hasta alrededor de 12 nucleótidos, pero preferentemente comprenden de alrededor de 3 a alrededor de 10 nucleótidos. Las regiones de nucleótidos alternantes pueden estar ubicadas en los extremos de una o ambas cadenas del ácido nucleico de la invención. El ácido nucleico puede comprender de 4 a alrededor de 10 nucleótidos de nucleótidos alternantes en cada uno de los extremos (3’ y 5’) y

estas regiones pueden estar separadas por de alrededor de 5 a alrededor de 12 nucleótidos modificados de manera común o diferente o no modificados contiguos.

Se pueden modificar los nucleótidos impares de la primera cadena y se pueden modificar los nucleótidos pares con una segunda modificación. La segunda cadena puede comprender nucleótidos adyacentes modificados con una modificación común, la cual puede ser la misma que la modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena. También se puede modificar uno o más nucleótidos de la segunda cadena con la segunda modificación. Uno o más nucleótidos con la segunda modificación pueden ser adyacentes el uno al otro y a nucleótidos con una modificación igual a la modificación de los nucleótidos impares de la primera cadena. La primera cadena también puede comprender enlaces fosforotioato entre los dos nucleótidos en el extremo 3’ y en el extremo 5’. La segunda cadena puede comprender un enlace fosforotioato entre los dos nucleótidos en el extremo 5’. La segunda cadena también se puede conjugar con un ligando en el extremo 5’.

El ácido nucleico de la invención puede comprender una primera cadena que comprende nucleótidos adyacentes que se modifican con una modificación común. Uno o más de tales nucleótidos pueden ser adyacentes a uno o más nucleótidos que se pueden modificar con una segunda modificación. Uno o más nucleótidos con la segunda modificación pueden ser adyacentes. La segunda cadena puede comprender nucleótidos adyacentes modificados con una modificación común, la cual puede ser la misma que una de las modificaciones de uno o más nucleótidos de la primera cadena. También se puede modificar uno o más nucleótidos de la segunda cadena con la segunda modificación. Uno o más nucleótidos con la segunda modificación pueden ser adyacentes. La primera cadena también puede comprender enlaces fosforotioato entre los dos nucleótidos en el extremo 5’ y en el extremo 3’. La segunda cadena puede comprender un enlace fosforotioato entre los dos nucleótidos en el extremo 3’. La segunda cadena también se puede conjugar con un ligando en el extremo 5’.

Los nucleótidos numerados de 5' a 3' en la primera cadena y de 3' a 5' en la segunda cadena, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25, se pueden modificar mediante una modificación en la primera cadena. Los nucleótidos numerados 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 se pueden modificar mediante una segunda modificación en la primera cadena. Los nucleótidos numerados 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 se pueden modificar mediante una modificación en la segunda cadena. Los nucleótidos numerados 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18,

20, 22 y 24 se pueden modificar mediante una segunda modificación en la segunda cadena. Los nucleótidos se numeran en pro del ácido nucleico de la presente invención de 5’ a 3’ en la primera cadena y de 3’ a 5’ en la segunda cadena.

Los nucleótidos numerados 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 se pueden modificar mediante una modificación en la primera cadena. Los nucleótidos numerados 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 se pueden modificar mediante una segunda modificación en la primera cadena. Los nucleótidos numerados 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 se pueden modificar mediante una modificación en la segunda cadena. Los nucleótidos numerados 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 se pueden modificar mediante una segunda modificación en la segunda cadena.

Claramente, si la primera y/o la segunda cadena son más cortas que 25 nucleótidos de longitud, tal como 19 nucleótidos de longitud, no habrán nucleótidos numerados 20, 21, 22, 23, 24 y 25 a modificar. Por consiguiente, el experto en la técnica entiende que la descripción que antecede se puede aplicar a cadenas más cortas.

Uno o más nucleótidos modificados de la primera cadena se pueden aparear con nucleótidos modificados en la segunda cadena que tienen una modificación común. Uno o más nucleótidos modificados de la primera cadena se pueden aparear con nucleótidos modificados en la segunda cadena que tienen una modificación diferente. Uno o más nucleótidos modificados de la primera cadena se pueden aparear con nucleótidos no modificados en la segunda cadena. Uno o más nucleótidos modificados de la segunda cadena se pueden aparear con nucleótidos no modificados en la primera cadena. En otras palabras, los nucleótidos alternantes se pueden alinear en las dos cadenas de tal forma que, por ejemplo, todas las modificaciones en las regiones alternantes de la segunda cadena estén apareadas con modificaciones idénticas en la primera cadena o, de manera alternativa, las modificaciones se pueden desplazar en un nucleótido con las modificaciones comunes en las regiones alternantes de un apareamiento de cadena con modificaciones diferentes (es decir, una segunda modificación o una modificación adicional) en la otra cadena. Otra opción es tener modificaciones distintas en cada una de las cadenas.

Las modificaciones de la primera cadena se pueden desplazar en un nucleótido con respecto a los nucleótidos modificados de la segunda cadena, de tal forma que los nucleótidos modificados comunes no se apareen entre sí.

La modificación y/o modificaciones se pueden seleccionar cada una, de manera individual del grupo que consiste en desoxi-timina del extremo 3', 2'-O-metilo, una modificación 2'-desoxi, una modificación 2'-amino, una modificación 2'-alquilo, una modificación morfolino, una modificación fosforamidato, una modificación del grupo 5'-fosforotioato, una modificación 5' fosfato o imitación de 5' fosfato y una modificación de un derivado de colesterilo o del grupo bisdecilamido del ácido dodecanoico y/o el nucleótido modificado puede ser cualquiera de un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico o un nucleótido que comprende una base no natural.

Al menos una modificación puede ser 2'-O-metilo y/o al menos una modificación puede ser 2'-F. Se pueden encontrar modificaciones adicionales tal como se describen en la presente en la primera y/o la segunda cadenas.

A lo largo de la descripción de la invención, «modificación igual o común» significa la misma modificación a cualquier nucleótido, ya sea A, G, C o U modificado con un grupo tal como un grupo metilo o un grupo fluoro. No se interpreta como que significa la misma adición en el mismo nucleótido. Por ejemplo, 2’F-dU, 2’F-dA, 2’F-dC, 2’F-dG se consideran todos una modificación igual o común, al igual que 2'-OMe-rU, 2'-OMe-rA; 2'-OMe-rC; 2'-OMe-rG. Una modificación 2’-F es una modificación diferente a una modificación 2’-OMe.

En los ejemplos se muestran algunas secuencias de ácido nucleico modificadas representativas de la presente invención. Estos ejemplos pretenden ser representativos y no taxativos.

Preferentemente, el ácido nucleico puede comprender una modificación y una segunda modificación o modificación adicional que se seleccionan cada una, de manera individual, del grupo que comprende la modificación 2'-O-metilo y la modificación 2'-F. El ácido nucleico puede comprender una modificación que es 2'-O-metilo (2’-OMe), que puede ser una primera modificación y una segunda modificación que es 2'-F. El ácido nucleico de la invención también puede incluir una modificación fosforotioato y/o una modificación desoxi que puede estar presente en o entre los nucleótidos 2 o 3 del extremo de cada uno o cualquiera de los extremos de cada una o ambas cadenas.

La invención proporciona como un aspecto adicional un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, en donde

los nucleótidos de la primera cadena se modifican mediante una primera modificación en los nucleótidos impares y se modifican mediante una segunda modificación en los nucleótidos pares, y los nucleótidos de la segunda cadena se modifican mediante una tercera modificación en los nucleótidos pares y se modifican mediante una cuarta modificación en los nucleótidos impares, en donde al menos la primera modificación es distinta de la segunda modificación y la tercera modificación es distinta de la cuarta modificación. La tercera y la primera modificaciones pueden ser iguales o diferentes, la segunda y la cuarta modificaciones pueden ser iguales o diferentes. La primera y la segunda modificaciones pueden ser diferentes entre sí y la tercera y la cuarta modificaciones pueden ser diferentes entre sí.

La segunda cadena puede comprender una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 o 44. Los nucleótidos de la primera cadena se pueden modificar mediante una primera modificación en los nucleótidos impares y se pueden modificar con una segunda modificación en los nucleótidos pares, y la segunda cadena se puede modificar en los nucleótidos impares con la segunda modificación y modificarse con la primera modificación en los nucleótidos pares. La primera modificación puede ser 2’OMe y la segunda modificación puede ser 2’F. La primera cadena puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 9 y/o la segunda cadena puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10. Las modificaciones pueden ser aquellas establecidas en la Tabla 1.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo y el nucleótido en la segunda cadena que corresponde a la posición 13 de la primera cadena no se modifica con una modificación 2’ O-metilo.

Un nucleótido en la segunda cadena que «corresponde a» una posición en la primera cadena es de manera adecuada el nucleótido que forma un par de bases con ese nucleótido en la primera cadena.

En un aspecto el nucleótido de la segunda cadena que corresponde a la posición 13 de la primera cadena es el nucleótido que forma un par de bases con la posición 13 de la primera cadena.

En un aspecto el nucleótido de la segunda cadena que corresponde a la posición 11 de la primera cadena es el nucleótido que forma un par de bases con la posición 11 de la primera cadena.

En un aspecto el nucleótido de la segunda cadena que corresponde a la posición 12 de la primera cadena es el nucleótido que forma un par de bases con la posición 12 de la primera cadena.

Esta nomenclatura se puede aplicar a otras posiciones de la segunda cadena. Por ejemplo, en un ácido nucleico de 19 meros de cadena doble y extremo romo, la posición 13 de la primera cadena se aparearía con la posición 7 de la segunda cadena. La posición 11 de la primera cadena se aparearía con la posición 9 de la segunda cadena. Esta nomenclatura se puede aplicar a otras posiciones de la segunda cadena.

El nucleótido que corresponde a la posición 13 de la primera cadena se encuentra de manera adecuada en la posición 13 de la segunda cadena, contando a partir del extremo 3’ de la segunda cadena, comenzando en el primer nucleótido de la región de cadena doble. Del mismo modo, la posición 11 de la segunda cadena es de manera adecuada el 11º nucleótido del extremo 3’ de la segunda cadena, comenzando en el primer nucleótido de la región de cadena doble. Esta nomenclatura se puede aplicar a otras posiciones de la segunda cadena.

En un aspecto, en el caso de una primera y segunda cadenas parcialmente complementarias, el nucleótido de la segunda cadena que «corresponde a» una posición en la primera cadena puede que no forme necesariamente un par de bases si esa posición es la posición en la que hay un error de apareamiento, pero el principio de la nomenclatura sigue siendo válido.

Se prefiere una primera y una segunda cadenas totalmente complementarias sobre la región de dúplex (ignorando cualquier región excedente) y que no haya errores de apareamiento dentro de la región de cadena doble del ácido nucleico.

También se prefiere:

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 desde el extremo 5’ de la primera cadena no se modifica con una modificación de 2’ O-metilo y el nucleótido en la segunda cadena que corresponde con la posición 11 de la primera cadena no se modifica con una modificación de 2’ O-metilo.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’

O-metilo y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a la posiciones 11 y 13 de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo.

En un aspecto el nucleótido de la segunda cadena que corresponde a la posición 12 de la primera cadena no se modifica con una modificación 2’ O-metilo. Esta limitación del ácido nucleico se puede ver con cualquier otra limitación descrita en la presente.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a las posiciones 11-13 de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a la posición 11 o 13 o 11 y 13 o 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a la posición 11 o 13 o 11 y 13 o 11-13 de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a la posición 11 o 13 o 11 y 13 o preferentemente 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro. Preferentemente en esta modalidad, todos los nucleótidos pares de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y todos los nucleótidos impares de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ O-metilo. Además, los nucleótidos de la segunda cadena que no sean los que corresponden a la posición 11 o 13, o 11 y 13, o preferentemente 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ O-metilo. Una ventaja de tal nucleico es que comprende relativamente pocos nucleótidos modificados de origen no natural, pero sin embargo puede inhibir de manera eficaz el gen diana durante largos períodos de tiempo. Tal ácido nucleico es más fácil de sintetizar que los ácidos nucleicos con más nucleótidos de origen no natural (2’F modificado).

Un ácido nucleico como se describe en la presente en donde más del 50 % de los nucleótidos de la primera y/o la segunda cadena comprenden una modificación 2’ O-metilo, tal como mayor que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 %, o más, de la primera y/o la segunda cadena comprende una modificación 2’ O-metilo, preferentemente medido como un porcentaje de los nucleótidos totales de tanto la primera como la segunda cadena.

Un ácido nucleico como se describe en la presente en donde más del 50 % de los nucleótidos de la primera y/o la segunda cadena comprenden una modificación de ARN de origen natural, tal como en donde más de 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 %, o más, de la primera y/o la segunda cadena comprende tal modificación, preferentemente medido como un porcentaje de los nucleótidos totales de tanto la primera como la segunda cadena. Las modificaciones de origen natural adecuadas incluyen, además de 2 O’ metilo, otras modificaciones de azúcar 2’, en particular una modificación 2’ H que da como resultado un nucleótido de ADN.

Un ácido nucleico como se describe en la presente que comprende no más de 20 %, tal como no más de 15 %, tal como no más de 10 % de nucleótidos con modificaciones 2’ que no sean modificaciones 2’ O metilo en la primera y/o la segunda cadena, preferentemente como un porcentaje de los nucleótidos totales de tanto la primera como la segunda cadena.

Un ácido nucleico como se describe en la presente que comprende no más de 20 % (tal como no más de 15 % o no más de 10 %) de modificaciones 2’ fluoro en la primera y/o la segunda cadena, preferentemente como un porcentaje de los nucleótidos totales de ambas cadenas.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde todos los nucleótidos se modifican con una modificación 2’ O-metilo salvo por las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a la posición 11 o 13 o 11 y 13 o preferentemente 11-13 de la primera cadena. Preferentemente, los nucleótidos que no se modifican con 2’ O metilo se modifican con fluoro en la posición 2’.

Se prefiere un ácido nucleico como se describe en la presente en donde todos los nucleótidos del ácido nucleico se modifican en la posición 2’ del azúcar. Preferentemente, estos nucleótidos se modifican con una modificación 2’-fluoro donde la modificación no es una modificación 2’ O-Metilo.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender uno o más nucleótidos modificados en la posición 2’ con un 2’ H y, por lo tanto, que tienen un nucleótido de ADN dentro del ácido

nucleico. Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender nucleótidos de ADN en las posiciones 2 y/o 14 de la primera cadena contando a partir del extremo 5’ de la primera cadena. Los ácidos nucleicos pueden comprender nucleótidos de ADN en la segunda cadena que corresponden a la posición 11 o 13 o 11 y 13 o 11-13 de la primera cadena.

En un aspecto, no hay más de un ADN por ácido nucleico de la invención.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender uno o más nucleótidos de ANB. Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender nucleótidos de ANB en las posiciones 2 y/o 14 de la primera cadena contando a partir del extremo 5’ de la primera cadena. Los ácidos nucleicos pueden comprender ANB en la segunda cadena que corresponden a la posición 11 o 13 o 11 y 13 o 11-13 de la primera cadena.

En un aspecto, el ácido nucleico se modifica en la primera cadena, preferentemente en toda la cadena, con modificaciones 2’ O-metilo y modificaciones 2’ fluoro alternantes y las posiciones 2 y 14 (comenzando a partir del extremo 5’) se modifican con 2’ fluoro. Preferentemente, la segunda cadena se modifica con modificaciones de 2’ fluoro en los nucleótidos de la segunda cadena que corresponden a la posición 11 o 13 o 11 y 13 o preferentemente 11-13 de la primera cadena. Preferentemente, la segunda cadena se modifica con modificaciones de 2’ fluoro en las posiciones 11-13 contando a partir del extremo 3’ comenzando en la primera posición de la región complementaria (de cadena doble) y las modificaciones restantes son modificaciones de origen natural, preferentemente de 2’ O-metilo. En este caso al menos, el ácido nucleico preferentemente tiene un extremo romo al menos en el extremo que comprende el extremo 5’ de la primera cadena.

Un nucleótido de la segunda cadena que se encuentra en una posición que corresponde, por ejemplo, a un nucleótido par de la primera cadena es un nucleótido de la segunda cadena que forma un emparejamiento de bases con un nucleótido par de la primera cadena.

En un aspecto de la ácido nucleico, el/los nucleótido/nucleótidos de la segunda cadena en una posición que corresponde al nucleótido 11 o el nucleótido 13 o los nucleótidos 11 y 13 o preferentemente los nucleótidos 11-13 de la primera cadena se modifica/n mediante una cuarta modificación. Preferentemente, todos los nucleótidos de la segunda cadena que no sean el/los nucleótido/nucleótidos en una posición que corresponde al nucleótido 11 o el nucleótido 13 o los nucleótidos 11 y 13 o preferentemente los nucleótidos 11-13 de la primera cadena se modifica/n por una tercera modificación. Preferentemente en los mismos

nucleótidos 2 y 14 de ácido nucleico o preferentemente todos los nucleótidos pares de la primera cadena se modifican con una primera cadena. Además, o alternativamente, los nucleótidos impares de la primera cadena se modifican con una segunda modificación. La cuarta modificación es preferentemente diferente de la segunda modificación y preferentemente diferente de la tercera modificación y la cuarta modificación es preferentemente igual a la primera modificación. La primera y la cuarta modificaciones son preferentemente una modificación 2'-OMe y la segunda y tercera modificaciones son preferentemente una modificación 2'-F. Los nucleótidos de la primera cadena se enumeran de manera consecutiva comenzando con el número de nucleótido 1 en el extremo 5' de la primera cadena.

En un aspecto del ácido nucleico, todos los nucleótidos pares de la primera cadena se modifican mediante una primera modificación, todos los nucleótidos impares de la primera cadena se modifican mediante una segunda modificación, todos los nucleótidos de la segunda cadena en las posiciones que corresponden a los nucleótidos 11-13 de la primera cadena se modifican mediante una cuarta modificación, todos los nucleótidos de la segunda cadena salvo por los nucleótidos que corresponden a los nucleótidos 11-13 de la primera cadena se modifican mediante una tercera modificación, en donde la primera y cuarta modificaciones son 2'-F y la segunda y tercera modificaciones son 2'-OMe. Los nucleótidos de la primera cadena se enumeran de manera consecutiva comenzando con el número de nucleótido 1 en el extremo 5' de la primera cadena.

En un aspecto del ácido nucleico, cada uno de los nucleótidos de la primera cadena y de la segunda cadena es un nucleótido modificado.

Un aspecto es un ácido nucleico de cadena doble para inhibir la expresión de *LPA,* preferentemente en una célula, en donde el ácido nucleico comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde la secuencia de la primera cadena comprende una secuencia de al menos 15 nucleótidos que difieren en no más de 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 9, 5, 1, 3, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, preferentemente la SEQ ID NO: 9, en donde todos los nucleótidos pares de la primera cadena se modifican mediante una primera modificación, todos los nucleótidos impares de la primera cadena se modifican mediante una segunda modificación, todos los nucleótidos de la segunda cadena en las posiciones que corresponden a los nucleótidos 11-13

de la primera cadena se modifican mediante una cuarta modificación, todos los nucleótidos de la segunda cadena salvo por los nucleótidos que corresponden a los nucleótidos 11-13 de la primera cadena se modifican mediante una tercera modificación, en donde la primera y cuarta modificaciones son 2’-F y la segunda y tercera modificaciones son 2’-OMe.

Un aspecto son ácidos nucleicos que son moléculas de ARNip en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo y el ácido nucleico comprende uno o más o todos de:

(i) un nucleótido invertido, preferentemente un enlace 3’-3’ en el extremo 3’ de la segunda cadena;

(ii) uno o más enlaces fosforoditioato;

(iii) el nucleótido de la segunda cadena que corresponde a la posición 11 o 13 de la primera cadena no se modifica con una modificación 2’ O-metilo, preferentemente en donde una o ambas de estas posiciones comprenden una modificación 2’ fluoro;

(iv) el ácido nucleico comprende al menos 80 % de todos los nucleótidos que tienen una modificación 2’-O-metilo;

(v) el ácido nucleico comprende no más de 20 % de los nucleótidos que tienen modificaciones 2’ fluoro.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena y los nucleótidos en las posiciones 7 y/o 9, o 7 - 9 del extremo 5’ de la segunda cadena se modifican con una modificación 2' fluoro y al menos 90 % de los nucleótidos restantes se modifican con 2’-O metilo o comprenden otra modificación 2’ de origen natural.

Los ejemplos específicos preferidos para un ácido nucleico de 19 bases de cadena doble romo sin excedente son:

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo y el nucleótido en la posición 7 del extremo 5’ de la segunda cadena no se modifica con una modificación 2’ O-metilo.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’

O-metilo y el nucleótido en la posición 9 del extremo 5’ de la segunda cadena no se modifica con una modificación 2’ O-metilo.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo y los nucleótidos en las posiciones 7 y 9 del extremo 5’ de la segunda cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo y los nucleótidos en las posiciones 7 - 9 del extremo 5’ de la segunda cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo y los nucleótidos en las posiciones 7 y/o 9 o 7-9 del extremo 5’ de la segunda cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en las posiciones 7 y/o 9 o 7 - 9 del extremo 5’ de la segunda cadena no se modifican con una modificación 2’ O-metilo.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en las posiciones 7 y/o 9 o 7 - 9 del extremo 5’ de la segunda cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro.

Un ácido nucleico como se describe en la presente en donde más del 50 % de los nucleótidos de la primera y/o la segunda cadena comprenden una modificación 2’ O-metilo, tal como mayor que 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 %, o más, de la primera y/o la segunda cadena comprende una modificación 2’ O-metilo, preferentemente medido como un porcentaje de los nucleótidos totales de tanto la primera como la segunda cadena.

Un ácido nucleico como se describe en la presente en donde más del 50 % de los nucleótidos de la primera y/o la segunda cadena comprenden una modificación de ARN de origen natural, tal como en donde más de 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 %, o más, de la primera y/o la segunda cadena comprende tal modificación, preferentemente medido como un

porcentaje de los nucleótidos totales de tanto la primera como la segunda cadena. Las modificaciones de origen natural adecuadas incluyen, además de 2 O' metilo, otras modificaciones de azúcar 2', en particular una modificación 2' H que da como resultado un nucleótido de ADN.

Un ácido nucleico como se describe en la presente que comprende no más de 20 %, tal como no más de 15 %, tal como más de 10 % de nucleótidos con modificaciones 2' que no sean modificaciones 2' O metilo en la primera y/o la segunda cadena, preferentemente como un porcentaje de los nucleótidos totales de tanto la primera como la segunda cadena.

Un ácido nucleico como se describe en la presente que comprende no más de 20 % (tal como no más de 15 % o no más de 10 %) de modificaciones 2' fluoro en la primera y/o la segunda cadena, preferentemente como un porcentaje de los nucleótidos totales de ambas cadenas.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde todos los nucleótidos se modifican con una modificación 2' O-metilo salvo por las posiciones 2 y 14 del extremo 5' de la primera cadena y los nucleótidos en las posiciones 7 y/o 9 del extremo 5' de la segunda cadena. Preferentemente, los nucleótidos que no se modifican con 2' O metilo se modifican con fluoro en la posición 2'.

Un ácido nucleico como se describe en la presente, en donde todos los nucleótidos se modifican con una modificación 2' O-metilo salvo por las posiciones 2 y 14 del extremo 5' de la primera cadena y los nucleótidos en las posiciones 7 - 9 del extremo 5' de la segunda cadena. Preferentemente, los nucleótidos que no se modifican con 2' O metilo se modifican con fluoro en la posición 2'.

Para un ácido nucleico que comprende una región de dúplex de 20 pares de bases, la segunda cadena preferentemente no tiene un grupo 2' O-metilo en los nucleótidos 8 o 9 o 10 contando a partir del extremo 5' del dúplex que corresponde a las posiciones 13, 12 y 11 de la primera cadena respectivamente.

Para un ácido nucleico que comprende una región de dúplex de 21 pares de bases, la segunda cadena preferentemente no tiene un grupo 2' O-metilo en los nucleótidos 9 o 10 o 11 contando a partir del extremo 5' del dúplex que corresponde a las posiciones 13, 12 y 11 de la primera cadena respectivamente.

El ácido nucleico de la presente invención puede incluir una o más modificaciones de fosforotioato en uno o más de los extremos de la primera y/o la segunda cadenas. De manera

opcional, cada uno o cualquiera de los extremos de la primera cadena pueden comprender uno o dos o tres nucleótidos modificados con fosforotioato. De manera opcional, cada uno o cualquiera de los extremos de la segunda cadena pueden comprender uno o dos o tres nucleótidos modificados con fosforotioato.

En una modalidad, la primera cadena puede incluir al menos un enlace fosforotioato (ps).

En una modalidad, la primera cadena puede comprender además un enlace fosforotioato entre los dos nucleótidos del extremo 3’ o enlaces fosforotioato entre los tres nucleótidos del extremo 3’.

En una modalidad, los enlaces entre los otros nucleótidos en la primera cadena son enlaces fosfodiéster.

En una modalidad, la primera cadena puede incluir más de 1 enlace fosforotioato.

En una modalidad adicional, la segunda cadena puede comprender un enlace fosforotioato entre los dos nucleótidos del extremo 3’ o enlaces fosforotioato entre los tres nucleótidos del extremo 3’.

En otra modalidad adicional, la segunda cadena puede comprender un enlace fosforotioato entre los dos nucleótidos del extremo 5’ o enlaces fosforotioato entre los tres nucleótidos del extremo 5’.

En un aspecto, el ácido nucleico comprende uno o más enlaces fosforoditioato, tal como 1, 2, 3 o 4 enlaces fosforoditioato. Preferentemente, hay hasta 4 enlaces fosforoditioato, uno en cada uno de los extremos 5’ y 3’ de la primera y segunda cadenas.

El uso de un enlace fosforoditioato en el ácido nucleico de la invención reduce la variación en la estereoquímica de una población de moléculas de ácido nucleico en comparación con moléculas que comprenden un fosforoditioato en esa misma posición. El enlace fosforotioato de hecho introduce un centro quiral y es difícil de controlar cuyo oxígeno no enlazante se sustituye con azufre. El uso de un fosforoditioato asegura que no exista centro quiral en ese enlace y entonces reduce o elimina cualquier variación en la población de moléculas de ácido nucleico, dependiendo de la cantidad de enlaces fosforoditioato y fosforotioato usado en la molécula de ácido nucleico.

En un aspecto, el ácido nucleico comprende un enlace fosforotioato entre cada uno de los tres nucleótidos del extremo 3’ y/o entre cada uno de los tres nucleótidos del extremo 5’ de la primera cadena, y/o entre cada uno de los tres nucleótidos del extremo 3’ y/o entre cada uno

de los tres nucleótidos del extremo 5’ de la segunda cadena cuando no hay enlaces fosforoditioato presentes en ese extremo. Si no hay un enlace fosforoditioato presente en un extremo significa que el enlace entre los dos nucleótidos del extremo o preferentemente entre los tres nucleótidos del extremo del extremo del ácido nucleico en cuestión son enlaces que no sean enlaces fosforoditioato.

La invención también proporciona un ácido nucleico de acuerdo con cualquier aspecto de la invención descrita en la presente, en donde la primera cadena de ARN tiene un nucleótido (E)-vinilfosfonato del extremo 5’, y el nucleótido (E)-vinilfosfonato del extremo 5’ está unido al segundo nucleótido en la primera cadena mediante un enlace fosfodiéster. La primera cadena puede incluir más de un enlace fosfodiéster. En una modalidad, la primera cadena puede comprender enlaces fosfodiéster entre al menos los tres nucleótidos del extremo 5’. En una modalidad, la primera cadena puede comprender enlaces fosfodiéster entre al menos los cuatro nucleótidos del extremo 5’.

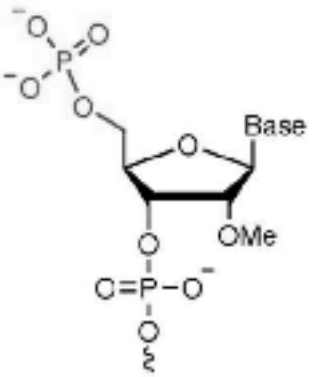
En una modalidad, la primera cadena puede comprender la fórmula (IV):

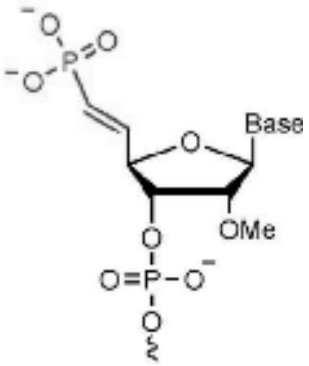
$$(vp)\text{-}N(po)[N(po)]_n\text{-} \qquad (IV)$$

donde «(vp)-» es el (E)-vinilfosfonato 5’, «N» es un nucleótido, «po» es un enlace fosfodiéster y n es de 1 a (la cantidad total de nucleótidos en la primera cadena – 2), preferentemente en donde n es de 1 a (la cantidad total de nucleótidos en la primera cadena -3), más preferentemente en donde n es de 1 a (la cantidad total de nucleótidos en la primera cadena -4).

En un aspecto, si el nucleótido más cercano a 5’ de la primera cadena es un nucleótido que no sea A o U, este nucleótido se reemplaza por A o U en la secuencia. Preferentemente, si el nucleótido más cercano a 5’ de la primera cadena es un nucleótido que no sea U, este nucleótido se reemplaza con U y, más preferentemente, con U con un vinilfosfonato 5’, en la secuencia.

Un nucleótido (E)-vinilfosfonato del extremo 5’ es un nucleótido en donde el grupo fosfato natural en el extremo 5’ se reemplazó con un E-vinilfosfonato, en el cual el átomo de oxígeno 5’ de puenteo del nucleótido del extremo de la cadena fosforilada 5’ se reemplaza con un grupo metinilo (-CH=):





Nucleótidos con un fosfato natural en el extremo 5’

Nucleótido con un E-vinilfosfonato en el extremo 5’

El (E) vinilfosfonato 5’ es una imitación de fosfato 5’. Una imitación biológica es una molécula que es capaz de llevar a cabo la misma función que y es estructuralmente muy similar a la molécula original que está siendo imitada. En el contexto de la presente invención, (E) vinilfosfonato 5’ imita la función de un fosfato 5’ normal, p. ej., al permitir la carga de RISC eficiente. Además, dada su estructura levemente alterada, (E) vinilfosfonato 5’ es capaz de estabilizar el nucleótido del extremo 5’ al protegerlo de desfosforilación mediante enzimas tal como fosfatasas.

En una modalidad, el nucleótido (E)-vinilfosfonato del extremo 5’ es un nucleótido de ARN.

En un aspecto, el ácido nucleico:

(i) tiene un enlace fosforotioato entre los tres nucleótidos del extremo 3’ y los tres nucleótidos del extremo 5’ de la primera cadena;

(ii) se conjuga con un ligando triantenario en el nucleótido del extremo 3’ o en el nucleótido del extremo 5’ de la segunda cadena;

(iii) tiene un enlace fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales de la segunda cadena en el extremo opuesto al conjugado al ligando triantenario y

(iv) todos los extremos restantes entre nucleótidos de la primera y/o la segunda cadena cadenas son enlaces fosfodiéster.

En un aspecto, el ácido nucleico:

(i) tiene un (E)-vinilfosfonato en el extremo 5’ de en el extremo 5’ de la primera cadena;

(ii) tiene un enlace fosforotioato entre los tres nucleótidos del extremo 3’ en la primera y la segunda cadenas y entre los tres nucleótidos del extremo 5’ de la segunda cadena; y

(iii) todos los extremos restantes entre nucleótidos de la primera y/o la segunda cadena cadenas son enlaces fosfodiéster.

En un aspecto, el ácido nucleico, que preferentemente es un ARNip que inhibe la expresión de *LPA*, preferentemente mediante ribointerferencia, comprende uno o más o todos los siguiente:

(i) un nucleótido modificado;

(ii) un nucleótido modificado que no sea un nucleótido modificado con 2’-OMe en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena, preferentemente un nucleótido modificado con 2’-F;

(iii) cada uno de los nucleótidos impares de la primera cadena como se numeran comenzando con uno en el extremo 5’ de la primera cadena son nucleótidos modificados con 2’-OMe;

(iv) cada uno de los nucleótidos pares de la primera cadena como se numeran comenzando con uno en el extremo 5’ de la primera cadena son nucleótidos modificados con 2’-F;

(v) el nucleótido de la segunda cadena que corresponde a la posición 11 o 13 de la primera cadena se modifica con una modificación que no sea un modificación 2’-OMe, preferentemente en donde una o ambas de estas posiciones comprenden una modificación 2’-F;

(vi) un nucleótido invertido, preferentemente un enlace 3’-3’ en el extremo 3’ de la segunda cadena;

(vii) uno o más enlaces fosforotioato;

(viii) uno o más enlaces fosforoditioato; y/o

(ix) la primera cadena tiene un nucleótido (E)-vinilfosfonato del extremo en su extremo 5’, en cuyo caso el nucleótido (E)-vinilfosfonato del extremo 5’ es preferentemente una uridina y está unido preferentemente al segundo nucleótido en la primera cadena mediante un enlace fosfodiéster.

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 ál., 2002. JBC 277 (26):23800-06).

En un aspecto, el ácido nucleico de la invención comprende uno o más ribonucleótidos invertidos, preferentemente una adenina invertida, usando un enlace 5’-5’ o un enlace 3’-3’, preferentemente un enlace 3’-3’ en el extremo 3’ de la segunda cadena.

El ácido nucleico de la invención puede comprender un nucleótido de ARN invertido en uno o varios de los extremos de la cadena. Tales nucleótidos invertidos proporcionan estabilidad al ácido nucleico. Preferentemente, el ácido nucleico comprende al menos un nucleótido invertido en uno o varios del extremo 3' de al menos una de las cadenas y/o en el extremo 5' de la segunda cadena. Más preferentemente, el ácido nucleico comprende un nucleótido invertido en el extremo 3' de la segunda cadena. Todavía más preferentemente, el ácido nucleico comprende un nucleótido de ARN invertido en el extremo 3' de la segunda cadena y este nucleótido es preferentemente un A invertido. El nucleótido invertido preferentemente se encuentra presente en un extremo de la cadena no como excedente sino frente a un nucleótido correspondiente en la otra cadena. Un ácido nucleico con tal modificación es estable y fácil de sintetizar.

Ligandos

El ácido nucleico de la invención se puede conjugar con un ligando. La administración eficaz de oligonucleótidos, en particular ácidos nucleicos de cadena doble de la invención, a células *in vivo* es importante y requiere direccionamiento específico y protección considerable del ambiente extracelular, particularmente proteínas séricas. Un método de lograr el direccionamiento específico es conjugar un ligando con el ácido nucleico. El ligando asiste en dirigir el ácido nucleico al sitio diana necesario. Existe una necesidad de conjugar ligandos apropiados para las moléculas receptoras deseadas para que las moléculas conjugadas sean absorbidas por las células diana mediante mecanismos tales como vías de endocitosis mediadas por el receptor diferentes o procesos funcionalmente análogos.

Un ejemplo es el complejo del receptor de la asialoglicoproteína (ASGP-R) compuesto por diversas relaciones de multímeros de receptores ASGR1 y ASGR2 de la membrana, que abunda en los hepatocitos y tiene alta afinidad con el resto GalNAc descrito en la presente. Una de las primeras descripciones del uso de glicósidos conglomerados triantenarios como ligandos conjugados fue en la patente estadounidense número US 5,885,968. Los conjugados con tres ligandos GalNAc y que comprenden grupos fosfato son conocidos y se describen en Dubber et ál. (Bioconjug. Chem. enero/febrero de 2003;14(1):239-46.). El complejo ASGP-R muestra una afinidad 50 veces mayor para N-Acetil-D-Galactosilamina (GalNAc) que D-Gal.

El complejo del receptor de la asialoglicoproteína (ASGP-R), que reconoce específicamente subunidades de β-galactosilo del extremo de proteínas glicosiladas u otros oligosacáridos

(Weigel, P.H. et. ál., Biochim. Biophys. Acta. 19 de setiembre de 2002;1572(2-3):341-63) se puede usar para administrar un fármaco a los hepatocitos del hígado que expresan el complejo receptor mediante acoplamiento covalente de galactosa o galactosamina a la sustancia de fármaco (Ishibashi, S.; et. ál., J Biol. Chem. 11 de noviembre de 1994;269(45):27803-6). Además, la afinidad de unión se puede aumentar considerablemente mediante el efecto de multivalencia que se logra al repetir el resto de direccionamiento (Biessen EA, et ál., J Med Chem. 28 de abril de 1995;38(9):1538-46.).

El complejo ASGP-R es un mediador para una absorción activa de β-galactosilo del extremo que contiene glicoproteínas en los endosomas de las células. Por lo tanto, el ASGPR es muy adecuado para la administración dirigida de fármacos candidatos conjugados con tales ligandos como, p. ej., ácidos nucleicos a células que expresan el receptor (Akinc et ál., Mol Ther. julio de 2010; 18(7):1357-64).

Más generalmente, el ligando puede comprender un sacárido que se selecciona para que tenga una afinidad para al menos un tipo de receptor en una célula diana. En particular, el receptor se encuentra en la superficie de una célula hepática de un mamífero, por ejemplo, el complejo del receptor hepático de la asialoglicoproteína descrito anteriormente (ASGP-R).

El sacárido se puede seleccionar de N-acetilgalactosamina, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina y fucosa. El sacárido puede ser N-acetilgalactosamina (GalNAc).

Un ligando a usar en la presente invención puede, por lo tanto, comprender (i) uno o más restos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) y derivados de estos y (ii) un enlazador, en donde el enlazador conjuga los restos de GalNAc con una secuencia según se define en cualquiera de los aspectos que preceden. El enlazador puede ser una estructura ramificada bivalente o trivalente o tetravalente. Los nucleótidos se pueden modificar según se define en la presente.

«GalNAc» se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa, comúnmente denominada en la bibliografía como N-acetilgalactosamina. La referencia a «GalNAc» o «N-acetilgalactosamina» incluye tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa. Tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa se pueden usar de manera intercambiable. Preferentemente, los compuestos de la invención comprenden la forma β, 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa.

El ligando entonces puede comprender GalNAc.

El ligando puede comprender un compuesto de la fórmula (I):

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

en donde:

S representa un sacárido, en donde el sacárido es N-acetilgalactosamina;

X^1 representa alquileno C_3-C_6 o $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3;

P es un fosfato o un fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato);

X^2 es alquileno o un éter de alquileno de la fórmula $(-CH_2)_n-O-CH_2-$ en donde n = 1- 6;

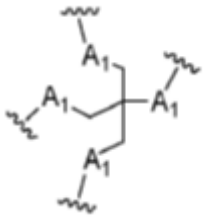
A es una unidad de ramificación;

X^3 representa una unidad de puenteo;

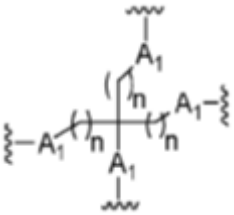
en donde un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se conjuga con X^3 mediante un fosfato o un fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato).

En la fórmula (I), la unidad de ramificación «A» se ramifica en tres para albergar los tres ligandos sacáridos. La unidad de ramificación se une de manera covalente a las partes conectadas restantes del ligando y el ácido nucleico. La unidad de ramificación puede comprender un grupo alifático ramificado que comprende grupos seleccionados de grupos alquilo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter e hidroxiamino. La unidad de ramificación puede comprender grupos seleccionados de grupos alquilo y éter.

La unidad de ramificación A puede tener una estructura que se selecciona de:



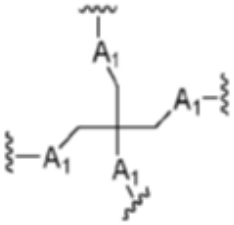
y



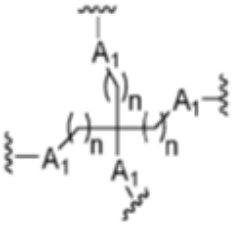
en donde cada A_1 representa independientemente O, S, C=O o NH; y

cada n representa independientemente un número entero entre 1 y 20.

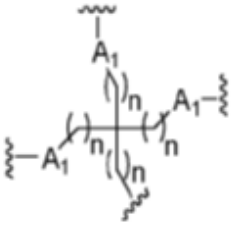
La unidad de ramificación puede tener una estructura que se selecciona de:



;



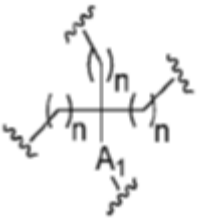
y



en donde cada A_1 representa independientemente O, S, C=O o NH; y

cada n representa independientemente un número entero entre 1 y 20.

La unidad de ramificación puede tener una estructura que se selecciona de:

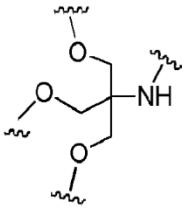


y

en donde A_1 es O, S, C=O o NH; y

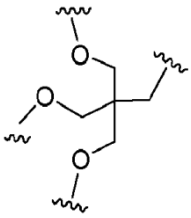
cada n representa independientemente un número entero entre 1 y 20.

La unidad de ramificación puede tener la estructura:



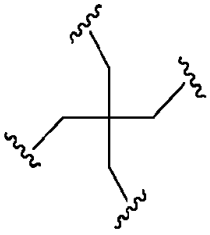
.

La unidad de ramificación puede tener la estructura:



.

La unidad de ramificación puede tener la estructura:



.

De manera opcional, la unidad de ramificación consiste en solo un átomo de carbono.

La parte «X^3» es una unidad de puenteo. La unidad de puenteo es lineal y está unida de manera covalente a la unidad de ramificación y el ácido nucleico.

X^3 se puede seleccionar de -alquileno C_1-C_{20}-, -alquenileno C_2-C_{20}-, un éter de alquileno de la fórmula -(alquileno C_1-C_{20})–O–(alquileno C_1-C_{20})-, -C(O)-alquileno C_1-C_{20}-, -alquileno C_0-C_4(Cy)alquileno C_0-C_4-, en donde Cy representa un anillo de cicloalquileno, arileno, heterocicleno o heteroarileno de 5 o 6 miembros sustituido o no sustituido, -alquileno C_1-C_4-NHC(O)-alquileno C_1-C_4-, -alquileno C_1-C_4-C(O)NH-alquileno C_1-C_4-, -alquileno C_1-C_4-SC(O)-alquileno C_1-C_4-, -alquileno C_1-C_4-C(O)S-alquileno C_1-C_4-, -alquileno C_1-C_4-OC(O)-alquileno C_1-C_4-, -alquileno C_1-C_4-C(O)O-alquileno C_1-C_4- y -alquileno C_1-C_6-S-S-alquileno C_1-C_6-.

X^3 puede ser un éter de alquileno de la fórmula -(alquileno C_1-C_{20})–O–(alquileno C_1-C_{20})-. X^3 puede ser un éter de alquileno de la fórmula -(alquileno C_1-C_{20})–O–(alquileno C_4-C_{20})-, en donde dicho (alquileno C_4-C_{20}) está enlazado a Z. X^3 se puede seleccionar del 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 enlazado a A.

El ligando puede comprender un compuesto de la fórmula (II):

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

en donde:

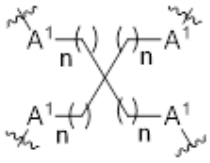
S representa un sacárido;

X^1 representa alquileno C_3-C_6 o $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2$- en donde m es 1, 2 o 3;

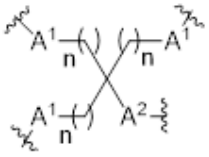
P es un fosfato o un fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato);

X^2 es alquileno C_1-C_8;

A es una unidad de ramificación que se selecciona de:



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

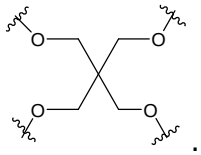


A^1 = O, NH A^2 = NH, CH_2, O
n = 1 a 4

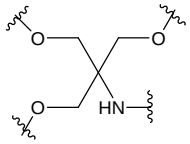
X^3 es una unidad de puenteo;

en donde un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se conjuga con X^3 mediante un fosfato o un fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato).

La unidad de ramificación A puede tener la estructura:


.

La unidad de ramificación A puede tener la estructura:


, en donde X^3 está unido al átomo de nitrógeno.

X^3 puede ser alquileno C_1-C_{20}. Preferentemente, X^3 se selecciona del 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}-.

El ligando puede comprender un compuesto de la fórmula (III):

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

en donde:

S representa un sacárido;

X^1 representa alquileno C_3-C_6 o $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2$- en donde m es 1, 2 o 3;

P es un fosfato o un fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato);

X^2 es un éter de alquileno de la fórmula -C_3H_6-O-CH_2-;

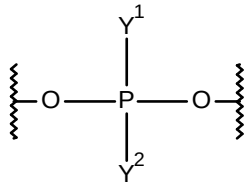
A es una unidad de ramificación;

X^3 es un éter de alquileno de la fórmula que se selecciona del 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 enlazado a A, y en donde X^3 se conjuga con un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención mediante un fosfato o un fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato).

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

X^3 se puede seleccionar del 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 del grupo que consiste en -CH_2-O-C_4H_8-, -CH_2-O-C_6H_{12}- y -CH_2-O-C_8H_{16}.

Para cualquiera de los aspectos que preceden, cuando P representa un grupo fosfato modificado, P puede ser representado por:



en donde cada uno de Y^1 y Y^2 representa 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 una unión al resto del compuesto.

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

El fosfato también se puede modificar mediante el reemplazo de un oxígeno enlazado con nitrógeno (fosforamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (metilenfosfonatos puenteados). El reemplazo se puede producir en un oxígeno del extremo. Es posible reemplazar los oxígenos no enlazados con nitrógeno.

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 técnica entenderá que en determinados casos se dará una deslocalización entre Y^1 e Y^2.

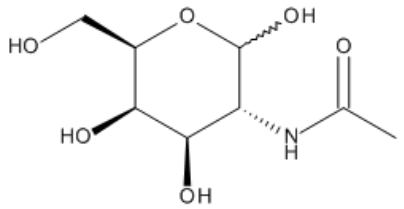
Preferentemente, el grupo fosfato modificado es un grupo tiofosfato. Los grupos tiofosfato incluyen bitiofosfato (es decir, en donde Y^1 representa =S e Y^2 representa $–S^-$) y monotiofosfato (es decir, en donde Y^1 representa $-O^-$ e Y^2 representa =S o en donde Y^1 representa=O e Y^2 representa$–S^-$). Preferentemente, P es un monotiofosfato. Los inventores descubrieron que los conjugados que tienen grupos tiofosfato en vez de grupos fosfato tienen una mejor potencia y duración de acción *in vivo*.

P también puede ser un etilfosfato (es decir, en donde Y^1 representa =O y Y^2 representa OCH_2CH_3).

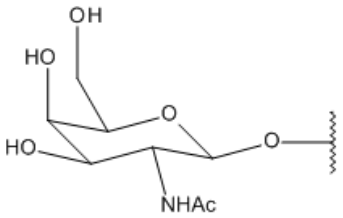
El sacárido se puede seleccionar para que tenga una afinidad para al menos un tipo de receptor en una célula diana. En particular, el receptor se encuentra en la superficie de una célula hepática de un mamífero, por ejemplo, el complejo del receptor hepático de la asialoglicoproteína (ASGP-R).

Para cualquiera de los aspectos que preceden, el sacárido se puede seleccionar de N-acetilo con uno o más de galactosamina, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina y fructosa. Típicamente, un ligando a usar en la presente invención puede incluir N-acetilgalactosamina (GalNAc). Preferentemente, los compuestos de la invención pueden tener 3 ligandos, cada uno de los cuales incluirá preferentemente N-acetilgalactosamina.

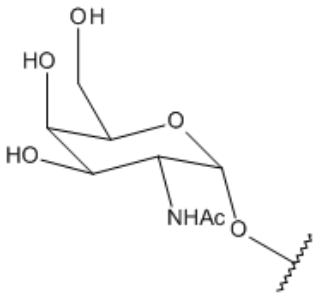
«GalNAc» se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa, comúnmente denominada en la bibliografía como N-acetilgalactosamina. La referencia a «GalNAc» o «N-acetilgalactosamina» incluye tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa. En determinadas modalidades, tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa se pueden usar de manera intercambiable. 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

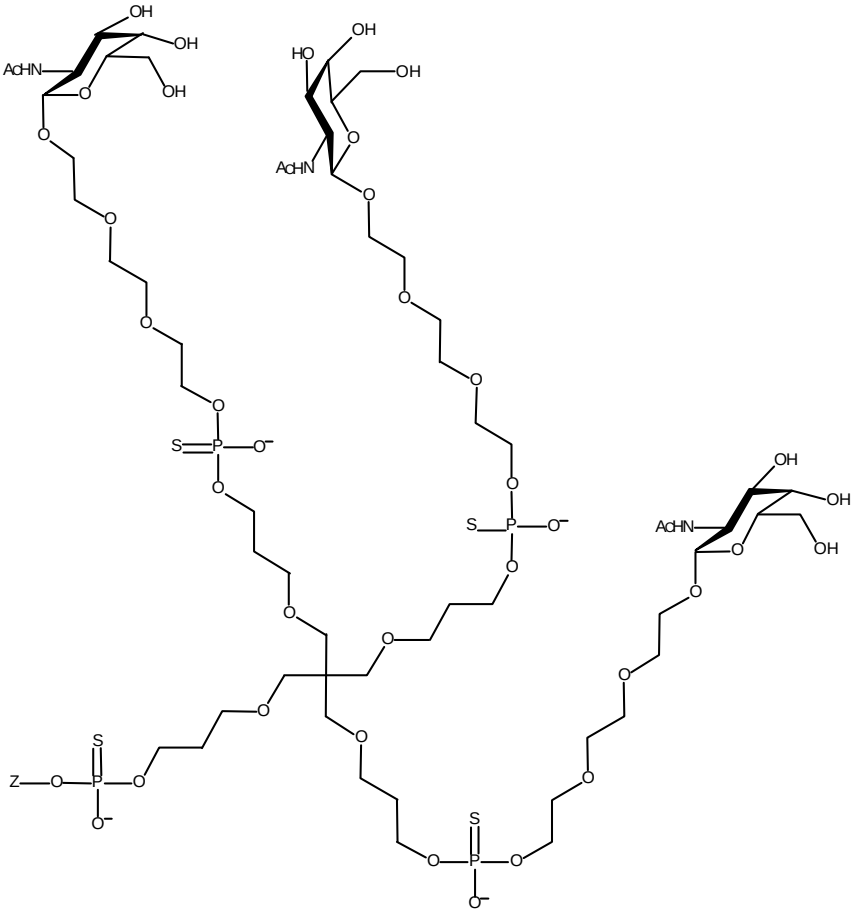


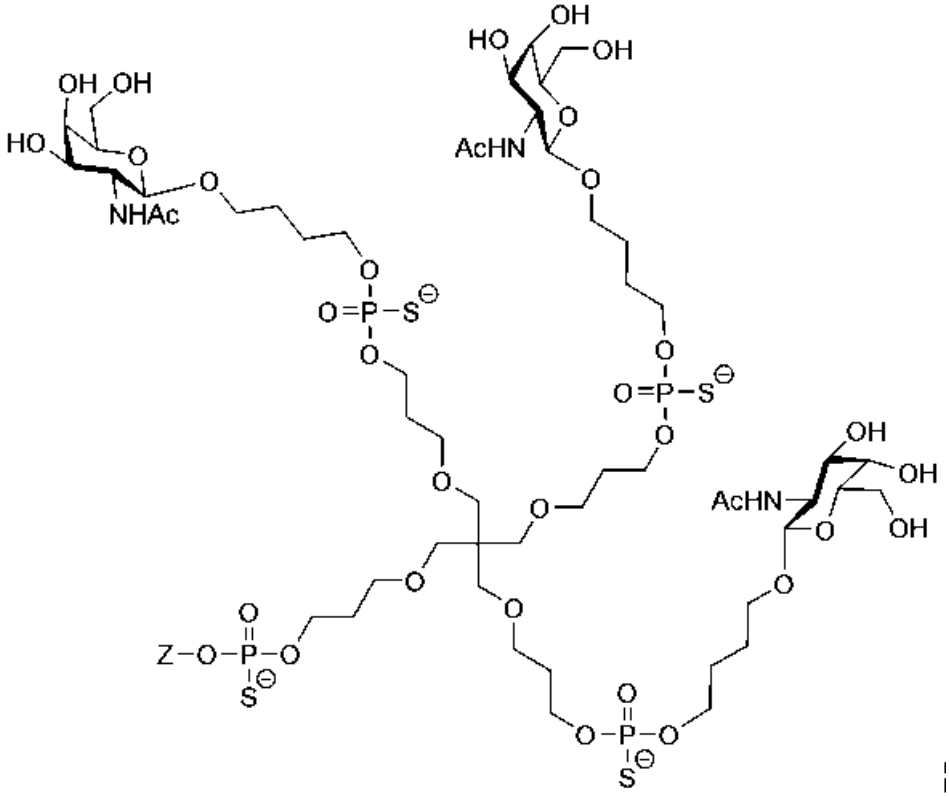
2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa

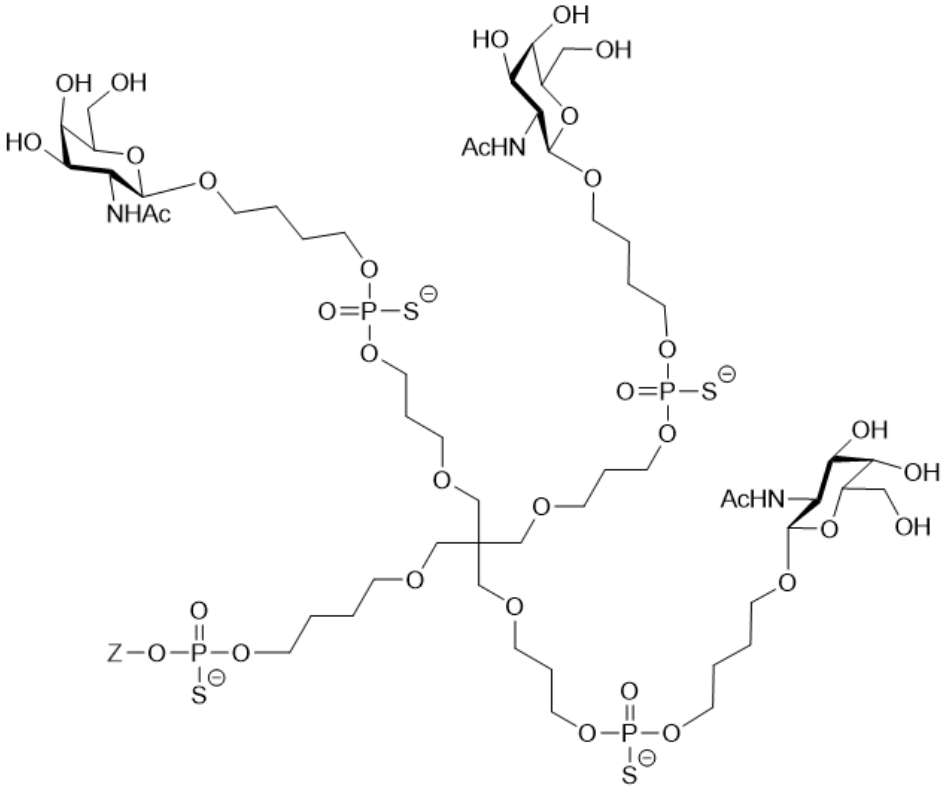
Para cualquiera de los compuestos de la fórmula (III) que preceden, X^1 puede ser $(-CH_2-CH_2-O)(-CH_2)_2-$. X^1 puede ser $(-CH_2-CH_2-O)_2(-CH_2)_2-$. X^1 puede ser $(-CH_2-CH_2-O)_3(-CH_2)_2-$. Preferentemente, X^1 es $(-CH_2-CH_2-O)_2(-CH_2)_2-$. De manera alternativa, X^1 representa alquileno C_3-C_6. 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.

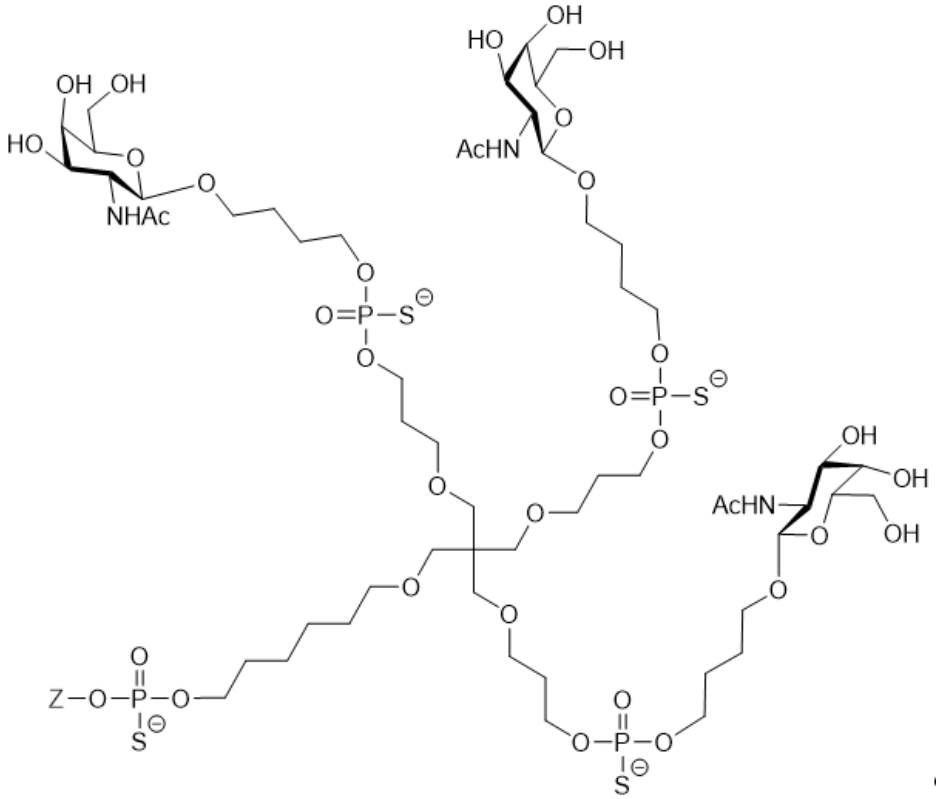
Para los compuestos de la fórmula (III), X^2 representa un éter de alquileno de la fórmula $-C_3H_6-O-CH_2-$, es decir alcoxi C_3 metileno, o $–CH_2CH_2CH_2OCH_2-$.

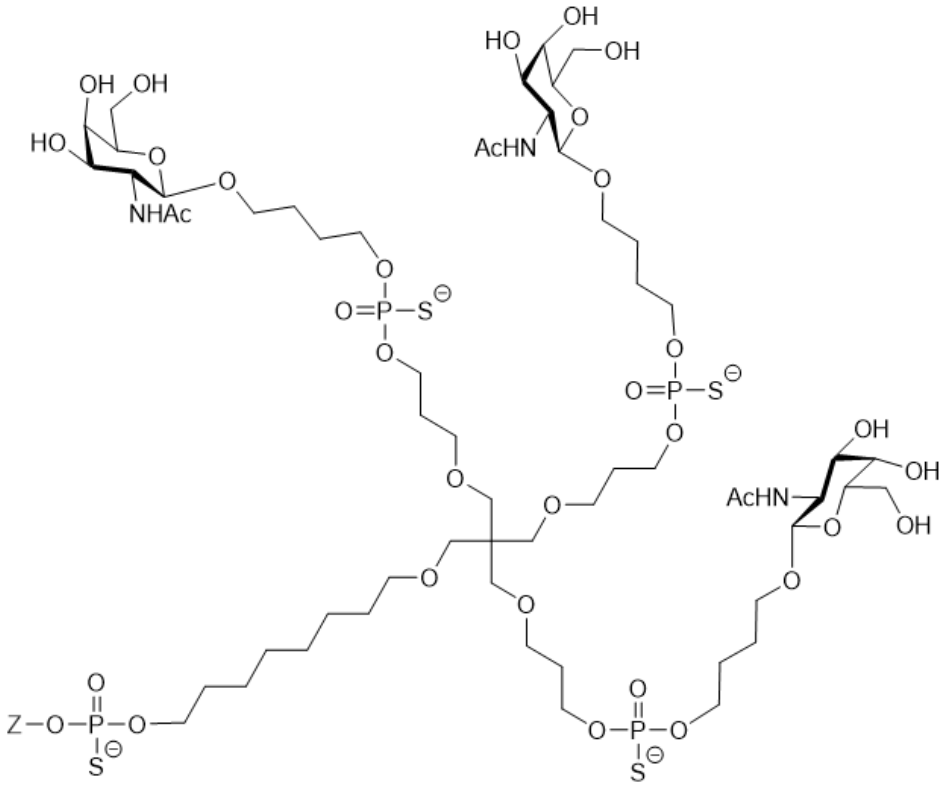
La invención proporciona un ácido nucleico conjugado que tiene una de las siguientes estructuras:

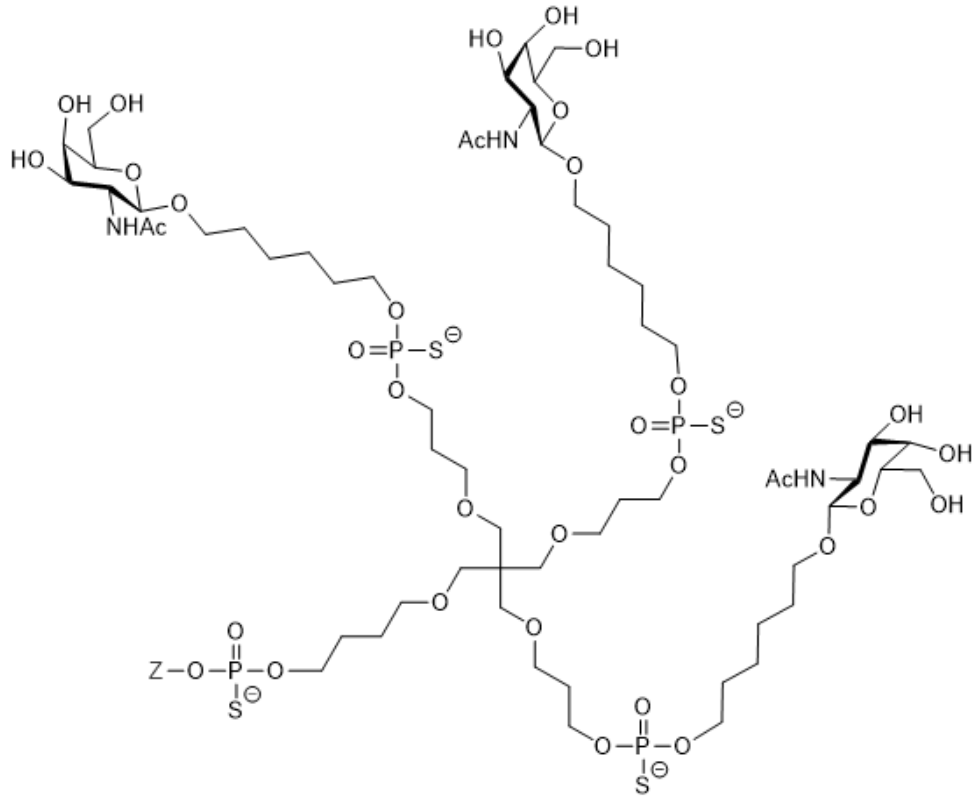

OH
OH
AcHN
O
OH
O
O
O
O
S
P
O⁻
O
OH
HO
OH
O
AcHN
O
O
O
O
S
P
O⁻
O
OH
OH
AcHN
O
OH
O
O
O
O
O
O
S
Z
O
P
O
O⁻
O
S
O
P
O
O⁻

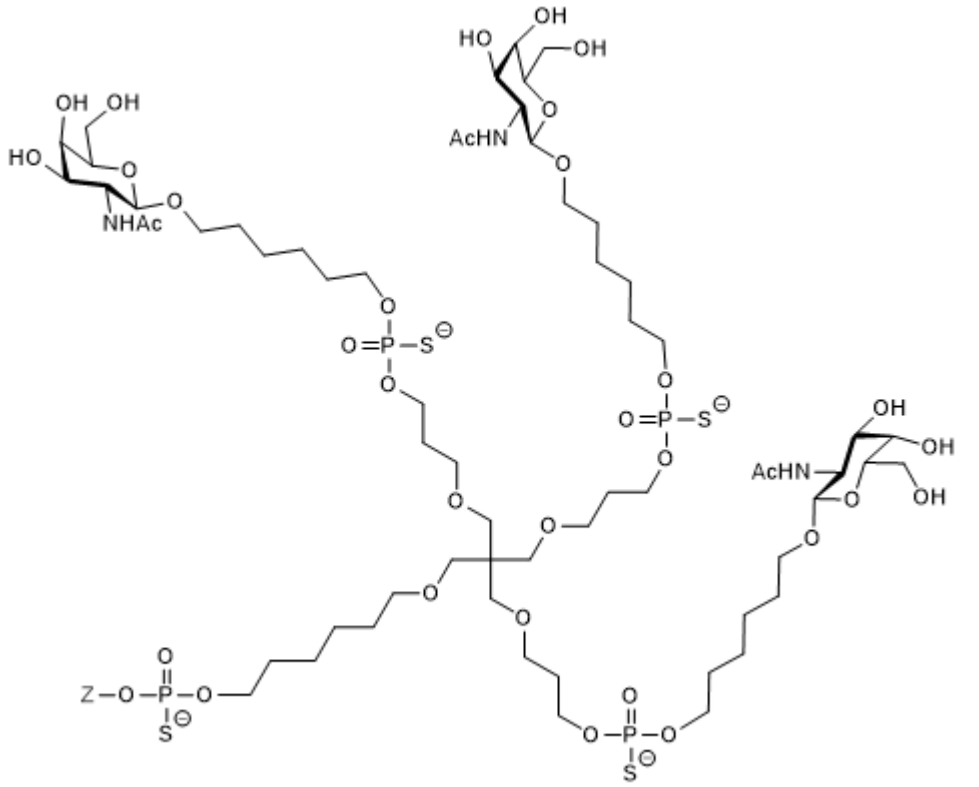


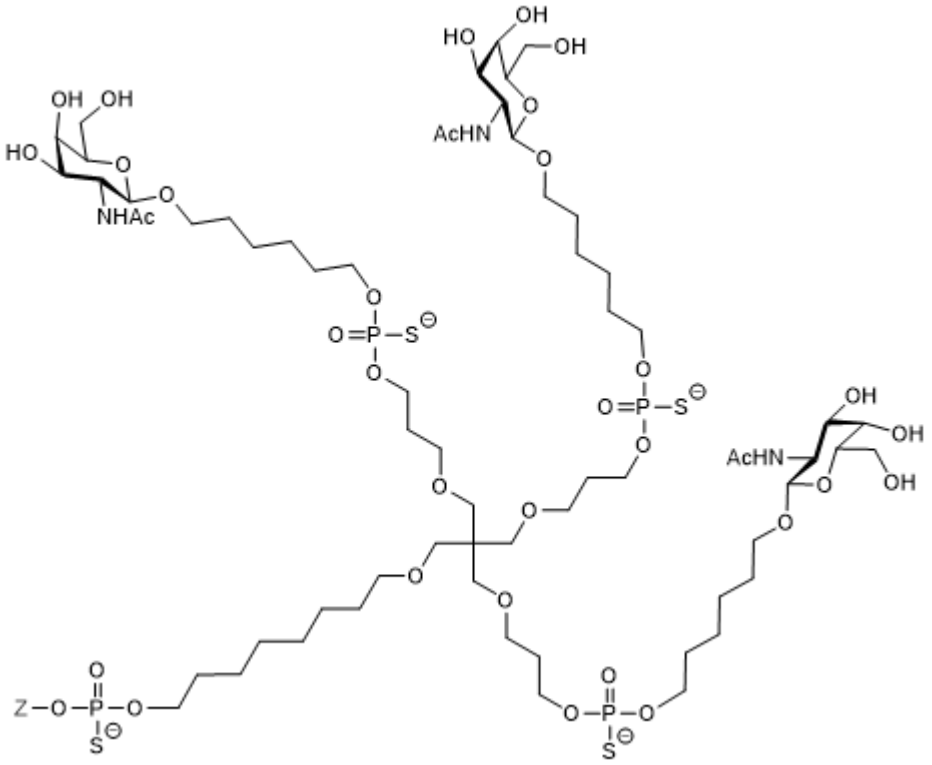






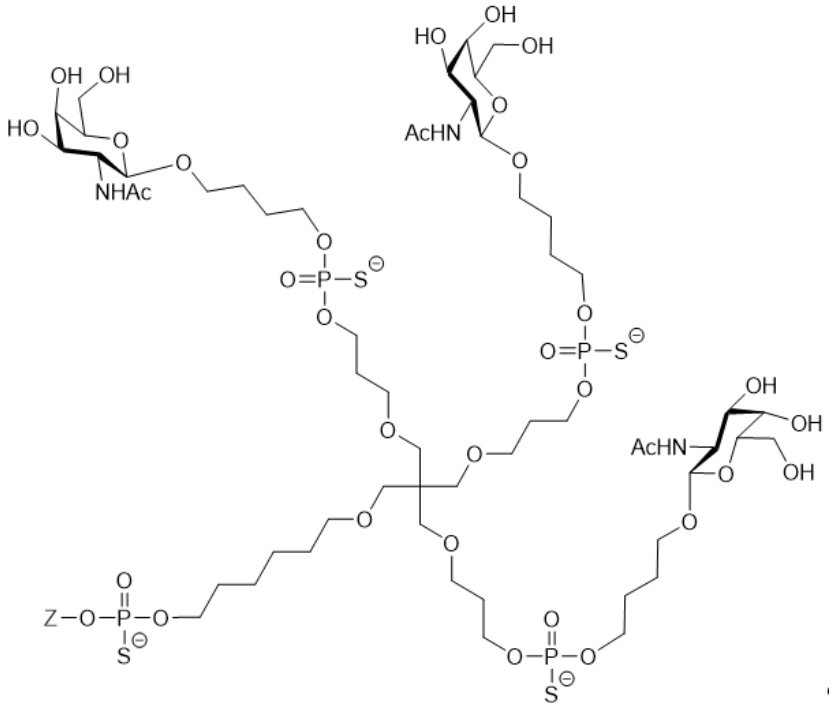






en donde Z es un ácido nucleico según se definió anteriormente en la presente y se conjuga preferentemente al extremo 5’ de la segunda cadena del ácido nucleico.

Preferentemente, el ácido nucleico conjugado tiene la siguiente estructura:



en donde Z es un ácido nucleico según se definió anteriormente en la presente y se conjuga preferentemente al extremo 5’ de la segunda cadena.

Un ligando de la fórmula (I), (II) o (III) se puede unir en el extremo 3’ de la primera cadena (antisentido) y/o en cualquiera del extremo 3’ y/o el extremo 5’ de la segunda cadena (de sentido). El ácido nucleico puede comprender más de un ligando de la fórmula (I), (II) o (III). Sin embargo, se prefiere un solo ligando de la fórmula (I), (II) o (III) dado que un solo ligando es suficiente para dirigir de manera eficaz el ácido nucleico a las células diana. Preferentemente en ese caso, al menos los últimos dos, preferentemente al menos los últimos tres y más preferentemente al menos los últimos cuatro nucleótidos en el extremo del ácido nucleico al cual se une el ligando se enlazan mediante un enlace fosfodiéster.

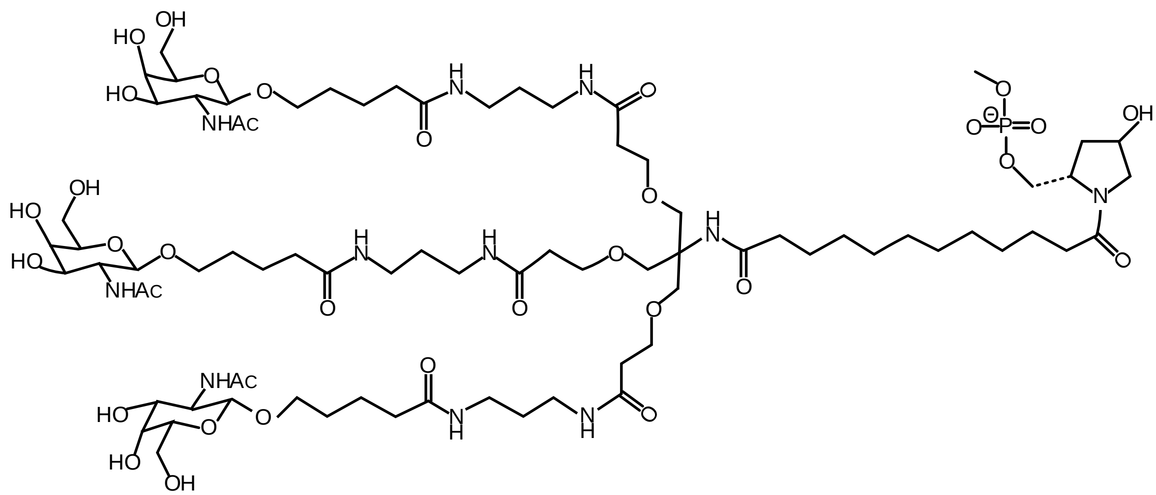
Preferentemente, el extremo 5’ de la primera cadena (antisentido) no está unida a un ligando de la fórmula (I), (II) o (III), ya que un ligando en esta posición puede interferir potencialmente con la actividad biológica del ácido nucleico.

Un ácido nucleico con un solo ligando de la fórmula (I), (II) o (III) en el extremo 5’ de una cadena es más fácil y, por lo tanto, más barato, de sintetizar que el mismo ácido nucleico con el mismo ligando en el extremo 3’. Por lo tanto, preferentemente, se une de manera covalente

(se conjuga) un solo ligando de cualquiera de las fórmulas (I), (II) o (III) con el extremo 5’ de la segunda cadena del ácido nucleico.

En una modalidad, el ácido nucleico se conjuga con un ligando que comprende un lípido y, más preferentemente, un ligando que comprende un colesterol.

De manera alternativa, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se puede conjugar con un ligando de la siguiente estructura



Un conjugado de la invención puede comprender cualquier ácido nucleico según se describe en la presente conjugado con cualquier ligando o ligandos tal como se describe en la presente.

La presente invención también se refiere a un conjugado para inhibir la expresión de un gen *LPA* en una célula, dicho conjugado comprende una parte de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de cualquier aspecto de la invención y al menos una parte de ligando, dicha parte de ácido nucleico comprende al menos una región de dúplex que comprende al menos una parte de una primera cadena de ARN y al menos una parte de una segunda cadena de ARN que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte del ARN transcrito a partir de dicho gen *LPA*, dicha al menos una parte de ligando comprende un resto enlazador, preferentemente un resto enlazador derivado del serinol, y un ligando de direccionamiento para el direccionamiento *in vivo* a células y que se conjuga de manera exclusiva con los extremos 3’ y/o 5’ de una o ambas cadenas de ARN, en donde el extremo 5’ de la primera cadena de ARN no se conjuga, en donde:

(i) la segunda cadena de ARN se conjuga en el extremo 5’ con el ligando de direccionamiento y en donde (a) la segunda cadena de ARN también se conjuga en el extremo 3’ con el ligando de direccionamiento y el extremo 3’ de la primera cadena de ARN no se conjuga; o (b) la primera cadena de ARN se conjuga en el extremo 3’ con el ligando de direccionamiento y el extremo 3’ de la segunda cadena de ARN no se conjuga; o (c) tanto la segunda cadena de ARN como la primera cadena de ARN también se conjugan en los extremos 3’ con el ligando de direccionamiento; o

(ii) tanto la segunda cadena de ARN como la primera cadena de ARN se conjugan en los extremos 3’ con el ligando de direccionamiento y el extremo 5’ de la segunda cadena de ARN no se conjuga.

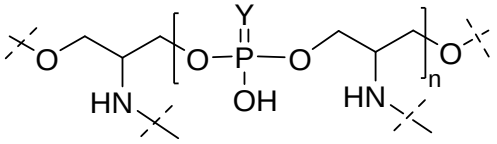
Los ligandos pueden ser monoméricos o multiméricos (p. ej., diméricos, triméricos, etc.).

De manera adecuada, los ligandos son monoméricos y por lo tanto contienen un único resto de ligando de direccionamiento, p. ej., un único resto GalNAc.

De manera alternativa, los ligandos pueden ser ligandos diméricos, en donde las partes de ligando comprenden dos restos enlazadores, tal como restos enlazadores derivados de serinol o restos enlazadores no serinol, cada uno enlazado a un único resto de ligando de direccionamiento.

Los ligandos pueden ser ligandos triméricos, en donde las partes de ligando comprenden tres restos enlazadores, tal como restos enlazadores derivados de serinol o restos enlazadores no serinol, cada uno enlazado a un único resto de ligando de direccionamiento.

Los dos o tres restos enlazadores derivados de serinol se pueden enlazar en serie, p. ej., como se muestra a continuación:



en donde n es 1 o 2 e Y es S u O.

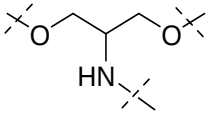
Preferentemente, los ligandos son monoméricos.

De manera adecuada, las cadenas de ARN conjugadas se conjugan con un ligando de direccionamiento mediante un resto enlazador que incluye un enlazador adicional en donde el enlazador adicional es o comprende una cadena de alquilo C_{1-15} saturada, ramificada o no

ramificada, en donde, opcionalmente, uno o más carbonos (por ejemplo, 1, 2 o 3 carbonos, de manera adecuada, 1 o 2, en particular 1) son reemplazados por un heteroátomo que se selecciona de O, N, $S(O)_p$, en donde p es 0, 1 o 2 (por ejemplo, un grupo CH_2 se reemplaza con O o con NH o con S o con SO_2 o un grupo $–CH_3$ en el extremo de la cadena o en una rama se reemplaza con OH o con NH_2) en donde dicha cadena se sustituye opcionalmente con uno o más grupos oxo (por ejemplo, de 1 a 3, tal como 1 grupo).

De manera adecuada, el resto enlazador es un resto enlazador derivado de serinol.

La expresión «resto enlazador derivado de serinol» significa que el resto enlazador comprende la siguiente estructura:



Un átomo O de dicha estructura típicamente se enlaza a una cadena de ARN y el átomo N típicamente se enlaza al ligando de direccionamiento.

De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de alquilo C_{1-15} saturada, no ramificada en donde uno o más carbonos (por ejemplo, 1, 2 o 3 carbonos, de manera adecuada 1 o 2, en particular 1) son reemplazados por un átomo de oxígeno.

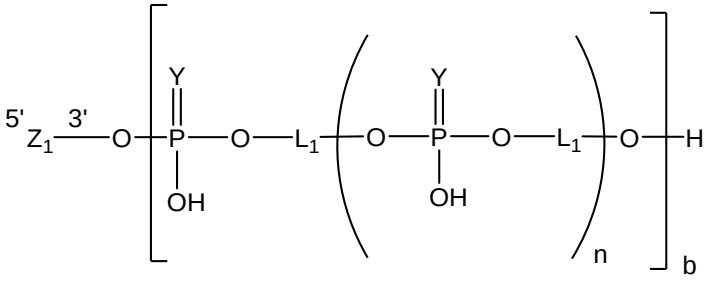
De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena PEG.

De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de alquilo C_{1-15} saturada, no ramificada.

De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de alquilo C_{1-6} saturada, no ramificada.

De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de alquilo C_4 o C_6 saturada, no ramificada, p. ej., una cadena de alquilo C_4.

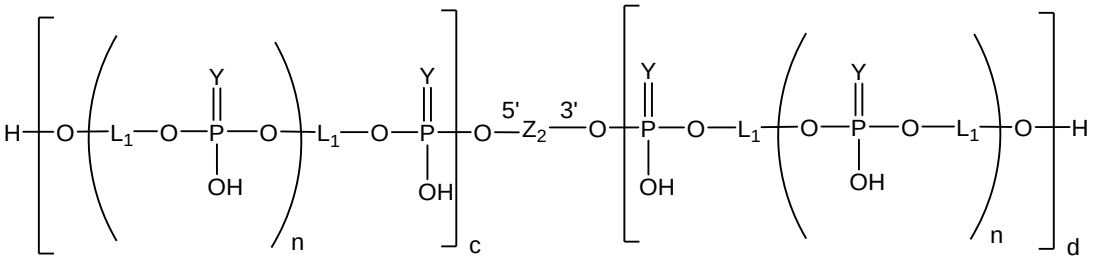
En una modalidad de la invención, la primera cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (X):



(X)

en donde b es 0 o 1; y

la segunda cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (XI):



(XI);

en donde:

c y d son independientemente 0 o 1;

Z_1 y Z_2 son las partes de ARN de la primera y segunda cadenas de ARN, respectivamente;

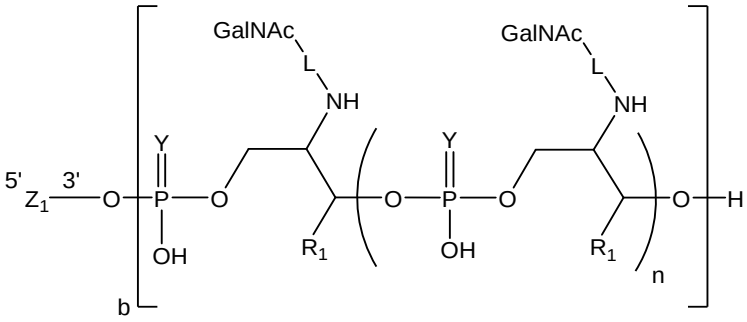
Y es O o S;

n es 0, 1, 2 o 3; y

L_1 es un enlazador al cual está unido un ligando;

y en donde b + c + d es 2 o 3.

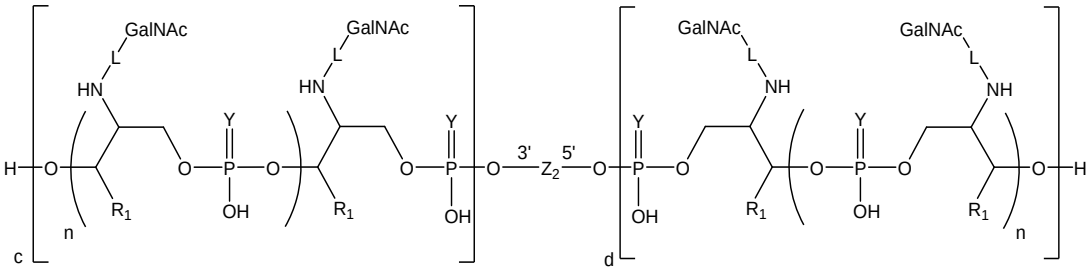
De manera adecuada, la primera cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (XV)



(XV)

en donde b es 0 o 1; y

la segunda cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (XVI):



(XVI);

en donde c y d son independientemente 0 o 1;

en donde:

Z_1 y Z_2 son las partes de ARN de la primera y segunda cadenas de ARN, respectivamente;

Y es O o S;

R_1 es H o metilo;

n es 0, 1, 2 o 3; y

L es igual o diferente en las fórmulas (XV) y (XVI) y se selecciona del grupo que consiste en:

$-(CH_2)_r-C(O)-$, en donde r = 2-12;

$-(CH_2-CH_2-O)_s-CH_2-C(O)-$, en donde s = 1-5;

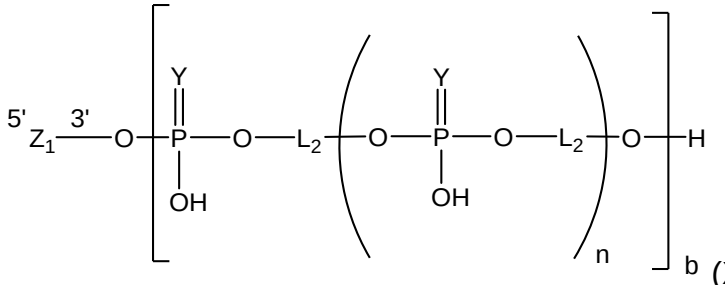
$-(CH_2)_t-CO-NH-(CH_2)_t-NH-C(O)-$, en donde t es independientemente 1-5;

$-(CH_2)_u-CO-NH-(CH_2)_u-C(O)-$, en donde u es independientemente 1-5; y

$-(CH_2)_v-NH-C(O)-$, en donde v es 2-12; y

en donde el C(O) del extremo (si se encuentra presente) está unido al grupo NH; y en donde b + c + d es 2 o 3.

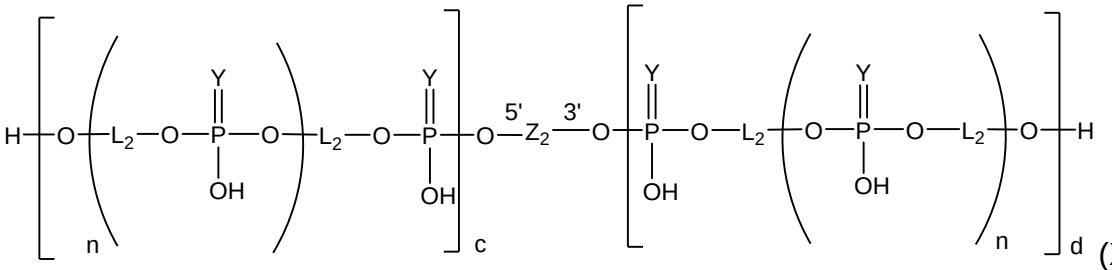
De manera adecuada, la primera cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (XII):



(XII)

en donde b es 0 o 1; y

la segunda cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (XIII):



(XIII);

en donde:

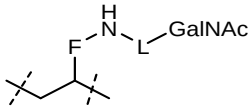
c y d son independientemente 0 o 1;

Z_1 y Z_2 son las partes de ARN de la primera y segunda cadenas de ARN, respectivamente;

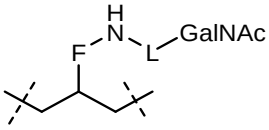
Y es O o S;

n es 0, 1, 2 o 3; y

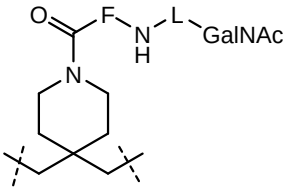
L_2 es igual o diferente en las fórmulas (XII) y (XIII), y es igual o diferente en lo restos agrupados por b, c y d, y se selecciona del grupo que consiste en:



;

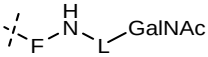


y

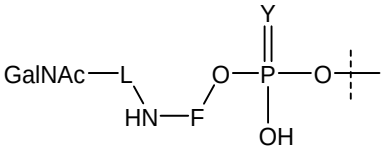


; o

n es 0 y L_2 es:



y el grupo OH del extremo está ausente de tal forma que se forma el siguiente resto:



;

en donde

F es una cadena de alquilo C_{1-8} (p. ej., alquilo C_{1-6}) saturado ramificado o no ramificado (tal como no ramificado) en donde uno de los átomos de carbono se reemplaza opcionalmente con un átomo de oxígeno siempre que dicho átomo de oxígeno esté separado de otro heteroátomo (p. ej., un átomo de O o N) por al menos 2 átomos de carbono;

L es igual o diferente en las fórmulas (XII) y (XIII) y se selecciona del grupo que consiste en:

$-(CH_2)_r-C(O)-$, en donde r = 2-12;

$-(CH_2-CH_2-O)_s-CH_2-C(O)-$, en donde s = 1-5;

$-(CH_2)_t-CO-NH-(CH_2)_t-NH-C(O)-$, en donde t es independientemente 1-5;

$-(CH_2)_u-CO-NH-(CH_2)_u-C(O)-$, en donde u es independientemente 1-5; y

$-(CH_2)_v-NH-C(O)-$, en donde v es 2-12; y

en donde el C(O) del extremo (si se encuentra presente) está unido al grupo NH;

y en donde b + c + d es 2 o 3.

En cualquiera de las fórmulas que preceden donde GalNAc se encuentra presente, la GalNAc se puede sustituir con cualquier otro ligando de direccionamiento, tal como los mencionados en la presente.

De manera adecuada, b es 0, c es 1 y d es 1; b es 1, c es 0 y d es 1; b es 1, c es 1 y d es 0; o b es 1, c es 1 y d es 1.

De manera más adecuada, b es 0, c es 1 y d es 1; b es 1, c es 0 y d es 1; o b es 1, c es 1 y d es 1.

De manera todavía más adecuada, b es 0, c es 1 y d es 1.

En una modalidad, Y es O. En otra modalidad, Y es S.

En una modalidad, R_1 es H o metilo. En una modalidad, R_1 es H. En otra modalidad, R_1 es metilo.

En una modalidad, n es 0, 1, 2 o 3. De manera adecuada, n es 0.

En una modalidad, L se selecciona del grupo que consiste en:

$-(CH_2)_r-C(O)-$, en donde r = 2-12;

$-(CH_2-CH_2-O)_s-CH_2-C(O)-$, en donde s = 1-5;

$-(CH_2)_t-CO-NH-(CH_2)_t-NH-C(O)-$, en donde t es independientemente 1-5;

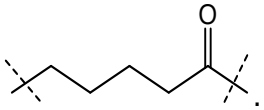
$-(CH_2)_u-CO-NH-(CH_2)_u-C(O)-$, en donde u es independientemente 1-5; y

$-(CH_2)_v-NH-C(O)-$, en donde v es 2-12;

en donde el C(O) del extremo está unido al grupo NH.

De manera adecuada, L es $-(CH_2)_r-C(O)-$, en donde r = 2-12. De manera adecuada, r = 2-6. De manera más adecuada, r = 4 o 6, p. ej., 4.

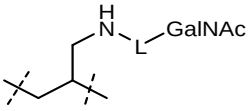
De manera adecuada, L es:



.

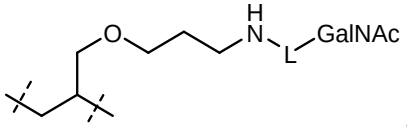
Los restos de F de ejemplo incluyen $(CH_2)_{1-6}$, p. ej., $(CH_2)_{1-4}$, p. ej., CH_2, $(CH_2)_4$, $(CH_2)_5$ o $(CH_2)_6$, o $CH_2O(CH_2)_{2-3}$, p. ej., $CH_2O(CH_2)CH_3$.

De manera adecuada, L_2 es:



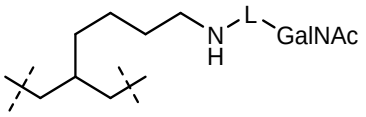
.

De manera adecuada, L_2 es:



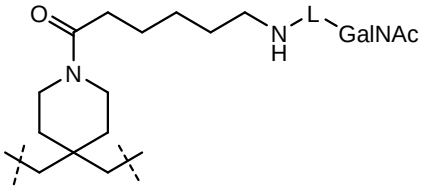
.

De manera adecuada, L_2 es:



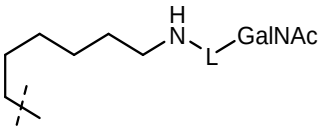
.

De manera adecuada, L_2 es:

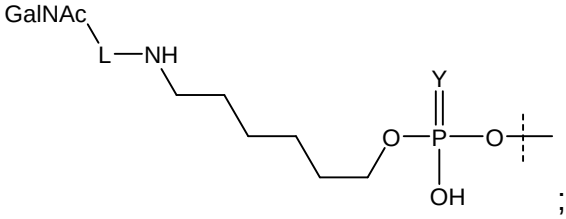


.

De manera adecuada, n es 0 y L_2 es:



y el grupo OH del extremo está ausente de tal forma que se forma el siguiente resto:



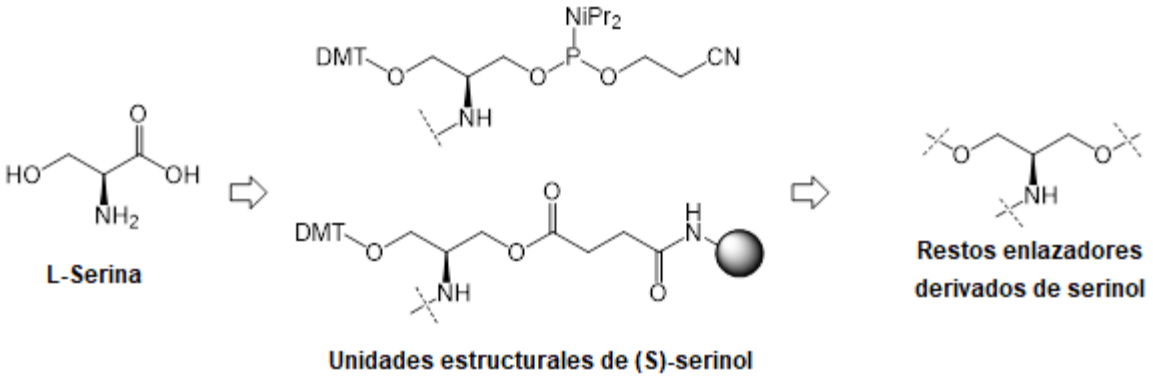
;

en donde Y es como se define en otra parte de la presente.

Dentro del resto agrupado por b, c y d, L_2 es típicamente igual. Dentro de restos agrupados por b, c y d, L_2 puede ser igual o diferente. En una modalidad, L_2 en el resto agrupado por c es igual que el L_2 en el resto agrupado por d. En una modalidad, L_2 en el resto agrupado por c no es igual que el L_2 en el resto agrupado por d. En una modalidad, el L_2 en los restos agrupados por b, c y d es igual, por ejemplo, cuando el resto enlazador es un resto enlazador derivado de serinol.

Los restos enlazadores derivados de serinol se pueden basar en serinol en cualquier estereoquímica, es decir, derivarse del isómero de L-serina, el isómero de D-serina, una

serina racémica u otra combinación de isómeros. En un aspecto preferido de la invención, el resto de serinol-GalNAc (SerGN) tiene la siguiente estereoquímica:



es decir, está basado en una unidad estructural con soporte sólido de (S)-serinol-amidita o (S)-serinol succinato derivada del isómero de L-serina.

En una modalidad, las células diana son hepatocitos.

Un aspecto es un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región de dúplex que comprende al menos una parte de una primera cadena y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de un ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, en donde el ácido nucleico se conjuga con un ligando. La segunda cadena puede comprender una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 o 44. Se pueden modificar los nucleótidos de la primera y/o la segunda cadena, como se describe en la presente.

Preferentemente, el ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 10 conjugadas con un ligando de la fórmula (I) (como se estableció anteriormente), en donde el ligando se conjuga con el ácido nucleico como se describió y en donde la primera cadena se modifica con una modificación 2'OMe en los nucleótidos impares y se modifica con un 2’F en los nucleótidos pares, y la segunda cadena se modifica con un 2’OMe en los nucleótidos pares y se modifica con un 2’F en los nucleótidos impares.

Se prefiere particularmente un ácido nucleico en donde la primera cadena comprende o preferentemente consiste en la SEQ ID NO: 165 y la segunda cadena comprende opcionalmente o consiste preferentemente en la SEQ ID NO: 163. Este ácido nucleico puede conjugarse además a un ligando. Se prefiere más un ácido nucleico en donde la primera cadena comprende o preferentemente consiste en la SEQ ID NO: 165 y la segunda cadena comprende opcionalmente o consiste preferentemente en la SEQ ID NO: 164. Se prefiere aún más un ARNip que consiste en la SEQ ID NO: 165 y la SEQ ID NO: 164. Un aspecto de la invención es el conjugado 21.

Composiciones, usos y métodos

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención. Las composiciones farmacéuticas se pueden usar como medicamentos o como agentes de diagnóstico, solas o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, se puede combinar uno o más conjugados de ácido nucleico de la invención con un vehículo de administración (p. ej., liposomas) y/o excipientes, tales como portadores, diluyentes. También se pueden agregar otros agentes tales como conservantes y estabilizadores. Los métodos para la administración de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica y son de conocimiento del experto en la técnica.

La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende uno o más ácidos nucleicos o ácidos nucleicos conjugados de acuerdo con la presente invención en un excipiente fisiológica/farmacéuticamente aceptable, tal como un estabilizador, conservante, diluyente, amortiguador y similares.

La composición farmacéutica puede ser una suspensión o solución acuosa inyectable estéril o encontrarse en una forma liofilizada o adherirse, absorberse o incluirse a o en cualquier otra sustancia portadora galénica adecuada tal como sedimentos, comprimidos, cápsulas, nanopartículas, geles, comprimidos, perlas o estructuras similares.

Un aspecto se refiere a un ácido nucleico de cadena doble que es capaz de inhibir la expresión de *LPA*, preferentemente en una célula, para uso como un medicamento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención o la composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o síndrome, preferentemente una enfermedad, trastorno o síndrome asociado con

niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). El tratamiento puede ser para prevenir y/o reducir el riesgo a sufrir y/o tratar un accidente cerebrovascular, aterosclerosis, trombosis o enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatía coronaria o estenosis de la aorta y cualquier otra enfermedad o patología asociada con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). El tratamiento puede ser para prevenir y/o reducir el riesgo a sufrir y/o tratar una enfermedad cardiovascular aterosclerótica, una enfermedad cerebrovascular aterosclerótica, hiperlipidemia y dislipidemia, preferentemente en donde la enfermedad se asocia con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). El tratamiento puede prevenir y/o reducir el riesgo de sufrir y/o tratar estenosis aórtica calcificada, accidente cerebrovascular isquémico, cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica, aneurismas de la aorta abdominal, insuficiencia cardíaca secundaria a cardiomiopatía isquémica o hipercolesterolemia familiar, preferentemente en donde la enfermedad se asocia con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). Preferible es el tratamiento para prevenir y/o reducir el riesgo de sufrir y/o tratar estenosis aórtica, tal como estenosis aórtica calcificada o hipercolesterolemia familiar, preferentemente en cada caso cuando la enfermedad o el trastorno se asocia con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). Un nivel deseable de partículas que contienen Lp(a) en suero se describe generalmente como un nivel por debajo de 14 mg/dL. A un nivel elevado de partículas que contiene Lp(a) se encuentra a un nivel de al menos 14, preferentemente al menos 20, más preferentemente al menos 30, más preferentemente al menos 40 y aún más preferentemente al menos 50 mg/dL de partículas que contienen Lp(a) en el suero de un sujeto.

La invención incluye una composición farmacéutica que comprende uno o más ácidos nucleicos o ácidos nucleicos conjugados de acuerdo con la presente invención en un excipiente fisiológica/farmacéuticamente aceptable tal como un estabilizador, conservante, diluyente, amortiguador y similares.

Las expresiones «partículas que contienen Lp(a)» y «partículas Lp(a)» se usan de manera intercambiable a lo largo de la presente descripción.

Las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención se pueden administrar a un sujeto mamífero en una cantidad farmacéuticamente eficaz. El mamífero se puede seleccionar de un ser humano, un primate no humano, un simio o prosimio, un perro, un gato, un caballo, ganado, un cerdo, una cabra, una oveja, un ratón, una rata, un hámster,

un erizo y un conejillo de indias u otras especies relevantes. Sobre esta base, la expresión «LPA» o «*LPA*» como se usa en la presente indica ácido nucleico o proteína en cualquiera de las especies mencionadas anteriormente, si se expresa en él de forma natural o artificial, pero preferentemente esta expresión indica ácidos nucleicos o proteínas humanas.

El ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la presente invención también se puede administrar en combinación con otros compuestos terapéuticos, ya sea administrado de manera separada o simultánea, p. ej., como una dosis unitaria combinada. El agente terapéutico adicional se puede seleccionar de un grupo que comprende un oligonucleótido, una molécula pequeña, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal y un péptido. También es posible una conjugación molecular a otras entidades moleculares biológicamente activas tales como péptidos, ligandos celulares o artificiales o moléculas grandes o pequeñas.

Los niveles de dosificación para el medicamento y las composiciones farmacéuticas de la invención las pueden determinar los expertos en la técnica mediante experimentación de rutina. En una modalidad, una dosis unitaria puede contener entre alrededor de 0,01 mg/kg y alrededor 100 mg/kg de peso corporal de ácido nucleico o ácido nucleico conjugado. De manera alternativa, la dosis puede ser de 10 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal, o 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, o 0,05 mg/kg a 5 mg/kg de peso corporal, o 0,1 mg/kg a 5 mg/kg de peso corporal, o 0,1 mg/kg a 1 mg/kg de peso corporal, o 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg de peso corporal, o 0,5 mg/kg a 1 mg/kg de peso corporal. De manera alternativa, la dosis puede ser de alrededor de 0,5 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, o de alrededor de 0,6 mg/kg a alrededor de 8 mg/kg de peso corporal, o de alrededor de 0,7 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg de peso corporal, o de alrededor de 0,8 mg/kg a alrededor de 4 mg/kg de peso corporal, o de alrededor de 0,9 mg/kg a alrededor de 3,5 mg/kg de peso corporal, o de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 3 mg/kg de peso corporal, o de alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, o de alrededor de 3 mg/kg de peso corporal, en donde «alrededor de» es una desviación de hasta 30 %, preferentemente hasta 20 %, más preferentemente hasta 10 %, aún más preferentemente hasta 5 % y todavía más preferentemente 0 % del valor indicado. Los niveles de dosificación también se pueden calcular mediante otros parámetros tales como, p. ej., área de superficie corporal.

El ácido nucleico descrito en la presente puede ser capaz de inhibir la expresión de *LPA*. El ácido nucleico descrito en la presente puede ser capaz de inhibir parcialmente la expresión de

LPA. La inhibición puede ser total, es decir, 0 % en comparación con el nivel de expresión de *LPA* en ausencia del ácido nucleico de la invención. La inhibición de la expresión de *LPA* puede ser parcial, es decir, puede ser 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o valores intermedios de expresión de *LPA* en ausencia de un ácido nucleico de la invención. La inhibición puede durar 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, 13 semanas, 14 semanas o hasta 3 meses, cuando se usa en un sujeto, tal como un paciente humano. Un ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención, o composiciones que lo incluyan, pueden ser para su uso en un régimen que comprende tratamientos una o dos veces a la semana, todas las semanas, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas, cada siete semanas o cada ocho semanas o en regímenes con frecuencia de dosis variable tal como combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente. El ácido nucleico puede ser para uso subcutáneo, intravenoso o utilizando cualquier otra vía de aplicación tal como oral, rectal o intraperitoneal, preferentemente para uso subcutáneo.

En células y/o sujetos tratados con o que reciben el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la presente invención, la expresión de *LPA* se puede inhibir en comparación con células y/o sujetos no tratados en un intervalo de 15 % hasta 100 %, pero al menos alrededor de 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % o valores intermedios. El nivel de inhibición puede permitir el tratamiento de una enfermedad asociada con expresión o sobreexpresión de *LPA*, o puede servir para investigar adicionalmente las funciones y roles fisiológicos del producto génico de *LPA*.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención en la elaboración de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o síndromes, tal como aquellos enumerados anteriormente o patologías adicionales asociadas con niveles elevados de Lp(a) o enfoques terapéuticos adicionales donde se desea la inhibición de expresión de *LPA.*

La invención también incluye un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o síndrome, tal como los enumerados anteriormente, que comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico o ácido nucleico conjugado tal como se describe en la presente a un individuo que necesite tratamiento (para mejorar tales

patologías). La composición de ácido nucleico se puede administrar en un régimen que comprende tratamientos dos veces a la semana, una vez a la semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas, cada siete semanas o cada ocho semanas o en intervalos de administración de más de una vez cada de ocho semanas en regímenes con frecuencia de dosis variable tal como combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente. El ácido nucleico o ácido nucleico conjugado puede ser para uso subcutáneo o intravenoso u otras vías de aplicación tal como oral, rectal o intraperitoneal. Preferentemente, el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado se inyecta por vía subcutánea.

El ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la presente invención se puede producir usando métodos de rutina en la técnica lo que incluye síntesis química o expresión de ácido nucleico ya sea *in vitro* (p. ej., transcripción corrida) o *in vivo*. Por ejemplo, usando síntesis química de fase sólida o usando un vector de expresión basado en ácido nucleico lo que incluye derivados virales o sistemas de expresión sintéticos de forma completa o parcial. En una modalidad, el vector de expresión se puede usar para producir el ácido nucleico de la invención *in vitro*, dentro de un organismo hospedador intermedio o tipo celular, dentro de un organismo intermedio o final o dentro de la célula diana deseada. Los métodos para la producción (transcripción enzimática o síntesis) del ácido nucleico descrito en la presente son conocidos por los expertos en la técnica.

Todas las características de los ácidos nucleicos se pueden combinar con todos los otros aspectos de la invención descritos en la presente.

La presente invención también se refiere a las secuencias no modificadas de todas las secuencias modificadas descritas en la presente.

La invención se describirá a continuación con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos no taxativos.

Figuras

La Figura 1 muestra los resultados de un análisis de una molécula de ARNip no conjugada para detectar la inhibición de la expresión de ARNm de *LPA* en células RT-4 humanas.

Las Figuras 2A y 2B muestran la respuesta a la dosis de las moléculas de ARNip dirigidas a *LPA* no conjugadas en la expresión de ARNm de *LPA* en células RT-4 humanas.

La Figura 3 muestra la inhibición de la expresión de ARNm de *LPA* en hepatocitos primarios de cinomolgo y humanos por parte de dosis diferentes de moléculas de ARNip conjugadas con GalNAc-L1 *LPA*-1038 administradas mediante absorción mediada por el receptor.

La Figura 4 muestra ejemplos representativos de la inactivación de *LPA*-ARNm por parte de ARNip de GalNAc conjugados con L6 indicados en hepatocitos humanos primarios administrados mediante absorción mediada por el receptor.

La Figura 5 muestra la síntesis de A0268, que es un oligonucleótido de cadena simple conjugado con 3’ mono-GalNAc y es el material de partida en la síntesis del Conjugado 1 y el Conjugado 3. (ps) indica un enlace fosforotioato.

La Figura 6 muestra la síntesis de A0006 que es un oligonucleótido de cadena simple conjugado con 5’ GalNAc triantenaria usado para la síntesis del Conjugado de referencia 4. (ps) indica un enlace fosforotioato.

La Figura 7 ilustra la determinación *in vitro* de la inactivación de la TTR. En particular, la Figura 7A muestra la determinación *in vitro* de la inactivación de TTR mediante los Conjugados de referencia (CR) 1 y 3 así como el control sin tratamiento «ST»; la Figura 7B muestra la determinación *in vitro* de la inactivación de TTR mediante los Conjugados de referencia (CR) 2 y 3, así como el control sin tratamiento «ST»; y la Figura 7C muestra la determinación *in vitro* de la inactivación de TTR mediante los Conjugados 1, 2 y 3, así como también mediante CR3 y el control sin tratamiento «ST». Los Conjugados de referencia 1 y 2 representan conjugados comparadores. El Conjugado de referencia 3 representa un ARNip de GalNAc sin direccionamiento y «sin tratamiento» («ST») representa células no tratadas. Tanto CR3 como ST son controles negativos. Los niveles de ARNm se normalizaron contra PtenII.

La Figura 8 muestra un curso temporal de la TTR en suero en cohortes de ratones c57BL/6 de n=4 a los 7, 14 y 27 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg - Conjugados 1-3, Conjugados de referencia (CR) 1, 2 y 4 e individuos tratados de forma simulada (PBS).

La Figura 9 muestra la síntesis de oligonucleótidos de precursores de oligonucleótidos conjugados con GalNAc 3’ y 5’ (tal como el compuesto X0385B-prec).

La Figura 10 muestra una igual respuesta a la dosis de inactivación para ARNip dirigido a LPA con dos unidades de GalNAc únicas conjugadas con la segunda cadena en comparación con una unidad de GalNAc triantenaria en el extremo 5’ de la segunda cadena en hepatocitos de cinomolgo primarios.

La Figura 11 ilustra la determinación *in vitro* de la inactivación de la TTR. En particular, la Figura 11A muestra la determinación *in vitro* de la inactivación de la TTR por parte de los Conjugados 4, 5, 6 y 2 en comparación con «Luc» (Conjugado de referencia 3) así como también el control sin tratamiento «ST»; la Figura 11B muestra la determinación *in vitro* de la inactivación de la TTR por parte de los Conjugados 7 y 2, en comparación con «Luc» (Conjugado de referencia 3) así como también el control sin tratamiento «ST». Luc o el Conjugado de referencia 3 (CR3) representa un ARNip de GalNAc sin direccionamiento y «sin tratamiento» («ST») representa células no tratadas. Tanto CR3 como ST son controles negativos. Los niveles de ARNm se normalizaron contra PtenII.

La Figura 12 ilustra la determinación *in vitro* de la inactivación de la TTR. En particular, la Figura 12A muestra la determinación *in vitro* de la inactivación de la TTR por parte de los Conjugados 8, 9, 10, 11 y 2 en comparación con «Luc» (Conjugado de referencia 3) así como también el control sin tratamiento «ST»; la Figura 12B muestra la determinación *in vitro* de la inactivación de la TTR por parte de los Conjugados 12 y 2, en comparación con «Luc» (Conjugado de referencia 3) así como también el control sin tratamiento «ST». Luc o el Conjugado de referencia 3 representa un ARNip de GalNAc sin direccionamiento y «sin tratamiento» («ST») representa células no tratadas. Tanto CR3 como ST son controles negativos. Los niveles de ARNm se normalizaron contra PtenII.

La Figura 13 ilustra la determinación *in vitro* de la inactivación de ARNm de *LPA* por parte del Conjugado 19 en comparación con los controles. Ctr representa un ARNip de GalNac sin direccionamiento y «sin tratamiento» («ST») representa células no tratadas. Tanto Ctr como ST son controles negativos. Los niveles de ARNm se normalizaron contra *ACTB*.

La Figura 14 muestra un curso temporal de niveles de ARNm del hígado *Aldh2* en cohortes de ratones c57BL/6 de n=6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg - Conjugado 15, Conjugado de referencia (CR) 6 e individuos tratados de forma simulada (PBS). Los niveles de ARNm se normalizaron contra *Pten*.

La Figura 15 muestra un curso temporal de niveles de ARNm del hígado *Aldh2* en cohortes de ratones c57BL/6 de n=6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg - Conjugado 16, Conjugado de referencia (CR) 7 e individuos tratados de forma simulada (PBS). Los niveles de ARNm se normalizaron contra *Pten*.

La Figura 16 muestra un curso temporal de niveles de ARNm del hígado *Tmprss6* en cohortes de ratones c57BL/6 de n=6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg - Conjugado 18, Conjugado de referencia (CR) 8 e individuos tratados de forma simulada (PBS). Los niveles de ARNm se normalizaron contra *Pten*.

La Figura 17 muestra la estabilidad en suero de los Conjugados 4, 5, 6, 7 y 2, y control sin tratamiento (ST) a 37 °C en el transcurso de 3 días.

La Figura 18 muestra la estabilidad en suero de los Conjugados 8, 9, 10, 11, 12 y 2, y control sin tratamiento (ST) a 37 °C en el transcurso de 3 días.

La Figura 19 muestra la reducción en el ARNm de *LPA* en hepatocitos humanos primarios por parte del Conjugado 21.

La Figura 20 muestra la reducción en el ARNm de *LPA* en hepatocitos de cinomolgo primarios por parte del Conjugado 21.

La Figura 21 muestra que el Conjugado 21 no afecta el nivel de la expresión del gen *APOB*.

La Figura 22 muestra que el Conjugado 21 no afecta el nivel de la expresión del gen *PLG*.

La Figura 23 muestra un curso temporal de la inhibición de Lp(a) en suero en 29 días en cinomolgo con diferentes dosificaciones del conjugado 21.

La Figura 24 muestra una curva de respuesta a la dosis del conjugado 21 que muestra una reducción del Lp(a) en suero en el día 29 en cinomolgo.

Ejemplos

La numeración a la que se hace referencia en cada ejemplo es específica para dicho ejemplo.

<u>Ejemplo 1</u>

Una cantidad de moléculas de ARNip conjugadas y modificadas utilizadas para los ejemplos funcionales se muestran aquí.

Derivados de LPA -1038:

<u>GalNAc-LPA-1038-L1</u>

Primera cadena (SEQ ID NO: 119, en base a la SEQ ID NO 5)

OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA 3’

Segunda cadena (SEQ ID NO: 120, en base a la SEQ ID NO 6)

5´[ST23 (ps)]3 (ps) triple largo FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3’

GalNAc-LPA-1038-L6

Primera cadena (SEQ ID NO: 121, en base a la SEQ ID NO 5)

OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA 3'

Segunda cadena (SEQ ID NO: 122, en base a la SEQ ID NO 6)

5´[ST23 (ps)]3 ST43 (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

FN (N=A, C, G, U) indica 2´Fluoro, 2´ DesoxiNucleósidos

OMeN (N=A, C, G, U) indica 2´O Metil Nucleósidos

(ps) indica un enlace fosforotioato

ST23 y ST43 son como se indica a continuación.

Un ejemplo adicional son los derivados de LPA 1041:

GalNAc-LPA-1041-L1

Primera cadena (SEQ ID NO: 123, en base a la SEQ ID NO 9)

5' OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG 3'

Segunda cadena (SEQ ID NO: 124, en base a la SEQ ID NO 10)

5´[ST23 (ps)]3 (ps) triple largo FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

GalNAc-LPA-1041-L6

Primera cadena (SEQ ID NO: 125, en base a la SEQ ID NO 9)

5' OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG 3'

Segunda cadena (SEQ ID NO: 126, en base a la SEQ ID NO 10)

5´[ST23 (ps)]3 ST43 (ps) FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

FN (N=A, C, G, U) indica 2´Fluoro, 2´ DesoxiNucleósidos

OMeN (N=A, C, G, U) indica 2´O Metil Nucleósidos

(ps) indica un enlace fosforotioato

Todos los oligonucleótidos se obtuvieron de fabricantes de oligonucleótidos comerciales (Biospring, Fráncfort, Alemania o RiboBio, Guangzhou, Guangdong, China) o se sintetizaron

en un sintetizador AKTA oligopilot (interno) usando química de fosforamidita convencional. Se usaron soporte sólido disponible comercialmente y fosforamiditas de ARN de 2’ O-metilo, fosforamiditas de ADN 2’Fluoro (todo de protección estándar) y fosforamidita de enlace triple largo (Glen research) disponible comercialmente. La síntesis se llevó a cabo usando soluciones 0,1 M de la fosforamidita en acetonitrilo seco y se usó benciltiotetrazol (BTT) como activador (0,3 M en acetonitrilo). Todos los otros reactivos eran reactivos convencionales disponibles comercialmente.

La conjugación del sintón de GalNac respectivo (p. ej., ST23, ST41 o ST43) se logró al acoplar la fosforamidita respectiva al extremo 5’ de la oligocadena en condiciones de acoplamiento de fosforamidita convencionales. Los fosforotioatos se introdujeron usando reactivos de tiolación disponibles comercialmente convencionales (EDITH, Link technologies).

Las cadenas simples se escindieron del CPG mediante el uso de metilamina (40 % acuosa) y el oligonucleótido bruto resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio de iones (Resource Q, 6 mL, GE Healthcare) en un sistema de HPLC AKTA Pure usando una 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 hibridación, se disolvieron cantidades equimolares de las cadenas simples respectivas en agua y se calentaron a 80 °C durante 5 min. Después de enfriar gradualmente a TA, el dúplex resultante se liofilizó.

Las secuencias de los ácidos nucleicos resultantes (ARNip) se presentan en la Tabla 1 que figura a continuación.

Tabla 1: Secuencias de ácido nucleico no conjugado analizadas para detectar la inhibición de la expresión de ARNm de *LPA*. Se indican las secuencias y el patrón de modificación aplicado

SEQ ID NO:	**ID del ARNip**	**cadena**	**Secuencia**	**Modificaciones**
1	**LPA-1014**	primera cadena	5’ucguauaacaauaaggggc 3’	5381616272616284847
2		segunda cadena	5’gccccuuauuguuauacga 3’	4737351615451616382

3	**LPA-1024**	primera cadena	5’gauaacucuguccauuacc 3’	8252635354537251637
4		segunda cadena	5’gguaauggacagaguuauc 3’	4816254827282815253
5	**LPA-1038**	primera cadena	5’auaacucuguccauuacca 3’	6162717181736152736
6		segunda cadena	5’ugguaauggacagaguuau 3’	1845261846364645161
7	**LPA-1040**	primera cadena	5’uaacucuguccauuaccgu 3’	5263535453725163745
8		segunda cadena	5’acgguaauggacagaguua 3’	2748162548272828152
9	**LPA-1041**	primera cadena	5’auaacucuguccauuaccg 3’	6162717181736152738
10		segunda cadena	5’cgguaauggacagaguuau 3’	3845261846364645161
11	**LPA-1055**	primera cadena	5’agaaugugccucgauaacu 3’	6462545473538252635
12		segunda cadena	5’aguuaucgaggcacauucu 3’	2815253828472725171
13	**LPA-1057**	primera cadena	5’auaacucuguccaucacca 3’	6162717181736172736
14		segunda cadena	5’uggugauggacagaguuau 3’	1845461846364645161
15	**LPA-1058**	primera cadena	5’auaacucuguccaucaccu 3’	6162717181736172735
16		segunda cadena	5’aggugauggacagaguuau 3’	2845461846364645161
17	**LPA-1061**	primera cadena	5’uaacucuguccauuaccau 3’	5263535453725163725

18		segunda cadena	5’augguaauggacagaguua 3’	2548162548272828152
19	**LPA-1086**	primera cadena	5’augugccuugauaacucug 3’	6181837154616271718
20		segunda cadena	5’cagaguuaucaaggcacau 3’	3646451617264836361
21	**LPA-1099**	primera cadena	5’aguuggugcugcuucagaa 3’	6451845471835172826
22		segunda cadena	5’uucugaagcagcaccaacu 3’	1535462836472736271
23	**LPA-1102**	primera cadena	5’aauaaggggcugccacagg 3’	6252648483547363648
24		segunda cadena	5’ccuguggcagccccuuauu 3’	3718184728373715251
25	**LPA-1116**	primera cadena	5’uaacucuguccaucaccau 3’	5263535453725363725
26		segunda cadena	5’auggugauggacagaguua 3’	2548182548272828152
27	**LPA-1127**	primera cadena	5’augagccucgauaacucug 3’	6182837174616271718
28		segunda cadena	5’cagaguuaucgaggcucau 3’	3646451617464835361
29	**LPA-1128**	primera cadena	5’aaugagccucgauaacucu 3’	6254647353825263535
30		segunda cadena	5’agaguuaucgaggcucauu 3’	2828152538284717251
31	**LPA-1141**	primera cadena	5’aaugcuuccaggacauuuc 3’	6254715372846361517
32		segunda cadena	5’gaaauguccuggaagcauu 3’	4626181735482647251

33	**LPA-1151**	primera cadena	5’acaguggugagaaugugc 3’	6364548184646254547
34		segunda cadena	5’gcacauucuccaccacugu 3’	4727251717363727181
35	**LPA-1171**	primera cadena	5’guaugugccucgauaacuc 3’	8161818371746162717
36		segunda cadena	5’gaguuaucgaggcacauac 3’	4645161746483636163
37	**LPA-1177**	primera cadena	5’ucgauaacucuguccauca 3’	5382526353545372536
38		segunda cadena	5’ugauggacagaguuaucga 3’	1825482728281525382
39	**LPA-1189**	primera cadena	5’ugucacuggacauuguguc 3’	5453635482725181817
40		segunda cadena	5’gacacaauguccagugaca 3’	4636362545372818272
41	**LPA-1244**	primera cadena	5’cugggauccaugguguaac 3’	7184825372548181627
42		segunda cadena	5’guuacaccauggaucccag 3’	4516363725482537364
43	**LPA-1248**	primera cadena	5’agaugaccaagcuuggcag 3’	6461827362835184728
44		segunda cadena	5’cugccaagcuuggucaucu 3’	3547362835184536171

Tabla 1

Tabla 1: Las modificaciones de nucleótidos se indican con los siguientes números (columna 4), 1=2´F-dU, 2=2’F-dA, 3=2´F-dC, 4=2´F-dG, 5=2'-OMe-rU; 6=2'-OMe-rA; 7=2'-OMe-rC; 8=2'-OMe-rG.

Tabla 2: A continuación se muestran las secuencias de conjuntos de amplicones de qPCR de *LPA, APOB, beta-Actina* y *PTEN* usados para medir los niveles de ARNm.

Gen	Especie	Secuencias	SEQ ID NO:
LPA: (superior)	humano	5’ AAGTGTCCTTGCGACGTCC 3’	45
LPA: (inferior)		5’ CCTGGACTGTGGGGCTTT 3’	46
LPA: (sonda)		5’ CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGAGC 3’	47
LPA (superior)	de cinomolgo	5’ GTGTCCTCGCAACGTCCA 3’	48
LPA (inferior)		5’ GACCCCGGGGCTTTG 3’	49
LPA (sonda)		5’TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG 3’	50
APOB (superior)	humano	5’ TCATTCCTTCCCCAAAGAGACC 3’	51
APOB (inferior)		5’ CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG 3’	52
APOB (sonda)		5’ CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA 3’	53
beta-Actina (superior)	humano	5’ GCATGGGTCAGAAGGATTCCTAT 3’	54
beta-Actina (inferior)		5’ TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT 3’	55
beta-Actina (sonda)		5’ TCGAGCACGGCATCGTCACCAA 3’	56
beta-Actina (superior)	de cinomolgo	5’ AAGGCCAACCGCGAGAAG 3’	57
beta-Actina (inferior)		5’ AGAGGCGTACAGGGACAGCA 3’	58
beta-Actina (sonda)		5’ TGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTAC 3’	59

PPIB (superior)	humano	5’ AGATGTAGGCCGGGTGATCTTT 3’	60
PPIB (inferior)		5’ GTAGCCAAATCCTTTCTCTCCTGT 3’	61
PPIB (sonda)		5’ TGTTCCAAAAACAGTGGATAATTTTGTGGCC 3’	62

Tabla 2

Ejemplo 2

Análisis de moléculas de ARNip no conjugadas (Tabla 1) para detectar la inhibición de la expresión de ARNm de *LPA* en células RT-4 humanas.

Se prepararon complejos de transfección liposomal por triplicado en una relación de 1,5 µl RNAiMax (ThermoFisher) / 80 pmol de las moléculas de ARNip indicadas. El complejo se diluyó en las concentraciones indicadas de 2,5 nM y 25 nM, respectivamente (valores representados por pares como barras gris claro y oscuro). Las células del papiloma de la célula transicional de la vejiga urinaria humana RT4 que expresan *LPA* de manera endógena se sembraron a una densidad de 125 000 células por pocillo en un formato de 24 pocillos encima de complejos de transfección previamente colocados en placas (transfección inversa) en la concentración indicada. 24 horas después de la transfección, se aisló el ARN total usando el Spin Cell Mini Kit 250 (Stratec). Los niveles de ARNm de *LPA* se determinaron mediante qRT-PCR con respecto a la expresión de ARNm de *PPIB* en las muestras respectivas como transcripción constitutiva. Los valores se normalizaron a la cantidad de ARNm de *LPA* detectado en células sin tratamiento (intraplaca). Se transfectó un compuesto de ARNip no silenciante como control adicional. Se muestran las medias y SD de los valores normalizados por triplicado. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 3

Respuesta a la dosis de compuestos de ARNip dirigidos a *LPA* no conjugados en la expresión de ARNm de *LPA* en células RT-4 humanas.

Se transfectaron células del papiloma de la célula transicional de la vejiga urinaria humana RT4 de manera inversa como se describió anteriormente (Ejemplo 2) y se trataron a la concentración indicada (intervalo 100 nM a 0,2 nM) con los compuestos de ARNip no

conjugados diferentes (Tabla 1) como se etiqueta. 24 h después de la transfección total, se aisló el ARN total usando el Spin Cell Mini Kit 250 (Stratec). Los niveles de ARNm de *LPA* se determinaron mediante qRT-PCR con respecto a la expresión de ARNm de *PPIB* en las muestras respectivas como transcripción constitutiva. Los valores se normalizaron a la cantidad de ARNm de *LPA* detectado en las células sin tratamiento. Las barras representan la expresión de ARNm de LPA restante para cada punto de datos. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 4

Inhibición de la expresión de ARNm de *LPA* en hepatocitos primarios de cinomolgo y humanos por parte de dosis diferentes de molécula de ARNip conjugada con GalNAc-L1 LPA-1038 administrada mediante absorción mediada por el receptor.

Se colocaron hepatocitos primarios (ThermoFisher) en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno a densidades de 45 000 células por pocillo (de cinomolgo) y 30 000 células por pocillo (humanas). Se agregó LPA-1038 conjugado con GalNAc-L1 inmediatamente después de la colocación en placas en las concentraciones indicadas (nM). 24 horas después del tratamiento de ARNip, el ARN total se aisló usando el kit de 96 pocillos de HTS de células de ARN InviTrap (Stratec). Los niveles de ARNm de *LPA* se determinaron mediante qRT-PCR con respecto a los niveles de ARNm de *Actina* (de cinomolgo) o *APOB* (humano) en las muestras respectivas como transcripción constitutiva. Los valores se normalizaron a la expresión de *LPA* en células sin tratamiento. Las medias y SD de valores normalizados por triplicado de niveles de ARNm de LPA restantes se muestran como barras negras. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 5

Inactivación de *LPA*-ARNm en hepatocitos humanos primarios mediante ARNip conjugados con L6-GalNAc diferentes indicados en hepatocitos humanos primarios tras la administración mediada por el receptor.

Los hepatocitos humanos primarios (ThermoFisher) se colocaron en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno a 30 000 células por pocillo (formato de 96 pocillos). Se agregaron ARNip conjugados con GalNAc-L6, lo que incluye un control no silenciante, inmediatamente después de la colocación de las células en placas en las dos concentraciones indicadas. 24 horas después del tratamiento de ARNip, el ARN total se aisló usando el kit de 96 pocillos de

HTS de células de ARN InviTrap (Stratec). Los niveles de expresión de ARNm de *LPA* se determinaron mediante qRT-PCR con respecto al ARNm de *APOB* como transcripción constitutiva. Los valores se normalizaron con respecto a la expresión de ARNm de *LPA* en células sin tratamiento y los niveles de ARNm de *LPA* restantes se representaron por pares como barras (100 nM barras negras, 20 nM barras grises). Las medias y SD de los valores normalizados por triplicado se muestran en la Figura 4.

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

Se sembraron hepatocitos murinos primarios en placas de 96 pocillos, pre-recubiertos con colágeno (Thermo Fisher Scientific, #A1142803) a una densidad celular de 30 000 células por pocillo y se trataron con conjugados de ARNip en concentraciones que variaban entre 10 nM y 0,0001 nM. 24 h después del tratamiento, las células se lisaron y se extrajo el ARN con el kit de 96 pocillos de HTS de células de ARN / C24 x 96 preps InviTrap® (Stratec #7061300400) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de transcripción de la TTR y ARNm constitutivo (PtenII) se cuantificaron mediante análisis TaqMan.

La expresión del gen diana en hepatocitos murinos primarios 24 h después del tratamiento con los conjugados de la invención, los Conjugados 1-3, mostró que la expresión del gen diana disminuye a medida que se aumenta la dosis del conjugado en comparación con los controles negativos (ver la columna «ST» y el Conjugado de referencia 3), como se muestra en la Figura 7. Esto indica que la primera cadena se une al gen diana, disminuyendo así la expresión génica. La Figura 7 también muestra los niveles de expresión del gen diana de los Conjugados de referencia 1 y 2 que actúan como conjugados comparativos. Como se puede ver al comparar los datos presentados en las Figuras 7A y 7C, y 7B y 7C, los conjugados de la invención (Conjugados 1-3) disminuyen la expresión del gen diana en comparación con los Conjugados de referencia 1 y 2. El conjugado más efectivo a 0,01 nM parece ser el Conjugado 2. El conjugado más efectivo a 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM y 10 nM parece ser el Conjugado 3.

Ejemplo 7: Curso temporal *in vivo* de TTR en suero en ratones

Se trataron ratones C57BL/6 s.c. con 1mg/kg de conjugados de ARNip en el día 0. Se tomaron muestras de suero los días 7, 14 y 27 mediante sangrado del seno orbital y se almacenaron a -20 °C hasta la realización del análisis. Se realizó la cuantificación de TTR en suero con un

ELISA de prealbúmina de ratón (ALPCO, 41-PALMS/lote 22, 2008003B) de acuerdo con el protocolo del fabricante (dilución de la muestra 1:8000 o 1:800).

Los resultados del curso temporal de la TTR en suero en cohortes de ratones c57BL/6 de n=4 a los 7, 14 y 27 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg de los Conjugados 1-3, Conjugados de referencia 1, 2 y 4 e individuos tratados de forma simulada (PBS) se muestran en la Figura 8. Como indican los datos de la Figura 8, los conjugados de la invención son particularmente eficaces para reducir la expresión del gen diana en comparación con el control negativo (PBS) y los Conjugados de referencia 1, 2 y, en particular, el Conjugado de referencia 4. Los Conjugados 2 y 3 también son más eficaces que los Conjugados de referencia 1, 2 y 4. El conjugado más eficaz es el Conjugado 2. Por lo tanto, es de esperarse que el nivel de dosificación del Conjugado 3 sea alrededor de tres veces menor para lograr la misma inactivación inicial y que también daría como resultado una inactivación de mayor duración en comparación con el Conjugado de referencia 4.

Más específicamente, el Conjugado 2 dio como resultado un nivel de proteína diana en suero 3 veces menor al día siete y un nivel de proteína diana en suero 4 veces menor al día 27 en comparación con el Conjugado de referencia 4 en una dosis equimolar en ratones de tipo salvaje. Además, el Conjugado 2 dio como resultado un 85 % de reducción del nivel de proteína diana en suero al día 27 después de una única inyección, en comparación con 36 % de reducción con una cantidad equimolar del Conjugado de referencia 4.

<u>Ejemplo 8</u>

Igual respuesta a la dosis de inactivación para ARNip dirigido a LPA con dos unidades de GalNAc únicas conjugadas con la segunda cadena en comparación con una unidad de GalNAc triantenaria en el extremo 5’ de la segunda cadena en hepatocitos de cinomolgo primarios.

Los ARNip se modifican con 2’-OMe/2’-F alternantes y cada uno contiene dos enlaces internucleótidos fosforotioato (PS) en sus dos enlaces internucleótidos de los extremos 5’ y 3’. En el conjugado 19, se une una unidad de serinol-GalNAc mediante enlace PS a cada uno del extremo 5’ y 3’ de la segunda cadena. En el conjugado 20, los dos internucleótidos del extremo 5’ de la segunda cadena son fosfodiésteres y un enlazador GalNAc triantenaria se une mediante un enlace PS a este extremo.

La respuesta a la dosis de la inactivación de LPA en hepatocitos primarios de cinomolgo se evaluó 24 h después del tratamiento con ARNip 100, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032 y 0,006 nM. El control de referencia es la construcción 2, el control sin direccionamiento se denomina Cte. El valor de la transcripción ct para cada grupo de tratamiento se normalizó al valor de transcripción ct para el gen constitutivo ACTB (Δct) y a los hepatocitos sin tratamientos, denominados st (ΔΔct).

Los datos se muestran en la Figura 10.

Material y Métodos:

ARNip

SEQ ID NO:	**nombre**	**lote**	**cadena**	**secuencia**
135	**Conjugado 19**	**X0373**	X0373A	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG
136			X0373B	Ser(GN) (ps) fC (ps) mG (ps) fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)
135	**Conjugado de referencia 9**	**STS20041L6**	STS2041A	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG
137			STS2041B	ST23 (ps) ST23 (ps) ST23 (ps) C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU
138	**Conjugado de referencia 5 (CTR)**	**X0125**	X0125A	mC (ps) fU (ps) mU fA mC fU mC fU mC fG mC fC mC fA mA fG mC (ps) fG (ps) mA
139			X0125B	$[(ST23)\ (ps)]_3$ (C6XLT) (ps) fU mC fG mC fU mU fG mG fG mC fG mA fG mA fG mU fA (ps) mA (ps) fG

Leyenda

mA, mU, mC, mG	ARN de 2‘-O-Metilo
fA, fU, fC, fG	ARN de 2’-desoxi-2’-fluoro
(ps)	fosforotioato
(po)	fosfodiéster

Cebador:

			SEQ ID NO:
	dir	GTGTCCTCGCAACGTCCA	48
LPA	inv	GACCCCGGGGCTTTG	49
	sonda	BHQ1-TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG-F	140
	dir	GCATGGGTCAGAAGGATTCCTAT	54
ACTB	inv	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT	55
	sonda	BHQ1-TCGAGCACGGCATCGTCACCAA-VIC	141

Métodos generales

Experimentos in vitro

Hepatocitos murinos primarios (Thermo Scientific: GIBCO Lote: #MC798) se descongelaron y el medio de criopreservación intercambiado por medio Williams E complementado con FBS al 5 %, dexametasona 1 µM, GlutaMax 2 mM, PenStrep al 1 %, 4 mg/ml de insulina recombinante humana, Hepes 15 mM. La densidad celular se ajustó a 250000 células por 1 ml. Se sembraron 100 µl por pocillo de esta suspensión de células en placas de 96 pocillos prerecubiertas con colágeno. El artículo de prueba se prediluyó en el mismo medio (concentrado 5 veces) para cada concentración y se agregaron 25 µl de este ARNip prediluido o medio solo a las células. Se cultivaron las células a 37 °C y CO_2 al 5 %. 24 h después del tratamiento, se desechó el sobrenadante y las células se lavaron en PBS frío y se agregaron 250 µl de ARN-amortiguador de lisis S (Stratec). Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, las placas se almacenaron a -80 °C hasta lograr el aislamiento de ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis TaqMan

Para el análisis de mTTR y PTEN MultiPlex TaqMan, se mezclaron 10µl de ARN aislado para cada grupo de tratamiento con 10 µl de PCR mastermix (TAKYON low Rox) que contenía cebador mTTR 600 nM, cebador ApoB 400 nM y 200 nM de cada sonda así como también 0,5

unidades de polimerasa de RT Euroscript II con 0,2 unidades de inhibidor de ribonucleasa. El análisis TaqMan se realizó en una placa de 384 pocillos con una etapa RT de 10 min a 48 °C, 3 min de desnaturalización inicial a 95 °C y 40 ciclos de 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 1 min. Los cebadores contienen dos de BHQ1, FAM e YY, uno en cada extremo de la secuencia.

Para el análisis de TMPRSS6 y ApoB MultiPlex TaqMan, se mezclaron 10 µl de ARN aislado para cada grupo de tratamiento con 10 µl de PCR mastermix (TAKYON low Rox) que contenía cebador TMPRSS6 800 nM, cebador ApoB 100 nM y 200 nM de cualquiera de las sondas así como también 0,5 unidades de polimerasa de RT Euroscript II con 0,2 unidades de inhibidor de ribonucleasa. El análisis TaqMan se realizó en una placa de 384 pocillos con una etapa RT de 10 min a 48 °C, 3 min de desnaturalización inicial a 95 °C y 40 ciclos de 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 1 min.

Experimentos in vivo

Para comparar la potencia *in vivo* de los diferentes conjugados de ARNip, se administró 1mg/kg de ARNip disuelto en PBS de manera subcutánea en la región escapular de ratones c57BL/6. Se trataron cohortes de n=6 con *Aldh2* o *Tmprss6* dirigido a ARNip el día 1 y se sacrificaron en momentos seleccionados después del tratamiento. Se congelaron muestras de hígado de manera instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ARN con InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kit (stratec) de acuerdo con el manual del fabricante. Luego, se cuantificó el nivel de transcripción de *Aldh2*, *Tmprss6* y *Pten* como se describió anteriormente.

Ensayo de estabilidad de tritosomas

Para detectar la estabilidad de la ribonucleasa en el compartimiento endosomal/lisosomal de las células hepáticas *in vitro* se incubó ARNip durante 0 h, 4 h, 24 h o 72 h en tritosomas de hígado de rata Sprague Dawley (Tebu- Bio, Cat. n.º: R0610.LT, lote: 1610405, pH: 7,4, 2,827 unidades/ml). Para imitar el ambiente acidificado, se mezclaron los tritosomas 1:10 con amortiguador de pH bajo (ácido acético 1,5 M, acetato de sodio 1,5 M pH 4,75). 30 µl de esto acidificó los tritosomas. Luego se mezclaron 10µl de ARNip (20µM) y se incubaron para los momentos indicados a 37 °C. Luego de la incubación, el ARN se aisló con Clarity OTX Starter Kit-Cartriges (Phenomenex Cat n.º: KSO-8494) de acuerdo con el protocolo del fabricante para fluidos biológicos. El ARN liofilizado se reconstituyó en 30 µl de H_2O, se mezcló con

amortiguador de carga 4x y 5 µl se cargaron en electroforesis en gel de poliacrilamida-TBE al 20 % (PAGE) para análisis cualitativo semi-cuantitativo de separación. Se ejecutó PAGE a 120 V durante 2 h y se visualizó el ARN mediante tinción con bromuro de etidio con posterior imagenología digital con un sistema de generación de imágenes Biorad.

Ejemplo 9: Síntesis de conjugados

Los compuestos de ejemplo se sintetizaron de acuerdo con métodos descritos a continuación y métodos conocidos por el experto en la técnica. El montaje de la cadena de oligonucleótidos y las unidades estructurales del enlazador se realizó mediante síntesis de fase sólida al aplicar metodología de fosforamidita. La conjugación de GalNAc se logró mediante la formación de enlace peptídico de una unidad estructural de GalNAc-ácido carboxílico al oligonucleótido purificado y montado previamente que tenía la cantidad necesaria de unidades estructurales de enlazador modificadas con amino unidas.

La purificación, desprotección y síntesis de oligonucleótidos siguieron los procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador AKTA oligopilot usando química de fosforamidita convencional. Se usaron soporte sólido disponible comercialmente y fosforamiditas de ARN de 2’ O-Metilo, fosforamiditas de ARN 2’Fluoro 2’Desoxi (todo de protección estándar, ChemGenes, LinkTech) y CPG de lcaa TFA Amino C-6 modificador 3'-Amino 500Å (Chemgenes) disponible comercialmente, Fmoc-Amino-DMT C-7 CE fosforamidita (GlyC3Am), CPG de lcaa TFA C-3 modificador 3'-Amino 500Å (C3Am), Fmoc-Amino-DMT C-3 CED fosforamidita (C3Am) y TFA-Amino C-6 CED fosforamidita (C6Am) (Chemgenes), 3'-Amino-modificador C7 CPG (C7Am) (Glen Research), TFA amino fosforamidita no de nucleósidos (Pip), soporte sólido TFA amino no de nucleósidos (PipAm) (AM Chemicals). La galactosamina per-acetilada **8** se encuentra disponible comercialmente.

Los reactivos auxiliares se compraron de EMP Biotech. La síntesis se llevó a cabo usando una solución 0,1 M de la fosforamidita en acetonitrilo seco y se usó benciltiotetrazol (BTT) como activador (0,3 M en acetonitrilo). El tiempo de acoplamiento fue de 15 min. Se aplicó un ciclo Casquete/OX/Casquete o Casquete/Tio/Casquete (Casquete: Ac_2O/NMI/Lutidina/Acetonitrilo, Oxidante: I_2 0,1M en piridina/H_2O). Los fosforotioatos se introdujeron usando reactivo de tiolación disponible comercialmente convencional (EDITH, Link technologies). La escisión de DMT se logró mediante tratamiento con ácido dicloroacético al 3 % en tolueno. Al completar

los ciclos de síntesis programados, se realizó un lavado con dietilamina (DEA). Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en modo sin DMT.

La unión del resto enlazador derivado de serinol se logró mediante el uso de (S)-DMT-Serinol(TFA)-succinato-lcaa-CPG **10** cargado con base o una (S)-DMT-Serinol(TFA) fosforamidita **7** (la síntesis se realizó según se describe en la bibliografía Hoevelmann *et ál.* Chem. Sci., 2016,7, 128-135). Se introdujeron conglomerados de GalNAc triantenario (ST23/C4XLT o ST23/C6XLT) mediante el acoplamiento sucesivo de los derivados de amidita de enlace triple respectivos (C4XLT-phos o C6XLT-phos) seguido por la GalNAc amidita (ST23-phos).

La unión de restos modificados con amino (enlazadores no derivados de serinol) se logró mediante el uso de CPG de unidad estructural modificado con amino o la amidita respectivos disponibles comercialmente.

Las cadenas simples se escindieron del CPG mediante tratamiento con metilamina ac. al 40 %. El oligonucleótido bruto resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio de iones (Resource Q, 6 mL, GE Healthcare) en un sistema de HPLC AKTA Pure usando una 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.

Las cadenas simples individuales se disolvieron en una concentración de 60 OD/mL en H_2O. Ambas soluciones de oligonucleótidos individuales se agregaron al mismo tiempo a un recipiente de reacción. Se llevó a cabo una titulación para monitorear la reacción de manera más fácil. La primera cadena se agregó en un 25 % de exceso con respecto a la segunda cadena según se determinó mediante absorción de UV a 260 nm. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C, durante 5 min y luego se enfrió lentamente hasta TA. La formación de cadena doble se monitoreó mediante HPLC de fase inversa de pares de iones. La cantidad necesaria de la segunda cadena se calculó a partir del área UV de la cadena simple residual y se agregó a la mezcla de reacción. La reacción se calentó a 80 °C de nuevo y se enfrió lentamente hasta TA. Este procedimiento se repitió hasta que se detectó menos de 10 % de cadena simple residual.

*Síntesis de los compuestos **2-10***

Los compuestos **2** a **5** y (S)-DMT-Serinol(TFA)-fosforamidita **7** se sintetizaron de acuerdo con los métodos publicados en la bibliografía (Hoevelmann et ál. Chem. Sci., 2016,7, 128-135).

Ácido (S)-4-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)propoxi)-4-oxobutanoico (6).

A una solución de **5** en piridina se agregó anhídrido succínico seguido por DMAP. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se consumió todo el material de partida, según se juzga mediante TLC. Se concentró la reacción. El material bruto se cromatografió en gel de sílice usando una gradiente de 0 % a 5 % de metanol en DCM (+ 1 % de trietilamina) para proporcionar 1,33 g de **6** (rendimiento = 38 %). m/z (ESI-): 588,2 (100 %), (calculado para C30H29F3NO8$^-$ [M-H]$^-$ 588,6). 1 H-NMR: (400 MHz, CDCl3) δ [ppm] = 7,94 (d, 1H, NH), 7,39 - 7,36 (m, 2H, CHarilo), 7,29 - 7,25 (m, 7H, CHarilo), 6,82-6,79 (m, 4H, CHarilo), 4,51 – 4,47 (m, 1H), 4,31 – 4,24 (m, 2H), 3,77 (s, 6H, 2xDMTr-OMe), 3,66 - 3,60 (m, 16H, $HNEt_3^+$), 3,26 - 3,25 (m, 2H), 2,97 – 2,81 (m, 20H, NEt_3), 2,50-2,41 (4H, m), 1,48 – 1,45 (m, 26H, $HNEt_3^+$), 1,24 - 1,18 (m, 29H, NEt_3).

(S)-DMT-Serinol(TFA)-succinato-lcaa-CPG (10)

Se disolvieron el (S)-DMT-Serinol(TFA)-succinato (159 mg, 270 umol) y HBTU (113 mg, 299 umol) en CH_3CN (10 mL). Se agregó diisopropiletilamina (DIPEA, 94 µL, 540 umol) a la solución y la mezcla se agitó con movimientos circulares durante 2 min seguido por la adición de amino-lcaa-CPG natural (500 A, 3 g, contenido de amina: 136 umol/g). La suspensión se agitó suavemente a temperatura ambiente en un agitador de acción de muñeca durante 16 h y luego se filtró y se lavó con DCM y EtOH. El soporte sólido se secó al vacío durante 2 h. Se protegieron las aminas sin reaccionar en el soporte al agitar con anhídrido acético/lutidina/N-metilimidazol a temperatura ambiente. Se repitió el lavado del soporte como se estableció anteriormente. El sólido se secó al vacío para proporcionar el soporte sólido **10** (carga de 3 g, 26 umol/g).

Sintón de GalNAc (9)

La síntesis del sintón de GalNAc **9** se realizó según se describe en Nair et ál. J. Am. Chem. Soc., 2014, 136 (49), págs. 16958–16961, en 46 % de rendimiento en dos etapas.

Los datos de caracterización coincidían con los datos publicados.

Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos de cadena simple se sintetizaron de acuerdo con las condiciones de reacción descritas anteriormente y en las Figuras 5 y 6 y se detallan en las Tablas 3 y 4.

Todos los productos de cadena simple finales se analizaron mediante AEX-HPLC para demostrar su pureza. La pureza se proporciona en % de FLP (% de producto de longitud completa) que es el porcentaje del área UV debajo de la señal del producto asignada en la traza UV del análisis AEX-HPLC del producto final. La identidad de los productos de cadena simple respectivos (oligonucleótidos conjugados con GalNAc, precursores modificados con amino o no modificados) se probó mediante análisis LC-MS.

Tabla 3: Oligonucleótidos no conjugados de cadena simple

Producto (11)	**Nombre**	**MW calc.**	**MW (ESI-) hallado**	**% de FLP (AEX-HPLC)**
A0002	STS16001A	6943,3 Da	6943,0 Da	86,6 %
A0006	STS16001BL4	8387,5 Da	8387,5 Da	94,1 %
A0114	STS22006A	6143,8 Da	6143,7 Da	94,3 %
A0115	STS22006BL1	7855,1 Da	7855,1 Da	92,8 %
A0122	STS22009A	6260,9 Da	6260,6 Da	92,8 %
A0123	STS22009BL1	7783,0 Da	7782,9 Da	87,1 %
A0130	STS18001A	6259,9 Da	6259,8 Da	76,5 %
A0131	STS18001BL4	7813,2 Da	7813,1 Da	74,3 %
A0220	STS16001B-5'1xNH2	6982,2 Da	6982,1 Da	95,7 %
A0237	STS16001A	6943,3 Da	6943,3 Da	95,6 %

A0244	STS16001BV1	6845,2 Da	6844,9 Da	98,2 %
A0264	STS16001AV4-3'1xNH2	7112,4 Da	7112,2 Da	95,4 %
A0329	STS16001BV6-3'5'1xNH2	7183,3 Da	7183,2 Da	88,8 %
A0560	STS16001A	6943,3 Da	6943,3 Da	96,7 %
A0541	STS16001BV1-3'5'NH2	7151,3 Da	7151,0 Da	85,6 %
A0547	STS16001BV16-3'5'NH2	7119,3 Da	7119,1 Da	89,9 %
A0617	STS16001BV20-3'5'NH2	7087,3Da	7086,7 Da	90,1 %
A0619	STS16001BV1-3'5'2xNH2	7521,3 Da	7521,3 Da	93,4 %
A0680	STS16001A	6943,3 Da	6942,9 Da	91,2 %
A0514	STS22006A	6143,8 Da	6143,7 Da	94,6 %
A0516	STS22009BV11-3'5'NH2	6665,0 Da	6664,8 Da	87,0 %
A0517	STS22009BV11-3'5'NH2	6593,0 Da	6593,0 Da	86,0 %
A0521	STS12009BV1-3'5'NH2	6437,7 Da	6437,8 Da	91,1 %
A0303	STS12209BL4	7665,0 Da	7664,9 Da	90,4 %
A0304	STS12209A	6393,1 Da	6392,9 Da	77,6 %

A0319	STS22009A	6260,9 Da	6260,5 Da	86,9 %
A0353	STS12009A	6416,1 Da	6416,1 Da	94,1 %
A0216	STS17001A	6178,8 Da	6178,7 Da	87,2 %
A0217	STS17001BL6	7937,2 Da	7937,2 Da	78,3 %

5’1 x NH2 significa la posición (extremo 5’) y número (1 x NH2) de grupos amino derivados de serinol libre que están disponibles para conjugación. Por ejemplo, 1x3’NH2 en **A0264** significa que hay un grupo amino libre que se puede hacer reaccionar con sintón de GalNAc **9** en el extremo 3’ de la cadena **A0264**. 3'5'1xNH2 significa que hay un grupo amino libre derivado de serinol que se puede hacer reaccionar con enlazador GalNAc **9** en el extremo 3’ y el extremo 5’ de la cadena.

Tabla 4: Oligonucleótidos de cadena simple con modificaciones en los extremos 5’ y 3’

Producto	**Nombre**	**mod 5'**	**mod 3'**	**MW calc.**	**MW (ESI-) hallado**	**% de FLP (AEX-HPLC)**
A0561	STS16001BV1-3'5'1xNH2	C6Am	GlyC3Am	7267,5 Da	7267,5 Da	66,7 %
A0563	STS16001BV1-3'5'1xNH2	C3Am	C3Am	7183,4 Da	7183,1 Da	75,1 %
A0651	STS16001BV1-3'5'1xNH2	C6Am	C7Am	7265,6 Da	7265,2 Da	99,6 %
A0653	STS16001BV1-3'5'1xNH2	GlyC3Am	GlyC3Am	7299,5 Da	7299,3 Da	88,1 %
A0655	STS16001BV1-3'5'1xNH2	PipAm	PipAm	7517,7 Da	7517,5 Da	89,8 %

De manera similar, 3’5’1 x NH2 se refiere a la posición (extremos 3’ y 5’) y número (1 x NH2 cada uno) de grupos amino libres que están disponibles para conjugación. Por ejemplo,

3’5’1xNH2 en **A0561** significa que hay 2 grupos amino libres (1 en el extremo 3’ Y 1 en el extremo 5’) que se pueden hacer reaccionar con el sintón de GalNAc **9** en el extremo 3’ de la cadena **A0561**.

Síntesis de determinados conjugados y los conjugados de referencia 1-2

La conjugación del sintón de GalNAc (**9**) se logró mediante acoplamiento a la función serinol-amino de la cadena de oligonucleótidos respectiva **11** usando un reactivo de acoplamiento de péptidos. Por lo tanto, la molécula precursora modificada con amino respectiva **11** se disolvió en H_2O (500 OD/mL) y se agregó DMSO (DMSO/H_2O, 2/1, v/v), seguido por DIPEA (2,5 % del volumen total). En un recipiente de reacción distinto se realizó la pre-activación del ácido GalN(Ac4)-C4 (**9**) al hacer reaccionar 2 eq. (según la función amino en el oligonucleótido precursor modificado con amino **11**) del componente de ácido carboxílico con 2 eq. de HBTU en presencia de 8 eq. de DIPEA en DMSO. Después de 2 min, se agregó el compuesto pre-activado **9** a la solución de la molécula precursora modificada con amino respectiva. Después de 30 min, el progreso de reacción se monitoreó mediante LCMS o AEX-HPLC. Al completar la reacción de conjugación el producto bruto se precipitó al agregar 10x *i*PrOH y 0,1x NaCl 2M y se cosechó mediante decantación y centrifugación. Para liberar los grupos de hidroxilo acetilado en los restos de GalNAc el sedimento resultante se disolvió en 40 % de MeNH2 (1mL por 500 OD) y después de 15 min a TA diluido en H_2O (1:10) y finalmente se volvió a purificar mediante cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio aniónico y se liofilizó para proporcionar el producto final **12** (Tabla 5).

Tabla 5: Oligonucleótidos conjugados con GalNac de cadena simple

Producto (12)	**Material de partida**	**Nombre**	**MW calc.**	**MW (ESI-) hallado**	**% de FLP (AEX-HPLC)**
A0241	A0220	STS16001BL20	7285,5 Da	7285,3 Da	91,8 %
A0268	A0264	STS16001AV4L33	7415,7 Da	7415,4 Da	96,9 %
A0330	A0329	STS16001BV6L42	7789,8 Da	7789,8 Da	95,5 %
A0544	A0541	STS16001BV1L75	7757,9 Da	7757,7 Da	93,3 %
A0550	A0547	STS16001BV16L42	7725,9 Da	7725,7 Da	88,5 %

A0620	A0617	STS16001BV20L75	7693,91 Da	7693,2 Da	90,9 %
A0622	A0619	STS16001BV1L94	8734,3 Da	8734,6 Da	82,9 %
A0519	A0516	STS22006BV11L42	7271,7 Da	7271,7 Da	90,0 %
A0520	A0517	STS22009BV11L42	7199,6 Da	7199,7 Da	92,9 %
A0522	A0521	STS12009BV1L42	7044,4 Da	7044,4 Da	96,0 %
A0603	A0602	STS20041BV1L42	7280,7 Da	7280,4 Da	93,4 %

Síntesis de determinados conjugados de la invención

La conjugación del sintón de GalNAc (**9**) se logró mediante acoplamiento a la función amino de la cadena de oligonucleótidos respectiva **14** usando un reactivo de acoplamiento de péptidos. Por lo tanto, la molécula precursora modificada con amino respectiva **14** se disolvió en H_2O (500 OD/mL) y se agregó DMSO (DMSO/H_2O, 2/1, v/v), seguido por DIPEA (2,5 % del volumen total). En un recipiente de reacción distinto se realizó la pre-activación del ácido GalN(Ac4)-C4 (**9**) al hacer reaccionar 2 eq. (según la función amino en el oligonucleótido precursor modificado con amino **14**) del componente de ácido carboxílico con 2 eq. de HBTU en presencia de 8 eq. de DIPEA en DMSO. Después de 2 min, se agregó el compuesto pre-activado **9** a la solución de la molécula precursora modificada con amino respectiva. Después de 30 min, el progreso de reacción se monitoreó mediante LCMS o AEX-HPLC. Al completar la reacción de conjugación el producto bruto se precipitó al agregar 10x *i*PrOH y 0,1x NaCl 2M y se cosechó mediante decantación y centrifugación. Para liberar los grupos de hidroxilo acetilado en los restos de GalNAc el sedimento resultante se disolvió en 40 % de MeNH2 (1mL por 500 OD) y después de 15 min a TA diluido en H_2O (1:10) y finalmente se volvió a purificar mediante cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio aniónico y se liofilizó para proporcionar el producto final **15** (Tabla 6).

Tabla 6: Oligonucleótidos conjugados con GalNac de cadena simple

Producto (15)	**Material de partida**	**Nombre**	**MW calc.**	**MW (ESI-) hallado**	**% de FLP (AEX-HPLC)**

A0562	A0561	STS16001BV1L87	7874,2 Da	7874,0 Da	82,7 %
A0564	A0563	STS16001BV1L88	7790,0 Da	7789,4 Da	90,4 %
A0652	A0651	STS16001BV1L96	7872,2 Da	7871,8 Da	94,6 %
A0654	A0653	STS16001BV1L97	7906,2 Da	7905,6 Da	89,9 %
A0656	A0655	STS16001BV1L98	8124,3 Da	8124,0 Da	93,6 %

Formación de cadena doble

La formación de cadena doble se realizó de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. La pureza de cadena doble se proporciona en % de cadena doble que es el porcentaje del área UV debajo de la señal del producto asignada en la traza UV del análisis IP-RP-HPLC (Tabla 7).

Tabla 7: Conjugados de ácido nucleico

Producto	**Materiales de partida**		**Nombre**	**% de cadena doble**
	Primera cadena	**Segunda cadena**		
Conjugado de referencia 1	A0237	A0241	STS16001L20	97,7 %
Conjugado de referencia 2	A0268	A0244	STS16001L33	97,8 %
Conjugado de referencia 3	A0130	A0131	STS18001L4	96,8 %
Conjugado de referencia 4	A0002	A0006	STS16001L4	90,1 %
Conjugado de referencia 5	A0216	A0217	STS17001L6	88,4 %
Conjugado 1	A0268	A0241	STS16001L24	96,0 %
Conjugado 2	A0237	A0330	STS16001V1L42	98,5 %
Conjugado 3	A0268	A0330	STS16001V1L43	98,2 %

Conjugado 4	A0560	A0544	STS16001V1L75	92,5 %
Conjugado 5	A0560	A0550	STS16001V16L42	95,3 %
Conjugado 6	A0237	A0620	STS16001V20L75	97,8 %
Conjugado 7	A0237	A0622	STS16001V1L94	93,7 %
Conjugado 8	A0680	A0652	STS16001V1L96	98,4 %
Conjugado 9	A0680	A0654	STS16001V1L97	95,8 %
Conjugado 10	A0680	A0656	STS16001V1L98	97,6 %
Conjugado 11	A0560	A0564	STS16001V1L88	95,0 %
Conjugado 12	A0237	A0562	STS16001V1L87	96,8 %
Conjugado 13	A0114	A0115	STS22006L1	85,6 %
Conjugado 14	A0122	A0123	STS22009L1	96,4 %
Conjugado 15	A0514	A0519	STS22006V11L42	98,6 %
Conjugado 16	A0319	A0520	STS22009V11L42	97,0 %
Conjugado 17	A0304	A0303	STS12209L4	93,0 %
Conjugado 18	A0353	A0522	STS12009V1L42	98,0 %
Conjugado 19	A0601	A0603	STS20041BL42	97,6 %

Secuencias

Clave de modificaciones para las siguientes secuencias:

f indica 2´Fluoro 2´desoxirribonucleótido o 2'-fluoro ribonucleótido (los términos son intercambiables)

m indica 2´O Metil ribonucleótido

(ps) indica un enlace fosforotioato

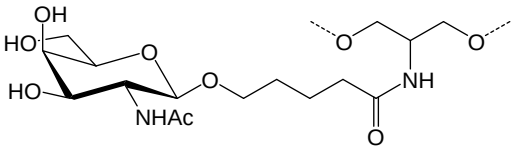
FAM = 6-Carboxifluoresceína

BHQ = Black Hole Quencher 1

YY = Yakima Yellow

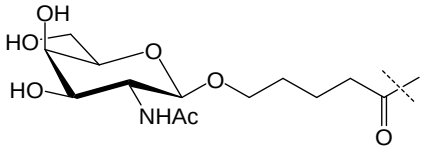
Definiciones

Ser(GN) es una unidad estructural de GalNAc-C4 unida a un resto enlazador derivado de serinol:

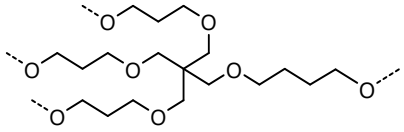


en donde el O--- es el enlace entre el átomo de oxígeno y, p. ej., H, enlace fosfodiéster o enlace fosforotioato.

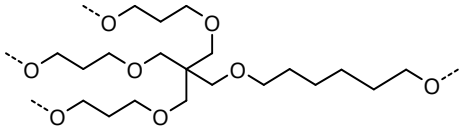
GN es:



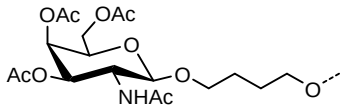
C4XLT es:



C6XLT es:

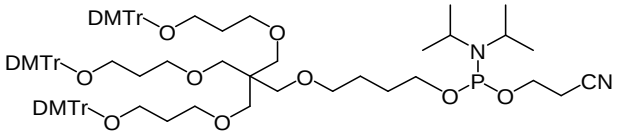


ST23 es:

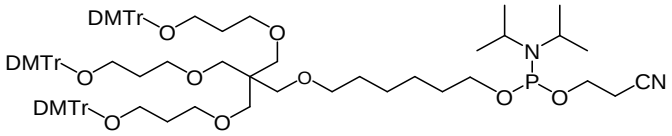


La síntesis de los derivados de fosforamidita de C4XLT (C4XLT-phos), C6XLT (C6XLT-phos) así como también ST23 (ST23-phos) se puede realizar como se describió en el documento WO2017/174657.

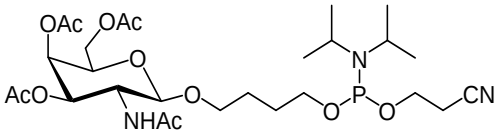
C4XLT-phos:

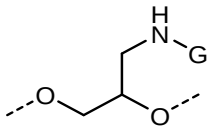
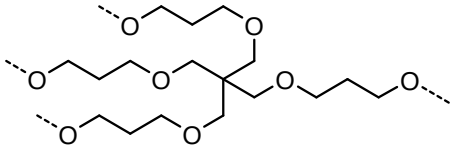
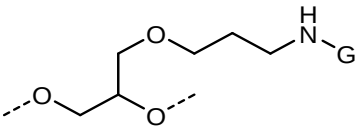
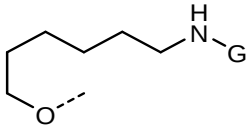
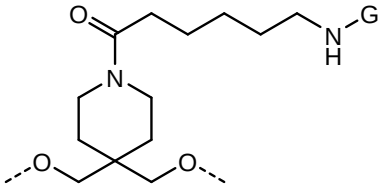
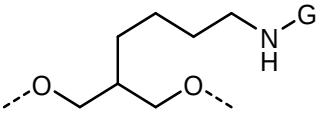


C6XLT-phos:



ST23-phos:



C3Am es: 	ltrb es: 	GlyC3Am es: 
C6Am es: 	Pip Am es: 	C7Am es: 

en donde G = H (antes de la conjugación) o G = GN (después de la conjugación).

<u>Conjugado 1</u>

Cadena antisentido - STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

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 (ps) Ser(GN) 3´

Cadena de sentido - STS16001BL20 (SEQ ID NO: 128)

5´ Ser(GN) (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´

Conjugado 2

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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

Cadena de sentido - STS16001BV1L42 (SEQ ID NO: 130)

Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN)

Conjugado 3

Cadena antisentido - STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

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 (ps) Ser(GN) 3´

Cadena de sentido - STS16001BV1L42 (SEQ ID NO: 130)

5´ Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN) 3´

Conjugado 4

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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

Cadena de sentido - STS16001BV1L75 (SEQ ID NO: 142)

5´ Ser(GN) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA Ser(GN) 3´

Conjugado 5

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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

Cadena de sentido - STS16001BV16L42 (SEQ ID NO: 143)

5´ Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA fA (ps) Ser(GN) 3´

Conjugado 6

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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

Cadena de sentido - STS16001BV20L75 (SEQ ID NO: 144)

5´ Ser(GN) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA fA Ser(GN) 3´

Conjugado 7

Cadena antisentido - (SEQ ID NO: 129)

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

Cadena de sentido - STS16001BV1L94 (SEQ ID NO: 145)

5´ Ser(GN) (ps) Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN) (ps) Ser(GN) 3´

Conjugado 8

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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 de sentido - STS16001V1BL96 (SEQ ID NO: 146)

5‘ C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C7Am(GN) 3´

Conjugado 9

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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 de sentido - STS16001V1BL97 (SEQ ID NO: 147)

5´ GlyC3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN) 3´

Conjugado 10

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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 de sentido (SEQ ID NO: 148)

5´ PipAm(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) PipAm(GN) 3´

Conjugado 11

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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 de sentido - STS16001V1BL88 (SEQ ID NO: 149)

5´ C3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C3Am(GN) 3´

Conjugado 12

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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 de sentido - STS16001V1BL87 (SEQ ID NO: 150)

5´ C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN) 3´

Conjugado 15

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 151)

mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps) mC

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 152)

Ser(GN) (ps) fG (ps) mA (ps) fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA (ps) Ser(GN)

Conjugado 16

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 153)

mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU (ps) fC (ps) mU

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 154)

Ser(GN) (ps) fA (ps) mG (ps) fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)

Conjugado 18

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 155)

mA (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 156)

Ser(GN) (ps) fU (ps) mC (ps) fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (ps) fU (ps) Ser(GN)

Conjugado 19

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 135)

mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 136)

Ser(GN) (ps) fC (ps) mG (ps) fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)

Conjugado de referencia 1

Cadena antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

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

Cadena de sentido – STS16001BL20 (SEQ ID NO: 128)

Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA

Conjugado de referencia 2

Cadena antisentido - STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

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 (ps) Ser(GN)

Cadena de sentido - STS16001BV1 (SEQ ID NO: 157)

fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA

Conjugado de referencia 3 – «Luc»

Cadena antisentido - STS18001A (A0130, SEQ ID NO: 132)

mU (ps) fC (ps) mG fA mA fG mU fA mU fU mC fC mG fC mG fU mA (ps) fC (ps) mG

Cadena de sentido - STS18001BL4 (A0131, SEQ ID NO: 133)

$[(ST23)\ (ps)]_3$ C4XLT (ps) fC mG fU mA fC mG fC mG fG mA fA mU fA mC fU mU fC (ps) mG (ps) fA

Conjugado de referencia 4

Cadena antisentido - STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

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

Cadena de sentido - STS16001BL4 (SEQ ID NO: 134)

5´$[(ST23)\ (ps)]_3$ C4XLT(ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA

Conjugado de referencia 5 – «Ctr»

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 138)

mC (ps) fU (ps) mU fA mC fU mC fU mC fG mC fC mC fA mA fG mC (ps) fG (ps) mA

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 139)

[(ST23) (ps)]3 (C6XLT) (ps) fU mC fG mC fU mU fG mG fG mC fG mA fG mA fG mU fA (ps) mA (ps) fG

Conjugado de referencia 6

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 151)

mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps) mC

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 158)

[ST23 (ps)]3 ltrb (ps) fG mA fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA

Conjugado de referencia 7

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 153)

mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU (ps) fC (ps) mU

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 159)

[ST23 (ps)]3 ltrb (ps) fA mG fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU

Conjugado de referencia 8

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 160)

mU (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 161)

[ST23 (ps)]3 ST41 (ps)fU mC fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (ps) fA

Conjugado de referencia 9

Cadena antisentido (SEQ ID NO: 135)

mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 162)

[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU

Ejemplo 10: Determinación *in vitro* de inactivación de TTR de diversos conjugados con GalNAc de ARNip de TTR

Conjugados 4 a 7

Se siguió el método descrito anteriormente en «Experimentos in vitro» en la sección Método general.

La expresión del gen diana en hepatocitos murinos primarios 24 h después del tratamiento a 0,01 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM y 10 nM con los conjugados de la invención, los Conjugados 4-7, mostró que la expresión del gen diana disminuye a medida que se aumenta la dosis del conjugado en comparación con los controles negativos (ver la columna «ST» y Luc [Conjugado de referencia 3]), como se muestra en la Figura 11. Esto indica que la primera cadena se une al gen diana, disminuyendo así la expresión génica.

Los datos *in vitro* muestran que en el contexto de uno o dos restos enlazadores derivados de serinol proporcionados en los extremos 5’ y 3’ de la cadena de sentido en los Conjugados 4-7, la cantidad de enlaces fosforotioato (PS) entre el nucleótido del extremo y el enlazador, y/o entre los tres nucleótidos del extremo en la cadena de sentido, se puede variar al mismo tiempo que se mantiene la eficacia para la disminución de la expresión del gen diana.

Conjugados 8 a 12 y 19

Se siguió el método descrito anteriormente en «Experimentos in vitro» en la sección Método general.

La expresión del gen diana en hepatocitos murinos primarios 24 h después del tratamiento a 0,01 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM y 10 nM con los conjugados de la invención, los Conjugados 8-12, mostró que la expresión del gen diana disminuye a medida que se aumenta la dosis del conjugado en comparación con los controles negativos (ver la columna «ST» y Luc [Conjugado de referencia 3]), como se muestra en la Figura 12. Esto indica que la primera cadena se une al gen diana, disminuyendo así la expresión génica. En particular, los Conjugados 8, 9, 10 y 11 parecen ser equiparables o mejores que el Conjugado 2 que anteriormente había demostrado ser el conjugado más eficaz a 0,01 nM.

También se demostró que el Conjugado 19 disminuye la expresión del gen diana en comparación con los controles negativos (ver la columna «ST» y Ctr que es un ARNip sin direccionamiento y que se denomina también Conjugado de Referencia 5), como se muestra en la Figura 13. Esto indica que la primera cadena se une al gen diana, disminuyendo así la expresión génica.

Los datos *in vitro* para los Conjugados 8-12 y 19 demuestran que una cantidad de enlazadores que son estructuralmente diversos y que están conjugados en ambos extremos

de la cadena de sentido son eficaces para disminuir la expresión del gen diana. Los Conjugados 8-12 y 19 disminuyen la expresión del gen diana de manera más eficaz que «Luc» que es el Conjugado de referencia 3 (para los Conjugados 8-12), «Ctr» que es el Conjugado de referencia 5 (para el Conjugado 19) y el control sin tratamiento.

Ejemplo 11: curso temporal *in vivo* de Ttr, *Aldh2* y *Tmprss6* en suero en ratones

Conjugados 15 a 18

Se siguió el método descrito anteriormente en «Experimentos *in vivo*» en la sección Método general.

Los resultados del curso temporal de *Aldh2* en suero en cohortes de ratones c57BL/6 de n=6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg de los Conjugados 15 y 16, Conjugados de referencia 6 y 7 e individuos tratados de forma simulada (PBS) se muestran en las Figuras 14 y 15. Como indican los datos de las Figuras 14 y 15, los conjugados de la invención son particularmente eficaces para reducir la expresión del gen diana en comparación con el control negativo (PBS) y los Conjugados de referencia 6 y 7, respectivamente.

Los resultados del curso temporal de *Tmprss6* en suero en cohortes de ratones c57BL/6 de n=6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg del Conjugado 18, Conjugado de referencia 8 e individuos tratados de forma simulada (PBS) se muestran en la Figura 16. Como indican los datos de la Figura 16, los conjugados de la invención son particularmente eficaces para reducir la expresión del gen diana en comparación con el control negativo (PBS) y el Conjugado de referencia 8.

En general, los datos *in vivo* demuestran que una variedad de enlazadores de ejemplo que se conjugan en ambos extremos de la segunda cadena son eficaces para disminuir la expresión del gen diana *in vivo*. El posicionamiento del enlazador mejora la potencia *in vivo* de los conjugados, en comparación con un control enlazador GalNAc triantenario en el extremo 5’ de la segunda cadena (Conjugados de referencia 6, 7 y 8).

Ejemplo 12: *Estudios de estabilidad en suero*

Se siguió el método descrito anteriormente en «Ensayo de estabilidad de tritosomas» en la sección Método general.

La Figura 17 muestra los resultados de los estudios de estabilidad en suero con respecto a los Conjugados 2, 4, 5, 6 y 7. La Figura 18 muestra la estabilidad en suero de los Conjugados 2, 8, 9, 10, 11 y 12.

Todos los conjugados de la invención que se analizaron son más estables en suero en comparación con el control.

Cada uno de los conjugados analizados contiene una unidad enlazadora GalNac en el extremo 5’ y otra en el extremo 3’ de la segunda cadena. Los ARNip se modifican con 2’-OMe/2’-F alternantes y cada uno contiene dos enlaces internucleótidos fosforotioato (PS) en sus dos enlaces internucleótidos de los extremos 5’ y 3’, a menos que se establezca de otra manera.

En el Conjugado 4, las unidades de serinol-GalNAc se unen mediante un enlace fosfodiéster. En el Conjugado 5, las unidades de serinol-GalNAc se conjugan mediante PS, mientras que todos los enlaces internucleótidos en la segunda cadena son fosfodiésteres. En el Conjugado 6, la segunda cadena no contiene PS. En el Conjugado 7, se unen dos unidades serinol-GalNac a cada extremo de la segunda cadena y entre sí mediante enlaces PS en los extremos respectivos. En el Conjugado 8, se aplicaron un modificador C6-amino en el extremo 5’ y un modificador C7-amino en el extremo 3’ de la segunda cadena para unión de ligandos. Se usaron modificadores Gly-C3-amino en el Conjugado 9, modificadores piperidil-amino en el Conjugado 10, modificadores C3-amino en el Conjugado 11 y unidades serinol-GalNAc en el Conjugado 2 como enlazadores para conjugación con ambos extremos de la segunda cadena. En el Conjugado 2, ambos internucleótidos del extremo así como el enlace nucleótido-serinol son PS. En el Conjugado 12, se aplicaron un modificador C6-amino en el extremo 5’ y un modificador GlyC3-amino en el extremo 3’ de la segunda cadena para unión de ligandos. «st» indica una muestra sin tratamiento con respecto a la cual se normalizaron las otras muestras. «Luc» indica una Luciferasa dirigida a ARNip (Conjugado de referencia 3), la cual se usó como control sin direccionamiento y no reduce los niveles de ARNm diana.

Los datos muestran que en el contexto de un resto enlazador derivado de serinol proporcionado en los extremos 5’ y 3’ de la cadena de sentido, la cantidad de enlaces fosforotioato (PS) entre el nucleótido del extremo y el enlazador, y/o entre los tres nucleótidos del extremo en la cadena de sentido, se puede variar al mismo tiempo que se mantiene la estabilidad en suero.

Ejemplo 13

Se consiguieron hepatocitos de cinomolgo (Lote CY367) y humanos (Lote Hu1823) primarios y medios de Life Technologies. Como describió el fabricante, los hepatocitos primarios se descongelaron y se colocaron en placas con medio de colocación que consiste de medio E de Williams (Life Technologies), complementado con suero bovino fetal al 5 %, 1 µM de dexametasona en DMSO (concentración final de DMSO = 0,01 %) y 3,6 % v/v de Coctél A de colocación en placas/descongelamiento (Thermo Fisher Scientific, CM3000).

Se sembraron hepatocitos primarios humanos en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno I (Life Technologies) a una densidad de 30 000 células por pocillo. Se sembraron hepatocitos de cinomolgo a una densidad de 45 000 células por pocillo. El Conjugado 21 y un ARNip conjugado con GalNAc de control se diulyeron en serie 5 veces a un intervalo de concentración de 0,006 – 100 nM y se agregaron inmediatamente después de colocarse en placas con medio de colocación. Las placas se incubaron a 37 ºC en una atmósfera de CO_2 al 5% durante 24 horas. Posteriormente, las células se lisaron y el ARN se aisló usando el método descrito a continuación.

Secuencias del Conjugado 21

Cadena antisentido – Conjugado 21 (SEQ ID NO: 165)

5´ mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG 3´

Cadena de sentido - STS16001BL20 (SEQ ID NO: 164)

5´ [ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3´

El ARN total se extrajo usando el kit de 96 pocillos de InviTrap HTS (Stratec Molecular GmbH, Berlín, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con los siguientes cambios al protocolo: Después la última etapa de lavado, las placas se centrifugaron a 6000 rpm durante veinte minutos. Posteriormente, la placa de unión a ARN se ubicó sobre una placa de elución y el ARN se eluyó mediante de dos rondas de adición de 30 µl de amortiguador de elución e incubación durante dos minutos a temperatura ambiente, seguido por un minuto de centrifugación a 1000 rpm. Una etapa de elución final se realizó al centrifugar a 1700 g (4000 rpm) durante 3 minutos el ARN se almacenó a -80 °C.

Se usaron 10 µl de solución de ARN para el análisis de expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) realizado con

conjuntos/secuencias de amplicón para *LPA*, *ACTB* (Eurogentec Deutschland GmbH, Colonia, Alemania), *APOB* y *PLG* (BioTez GmbH, Berlín, Alemania).

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo con un ABI StepOne Plus (Applied Biosystems, parte de Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) mediante el uso de protocolos convencionales para RT-PCR (48 °C 30 min, 95 °C 10 min, 40 ciclos a 95 °C 15 s seguido por 60 °C 1 min).

En hepatocitos primarios, se realizaron análisis de *LPA* y *PLG* en ensayos *singleplex* (cebadores: 300 nM, sonda: 100 nM). Se ejecutaron *APOB* (200 nM) y *ACTB* (300 nM) en un ensayo *multiplex* agregando 100 nM de cada sonda a la mezcla estándar.

Los datos se calcularon al usar el método CT comparativo también conocido como el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001 y Schmittgen y Livak, 2008). Aquí la cantidad de ARNm de *APOB*, *LPA* o *PLG* normalizado con respecto al *ACTB* de referencia endógena con respecto a un calibrador (control sin tratamiento) se calcula mediante la forma

$$\text{Cambio múltiplo} = 2^{-\Delta\Delta Ct}.$$

A menos que se establezca otra cosa, todos los valores presentados en el ejemplo se refieren la media ± SD. Los valores de IC_{50} se calculan usando una curva de respuesta a la dosis del parámetro 4 sigmoide en GraphPad Prism 7.

La Figura 19 muestra la inactivación del ARNm de *LPA* por parte del Conjugado 21 mediante la absorción medida por receptores en hepatocitos humanos primarios 24 horas después del tratamiento de ARNip (IC_{50} = 3,6nM). Los niveles de expresión del ARNm de *LPA* se normalizaron con respecto a *ACTB* y con respecto a las células tratadas con un ARNip de no direccionamiento de control medido mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media ± SD de un único experimento. La Figura 20 muestra la inactivación del ARNm de *LPA* por parte del Conjugado 21 mediante la absorción medida por receptores en hepatocitos de cinomolgo primarios 24 horas después del tratamiento de ARNip (IC_{50} = 0,7 nM). Los niveles de expresión del ARNm de *LPA* se normalizaron con respecto a *ACTB* y con respecto a las células tratadas con un ARNip de no direccionamiento de control medido mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media ± SD de un único experimento.

La Figura 21 muestra la inactivación del ARNm de *APOB* por parte del Conjugado 21 mediante la absorción medida por receptores en hepatocitos humanos primarios 24 horas después del tratamiento de ARNip. Los niveles de expresión del ARNm de *APOB* se

normalizaron con respecto a *ACTB* y con respecto a las células tratadas con un ARNip de no direccionamiento de control medido mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media ± SD de un único experimento.

La Figura 22 muestra la inactivación del ARNm de *PLG* por parte del Conjugado 21 mediante la absorción medida por receptores en hepatocitos humanos primarios 24 horas después del tratamiento de ARNip. Los niveles de expresión del ARNm de *PLG* se normalizaron con respecto a *ACTB* y con respecto a las células tratadas con un ARNip de no direccionamiento de control medido mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media ± SD de un único experimento.

El Conjugado 21 logra niveles elevados inhibición de ARNm de *LPA* sin afectar los niveles de ARNm de *APOB* y *PLG*.

Ejemplo 14

Para probar la eficacia del conjugado 21 *in vivo*, se usaron monos cinomolgos macho para realizar un estudio farmacodinámico. Los animales se agruparon en 4 grupos con 3 animales por grupo. Antes de la dosificación, el suero se preparó para establecer el nivel de Lp(a) de referencia para cada animal. El día 1, el conjugado 21 se formuló en 0,9 % de solución salina y cada animal recibió una única dosis del conjugado 21 a dosis de 0,1, 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

Las muestras en serie se tomaron durante 29 día y los niveles de Lp(a) se midieron mediante ELISA (Mercodia, Catálogo n.º 10-1106-01 Lote: 27736; Uppsala, Suecia). Todos los valores se normalizaron con respecto a los valores de referencia para cada animal individual tomados antes de la dosificación y presentados como un porcentaje del nivel inicial (Figura 23). Las dosis de 1,0 y 3,0 mg/kg mostraron una reducción notable marcada de los niveles de Lp(a) en suero (69,4 y 77,3 % después de 29 días respectivamente). El efecto dependiente de la dosis da como resultado una dosis de ED_{50} de 0,56 mg/kg (Figura 24). Estos datos indican que una reducción significativa y sostenida en Lp(a) en suero se logran mediante una única dosis del conjugado 21. En función a estos datos, se espera que la dosificación sea poco frecuente, no más frecuentemente que una vez cada dos meses.

Enunciados de la invención

Los siguientes son los enunciados de la invención:

1. Un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región de dúplex que comprende al menos una parte de una primera cadena

y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 9, 5, 1, 3, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43.

2. El ácido nucleico del enunciado 1, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 y, opcionalmente, en donde dicha segunda cadena comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10; o en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 y, opcionalmente, en donde dicha segunda cadena comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.

3. Un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región de dúplex que comprende al menos una parte de una primera cadena y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 9 o 5.

4. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados que preceden, en donde dicha primera cadena y/o dicha segunda cadena tienen cada una 17-35 nucleótidos de longitud.

5. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados que preceden, en donde la al menos una región de dúplex consiste en 17-25, preferentemente 19-25, pares de bases de nucleótidos consecutivos.

6. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados que preceden, en donde el ácido nucleico:

   a) tiene el extremo romo en ambos extremos o
   b) tiene un excedente en un extremo y un extremo romo en el otro o
   c) tiene un excedente en ambos extremos.

7. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados que preceden, en donde uno o más nucleótidos de la primera y/o la segunda cadena se modifican para formar nucleótidos modificados.

8. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados que preceden, en donde el ácido nucleico comprende un enlace fosforotioato entre el uno, dos o tres nucleótidos 3' y/o nucleótidos 5' del extremo de uno o de ambos extremos de la primera y/o la segunda cadenas.

9. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados que preceden, en donde el ácido nucleico se conjuga con un ligando.

10. El ácido nucleico del enunciado 9, en donde el ligando comprende (i) uno o más restos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) o derivados de estos y (ii) un enlazador, en donde el enlazador conjuga el al menos un resto de GalNac o derivado de este con el ácido nucleico.

11. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados 9-10, en donde el ácido nucleico se conjuga con un ligando que comprende un compuesto de fórmula (I):

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

en donde:

S representa un sacárido, preferentemente en donde el sacárido es N-acetilgalactosamina;

X^1 representa alquileno C_3-C_6 o $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$ en donde m es 1, 2 o 3;

P es un fosfato o un fosfato modificado, preferentemente un tiofosfato;

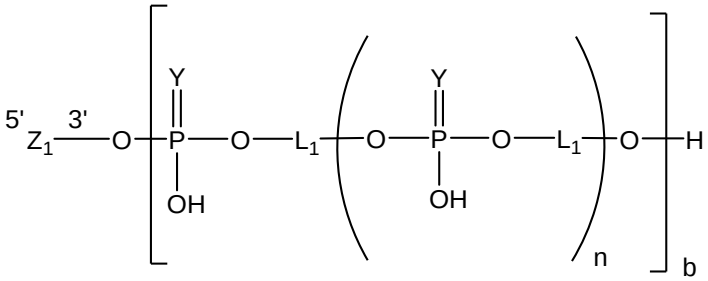
X^2 es alquileno o un éter de alquileno de la fórmula $(-CH_2)_n-O-CH_2-$ en donde n = 1-6;

A es una unidad de ramificación;

X^3 representa una unidad de puenteo;

en donde un ácido nucleico según se define en cualquiera de los enunciados 1 a 8 se conjuga con X^3 mediante un fosfato o un fosfato modificado, preferentemente un tiofosfato.

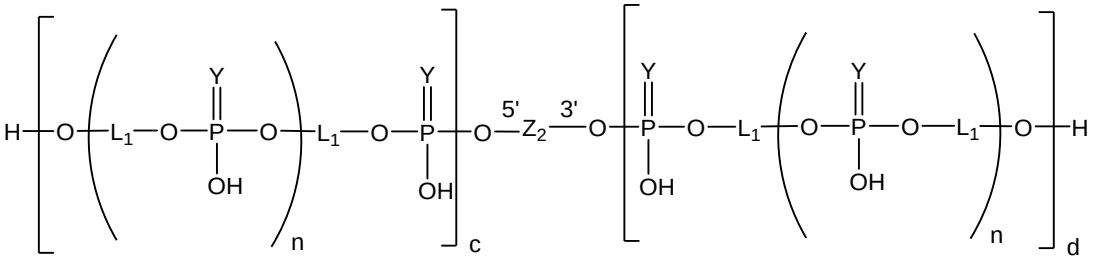
12. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados 9-10, en donde la primera cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (X):



(X)

en donde b es 0 o 1; y

la segunda cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (XI):



(XI);

en donde:

c y d son independientemente 0 o 1;

Z_1 y Z_2 son las partes de ARN de la primera y segunda cadenas de ARN, respectivamente;

Y es O o S;

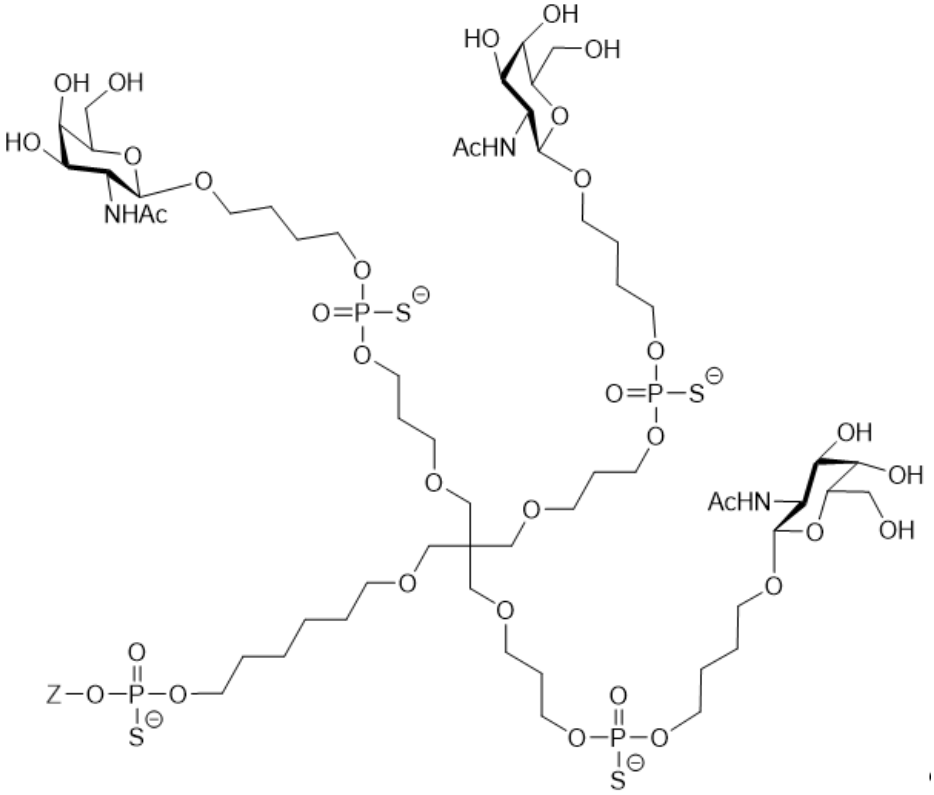
n es 0, 1, 2 o 3; y

L_1 es un enlazador al cual está unido un ligando; y

en donde b + c + d es 2 o 3.

13. Un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región de dúplex que comprende al menos una parte de una primera cadena y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende, y preferentemente consiste en, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 y, opcionalmente, en donde dicha segunda cadena comprende, y preferentemente consiste en, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10.

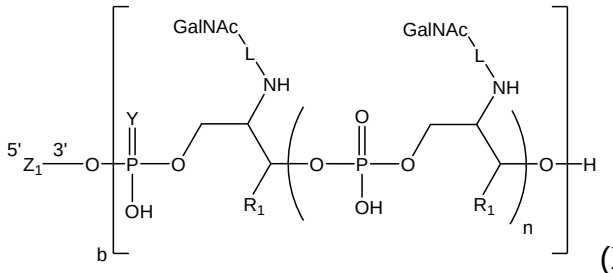
14. El ácido nucleico del enunciado 13, en donde el ácido nucleico se conjuga con un ligando y tiene la siguiente estructura



en donde Z es un ácido nucleico de acuerdo con el enunciado 13 y se conjuga preferentemente al extremo 5’ de la segunda cadena.

15. El ácido nucleico del enunciado 14, en donde el ácido nucleico comprende dos enlaces fosforotioato entre cada uno de los tres nucleótidos del extremo 3’ y entre cada uno de los tres nucleótidos del extremo 5’ en la primera cadena y dos enlaces fosforotioato entre los tres nucleótidos del extremo del extremo 3’ de la segunda cadena y en donde el ligando se conjuga con el extremo 5’ de la segunda cadena.

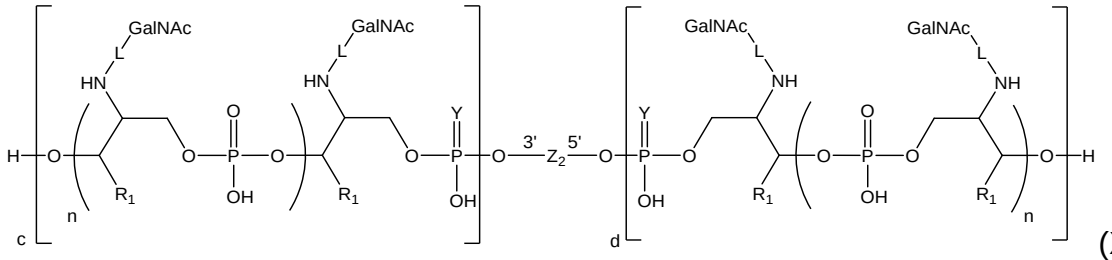
16. El ácido nucleico del enunciado 13, en donde el ácido nucleico se conjuga con un ligando, en donde la primera cadena de ARN es un compuesto de fórmula (XV):



(XV)

en donde b es 0 o 1; y

la segunda cadena de ARN es un compuesto de la fórmula (XVI):



(XVI);

en donde c y d son independientemente 0 o 1;

en donde:

Z_1 y Z_2 son las partes de ARN de la primera y segunda cadenas de ARN, respectivamente;

Y es O o S;

R_1 es H o metilo;

n es 0, 1, 2 o 3; y

L es igual o diferente en las fórmulas (XV) y (XVI) y se selecciona del grupo que consiste en:

$-(CH_2)_q$, en donde q = 2-12;

$-(CH_2)_r$-C(O)-, en donde r = 2-12;

$-(CH_2-CH_2-O)_s-CH_2$-C(O)-, en donde s = 1-5;

$-(CH_2)_t$-CO-NH-$(CH_2)_t$-NH-C(O)-, en donde t es independientemente 1-5;

$-(CH_2)_u$-CO-NH-$(CH_2)_u$-C(O)-, en donde u es independientemente 1-5; y

$-(CH_2)_v$-NH-C(O)-, en donde v es 2-12; y

en donde el C(O) del extremo, si se encuentra presente, está unido al grupo NH;

y en donde b + c + d es 2 o 3.

17. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados 13-16, que comprende una secuencia y modificaciones como se muestran a continuación:

SEQ ID NO:	**secuencia**	**modificaciones**
9	5’ AUAACUCUGUCCAUUACCG 3	6162717181736152738
10	5’ CGGUAAUGGACAGAGUUAU 3’	3845261846364645161

en donde las modificaciones específicas se ilustran mediante los números
1=2´F-dU,
2=2‘F-dA,
3=2´F-dC,
4=2´F-dG,
5=2'-OMe-rU;
6=2'-OMe-rA;
7=2'-OMe-rC;
8=2'-OMe-rG.

18. El ácido nucleico de cualquiera de los enunciados 13-16, en donde los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 del extremo 5’ de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro y los nucleótidos en la segunda cadena que corresponden a la posición 11 o 13 o 11 y 13 o 11-13 de la primera cadena se modifican con una modificación 2’ fluoro.

19. Una composición que comprende un ácido nucleico de cualquiera de los enunciados 1-18 y opcionalmente un vehículo de administración y/o un excipiente fisiológicamente aceptable y/o un portador y/o un diluyente y/o un amortiguador y/o un conservante, para su uso como un medicamento, preferentemente para prevenir o tratar o reducir el riesgo de una enfermedad o patología, en donde la enfermedad o patología preferentemente es una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular preferentemente es un accidente cerebrovascular, aterosclerosis, trombosis, una cardiopatía coronaria o estenosis de la aorta y/o cualquier otra enfermedad o patología asociada con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a).

20. Una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de cualquiera de los enunciados 1-18 y que además comprende un vehículo de administración, preferentemente liposomas y/o un excipiente fisiológicamente aceptable y/o un portador y/o un diluyente.

21. El uso de un ácido nucleico de cualquiera de los enunciados 1-18 o una composición farmacéutica del enunciado 20 para prevenir o tratar o reducir el riesgo de una enfermedad o patología, en donde la enfermedad o patología preferentemente es una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular preferentemente es un accidente cerebrovascular, aterosclerosis, trombosis, una cardiopatía coronaria o estenosis de la aorta y cualquier otra enfermedad o patología asociada con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a).

22. Un método para prevenir o tratar una enfermedad, trastorno o síndrome que comprende administrar una composición que comprende un ácido nucleico de cualquiera de los enunciados 1-18 o una composición de acuerdo con los enunciados 19-20 a un individuo que necesita tratamiento, preferentemente en donde el ácido nucleico o composición se administra al sujeto de manera subcutánea, intravenosa o mediante el uso de cualquier otra vía de aplicación tal como oral, rectal o intraperitoneal.

Tabla de resumen de secuencias

SEQ ID NO	**Nombre**	**Secuencia (5’-3’)**	**Contraparte de secuencia no modificada (5'-3')**
1	LPA-1014 primera cadena	UCGUAUAACAAUAAGGGGC	UCGUAUAACAAUAAGGGGGC
2	LPA-1014 segunda cadena	GCCCCUUAUUGUUAUACGA	GCCCCUUAUUGUUAUACGA
3	LPA-1024 primera cadena	GAUAACUCUGUCCAUUACC	GAUAACUCUGUCCAUUACC
4	LPA-1024 segunda	GGUAAUGGACAGAGUUAUC	GGUAAUGGACAGAGUUAUC

	cadena		
5	LPA-1038 primera cadena	AUAACUCUGUCCAUUACCA	AUAACUCUGUCCAUUACCA
6	LPA-1038 segunda cadena	UGGUAAUGGACAGAGUUAU	UGGUAAUGGACAGAGUUAU
7	LPA-1040 primera cadena	UAACUCUGUCCAUUACCGU	UAACUCUGUCCAUUACCGU
8	LPA-1040 segunda cadena	ACGGUAAUGGACAGAGUUA	ACGGUAAUGGACAGAGUUA
9	LPA-1041 primera cadena	AUAACUCUGUCCAUUACCG	AUAACUCUGUCCAUUACCG
10	LPA-1041 segunda cadena	CGGUAAUGGACAGAGUUAU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
11	LPA-1055 primera cadena	AGAAUGUGCCUCGAUAACU	AGAAUGUGCCUCGAUAACU
12	LPA-1055 segunda cadena	AGUUAUCGAGGCACAUUCU	AGUUAUCGAGGCACAUUCU
13	LPA-1057 primera cadena	AUAACUCUGUCCAUCACCA	AUAACUCUGUCCAUCACCA
14	LPA-1057 segunda cadena	UGGUGAUGGACAGAGUUAU	UGGUGAUGGACAGAGUUAU
15	LPA-1058 primera cadena	AUAACUCUGUCCAUCACCU	AUAACUCUGUCCAUCACCU
16	LPA-1058 segunda	AGGUGAUGGACAGAGUUAU	AGGUGAUGGACAGAGUUAU

	cadena		
17	LPA-1061 primera cadena	UAACUCUGUCCAUUACCAU	UAACUCUGUCCAUUACCAU
18	LPA-1061 segunda cadena	AUGGUAAUGGACAGAGUUA	AUGGUAAUGGACAGAGUUA
19	LPA-1086 primera cadena	AUGUGCCUUGAUAACUCUG	AUGUGCCUUGAUAACUCUG
20	LPA-1086 segunda cadena	CAGAGUUAUCAAGGCACAU	CAGAGUUAUCAAGGCACAU
21	LPA-1099 primera cadena	AGUUGGUGCUGCUUCAGAA	AGUUGGUGCUGCUUCAGAA
22	LPA-1099 segunda cadena	UUCUGAAGCAGCACCAACU	UUCUGAAGCAGCACCAACU
23	LPA-1102 primera cadena	AAUAAGGGGCUGCCACAGG	AAUAAGGGGCUGCCACAGG
24	LPA-1102 segunda cadena	CCUGUGGCAGCCCCUUAUU	CCUGUGGCAGCCCCUUAUU
25	LPA-1116 primera cadena	UAACUCUGUCCAUCACCAU	UAACUCUGUCCAUCACCAU
26	LPA-1116 segunda cadena	AUGGUGAUGGACAGAGUUA	AUGGUGAUGGACAGAGUUA
27	LPA-1127 primera cadena	AUGAGCCUCGAUAACUCUG	AUGAGCCUCGAUAACUCUG
28	LPA-1127 segunda	CAGAGUUAUCGAGGCUCAU	CAGAGUUAUCGAGGCUCAU

	cadena		
29	LPA-1128 primera cadena	AAUGAGCCUCGAUAACUCU	AAUGAGCCUCGAUAACUCU
30	LPA-1128 segunda cadena	AGAGUUAUCGAGGCUCAUU	AGAGUUAUCGAGGCUCAUU
31	LPA-1141 primera cadena	AAUGCUUCCAGGACAUUUC	AAUGCUUCCAGGACAUUUC
32	LPA-1141 segunda cadena	GAAAUGUCCUGGAAGCAUU	GAAAUGUCCUGGAAGCAUU
33	LPA-1151 primera cadena	ACAGUGGUGGAGAAUGUGC	ACAGUGGUGGAGAAUGUGC
34	LPA-1151 segunda cadena	GCACAUUCUCCACCACUGU	GCACAUUCUCCACCACUGU
35	LPA-1171 primera cadena	GUAUGUGCCUCGAUAACUC	GUAUGUGCCUCGAUAACUC
36	LPA-1171 segunda cadena	GAGUUAUCGAGGCACAUAC	GAGUUAUCGAGGCACAUAC
37	LPA-1177 primera cadena	UCGAUAACUCUGUCCAUCA	UCGAUAACUCUGUCCAUCA
38	LPA-1177 segunda cadena	UGAUGGACAGAGUUAUCGA	UGAUGGACAGAGUUAUCGA
39	LPA-1189 primera cadena	UGUCACUGGACAUUGUGUC	UGUCACUGGACAUUGUGUC
40	LPA-1189 segunda	GACACAAUGUCCAGUGACA	GACACAAUGUCCAGUGACA

	cadena		
41	LPA-1244 primera cadena	CUGGGAUCCAUGGUGUAAC	CUGGGAUCCAUGGUGUAAC
42	LPA-1244 segunda cadena	GUUACACCAUGGAUCCCAG	GUUACACCAUGGAUCCCAG
43	LPA-1248 primera cadena	AGAUGACCAAGCUUGGCAG	AGAUGACCAAGCUUGGCAG
44	LPA-1248 segunda cadena	CUGCCAAGCUUGGUCAUCU	CUGCCAAGCUUGGUCAUCU
45	LPA: (superior) humano	AAGTGTCCTTGCGACGTCC	AAGTGTCCTTGCGACGTCC
46	LPA: (inferior) humano	CCTGGACTGTGGGGCTTT	CCTGGACTGTGGGGCTTT
47	LPA: (sonda) humano	CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGAGC	CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGAGC
48	LPA (superior) de cinomolgo	GTGTCCTCGCAACGTCCA	GTGTCCTCGCAACGTCCA
49	LPA (inferior) de cinomolgo	GACCCCGGGGCTTTG	GACCCCGGGGCTTTG
50	LPA (inferior) de cinomolgo	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG
51	APOB (superior) humano	TCATTCCTTCCCCAAAGAGACC	TCATTCCTTCCCCAAAGAGACC
52	APOB (inferior) humano	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG
53	APOB (sonda) humano	CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA	CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA
54	beta-Actina	GCATGGGTCAGAAGGAT	GCATGGGTCAGAAGGATT

	(superior) humana	TCCTAT	CCTAT
55	beta-Actina (inferior) humana	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT
56	beta-Actina (sonda) humana	TCGAGCACGGCATCGTCACCAA	TCGAGCACGGCATCGTCACCAA
57	beta-Actina (superior) de cinomolgo	AAGGCCAACCGCGAGAAG	AAGGCCAACCGCGAGAAG
58	beta-Actina (inferior) de cinomolgo	AGAGGCGTACAGGGACAGCA	AGAGGCGTACAGGGACAGCA
59	beta-Actina (sonda) de cinomolgo	TGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTAC	TGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTAC
60	PPIB (superior) humano	AGATGTAGGCCGGGTGATCTTT	AGATGTAGGCCGGGTGATCTTT
61	PPIB (inferior) humano	GTAGCCAAATCCTTTCTCTCCTGT	GTAGCCAAATCCTTTCTCTCCTGT
62	PPIB (sonda) humano	TGTTCCAAAAACAGTGGATAATTTTGTGGCC	TGTTCCAAAAACAGTGGATAATTTTGTGGCC
63	LPA: (superior) humano	AAGTGTCCTTGCGACGTCC	AAGTGTCCTTGCGACGTCC
64	LPA: (inferior) humano	CCTGGACTGTGGGGCTTT	CCTGGACTGTGGGGCTTT
65	LPA: (sonda) humano	CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGAGC	CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGAGC
66	LPA (superior) de cinomolgo	GTGTCCTCGCAACGTCCA	GTGTCCTCGCAACGTCCA

67	LPA (inferior) de cinomolgo	GACCCCGGGGCTTTG	GACCCCGGGGCTTTG
68	LPA (sonda) de cinomolgo	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG
69	APOB (superior) humano	TCATTCCTTCCCCAAAGAGACC	TCATTCCTTCCCCAAAGAGACC
70	APOB (inferior) humano	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG
71	APOB (sonda) humano	CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA	CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA
72	beta-Actina (superior) humana	GCATGGGTCAGAAGGATTCCTAT	GCATGGGTCAGAAGGATTCCTAT
73	beta-Actina (inferior) humana	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT
74	beta-Actina (sonda) humana	TCGAGCACGGCATCGTCACCAA	TCGAGCACGGCATCGTCACCAA
75	SEQ ID modificada NO: 1	5381616272616284847	UCGUAUAACAAUAAGGGGC
76	SEQ ID modificada NO: 2	4737351615451616382	GCCCCUUAUUGUUAUACGA
77	SEQ ID modificada NO: 3	8252635354537251637	GAUAACUCUGUCCAUUACC
78	SEQ ID modificada NO: 4	4816254827282815253	GGUAAUGGACAGAGUUAUC

79	SEQ ID modificada NO: 5	6162717181736152736	AUAACUCUGUCCAUUACCA
80	SEQ ID modificada NO: 6	1845261846364645161	UGGUAAUGGACAGAGUUAU
81	SEQ ID modificada NO: 7	5263535453725163745	UAACUCUGUCCAUUACCGU
82	SEQ ID modificada NO: 8	2748162548272828152	ACGGUAAUGGACAGAGUUA
83	SEQ ID modificada NO: 9	6162717181736152738	AUAACUCUGUCCAUUACCG
84	SEQ ID modificada NO: 10	3845261846364645161	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
85	SEQ ID modificada NO: 11	6462545473538252635	AGAAUGUGCCUCGAUAACU
86	SEQ ID modificada NO: 12	2815253828472725171	AGUUAUCGAGGCACAUUCU
87	SEQ ID modificada NO: 13	6162717181736172736	AUAACUCUGUCCAUCACCA
88	SEQ ID modificada NO: 14	1845461846364645161	UGGUGAUGGACAGAGUUAU

89	SEQ ID modificada NO: 15	6162717181736172735	AUAACUCUGUCCAUCACCU
90	SEQ ID modificada NO: 16	2845461846364645161	AGGUGAUGGACAGAGUUAU
91	SEQ ID modificada NO: 17	5263535453725163725	UAACUCUGUCCAUUACCAU
92	SEQ ID modificada NO: 18	2548162548272828152	AUGGUAAUGGACAGAGUUA
93	SEQ ID modificada NO: 19	6181837154616271718	AUGUGCCUUGAUAACUCUG
94	SEQ ID modificada NO: 20	3646451617264836361	CAGAGUUAUCAAGGCACAU
95	SEQ ID modificada NO: 21	6451845471835172826	AGUUGGUGCUGCUUCAGAA
96	SEQ ID modificada NO: 22	1535462836472736271	UUCUGAAGCAGCACCAACU
97	SEQ ID modificada NO: 23	6252648483547363648	AAUAAGGGGCUGCCACAGG
98	SEQ ID modificada NO: 24	3718184728373715251	CCUGUGGCAGCCCCUUAUU

99	SEQ ID modificada NO: 25	5263535453725363725	UAACUCUGUCCAUCACCAU
100	SEQ ID modificada NO: 26	2548182548272828152	AUGGUGAUGGACAGAGUUA
101	SEQ ID modificada NO: 27	6182837174616271718	AUGAGCCUCGAUAACUCUG
102	SEQ ID modificada NO: 28	3646451617464835361	CAGAGUUAUCGAGGCUCAU
103	SEQ ID modificada NO: 29	6254647353825263535	AAUGAGCCUCGAUAACUCU
104	SEQ ID modificada NO: 30	2828152538284717251	AGAGUUAUCGAGGCUCAUU
105	SEQ ID modificada NO: 31	6254715372846361517	AAUGCUUCCAGGACAUUUC
106	SEQ ID modificada NO: 32	4626181735482647251	GAAAUGUCCUGGAAGCAUU
107	SEQ ID modificada NO: 33	6364548184646254547	ACAGUGGUGGAGAAUGUGC
108	SEQ ID modificada NO: 34	4727251717363727181	GCACAUUCUCCACCACUGU

109	SEQ ID modificada NO: 35	8161818371746162717	GUAUGUGCCUCGAUAACUC
110	SEQ ID modificada NO: 36	4645161746483636163	GAGUUAUCGAGGCACAUAC
111	SEQ ID modificada NO: 37	5382526353545372536	UCGAUAACUCUGUCCAUCA
112	SEQ ID modificada NO: 38	1825482728281525382	UGAUGGACAGAGUUAUCGA
113	SEQ ID modificada NO: 39	5453635482725181817	UGUCACUGGACAUUGUGUC
114	SEQ ID modificada NO: 40	4636362545372818272	GACACAAUGUCCAGUGACA
115	SEQ ID modificada NO: 41	7184825372548181627	CUGGGAUCCAUGGUGUAAC
116	SEQ ID modificada NO: 42	4516363725482537364	GUUACACCAUGGAUCCCAG
117	SEQ ID modificada NO: 43	6461827362835184728	AGAUGACCAAGCUUGGCAG
118	SEQ ID modificada NO: 44	3547362835184536171	CUGCCAAGCUUGGUCAUCU

119	GalNAc-LPA-1038-L1 primera cadena	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA	AUAACUCUGUCCAUUACCA
120	GalNAc-LPA-1038-L1 segunda cadena	[ST23 (ps)]3 triple largo (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	UGGUAAUGGACAGAGUUAU
121	GalNAc-LPA-1038-L6 primera cadena	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA	AUAACUCUGUCCAUUACCA
122	GalNAc-LPA-1038-L6 segunda cadena	[ST23 (ps)]3 ST43 (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	UGGUAAUGGACAGAGUUAU
123	GalNAc-LPA-1041-L1 primera cadena	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG	AUAACUCUGUCCAUUACCG

124	GalNAc-LPA-1041-L1 segunda cadena	[ST23 (ps)]3 triple largo (ps) FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
125	GalNAc-LPA-1041-L6 primera cadena	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG	AUAACUCUGUCCAUUACCG
126	GalNAc-LPA-1041-L6 segunda cadena	[ST23 (ps)]3 ST43 (ps) FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
127	STS16001AL33	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 (ps) Ser(GN)	UUAUAGAGCAAGAACACUGUU
128	STS16001BL20	Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
129	STS16001A	mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG	UUAUAGAGCAAGAACACUGUU

		(ps) fU (ps) mU	
130	STS16001BV1L42	Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
131	STS16001V1B	fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
132	STS18001A	mU (ps) fC (ps) mG fA mA fG mU fA mU fU mC fC mG fC mG fU mA (ps) fC (ps) mG	UCGAAGUAUUCCGCGUACG
133	STS18001BL4	[(ST23) (ps)]$_3$ C4XLT (ps) fC mG fU mA fC mG fC mG fG mA fA mU fA mC fU mU fC (ps) mG (ps) fA	CGUACGCGGAAUACUUCGA
134	STS16001BL4	[(ST23) (ps)]3 C4XLT(ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
135	X0373A	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG	AUAACUCUGUCCAUUACCG
136	X0373B	Ser(GN) (ps) fC (ps) mG (ps) fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG	CGGUAAUGGACAGAGUUAU

		mU fU (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)	
137	STS2041B	ST23 (ps) ST23 (ps) ST23 (ps) C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
138	X0125A	mC (ps) fU (ps) mU fA mC fU mC fU mC fG mC fC mC fA mA fG mC (ps) fG (ps) mA	CUUACUCUCGCCCAAGCGA
139	X0125B	$[(ST23)\ (ps)]_3$ (C6XLT) (ps) fU mC fG mC fU mU fG mG fG mC fG mA fG mA fG mU fA (ps) mA (ps) fG	UCGCUUGGGCGAGAGUAAG
140	Sonda basada en la SEQ ID NO: 50	BHQ1-TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG-FAM	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG
141	Sonda basada en la SEQ ID NO: 56	BHQ1-TCGAGCACGGCATCGTCACCAA-VIC	TCGAGCACGGCATCGTCACCAA
142	STS16001BV1L75	Ser(GN) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
143	STS16001BV16L42	Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA fA (ps) Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA

144	STS16001BV20L75	Ser(GN) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA fA Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
145	STS16001BV1L94	Ser(GN) (ps) Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN) (ps) Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
146	STS16001V1BL96	C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C7Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
147	STS16001V1BL97	GlyC3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
148	Segunda cadena del Conjugado 10	PipAm(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) PipAm(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
149	STS16001V1BL88	C3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C3Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA

150	STS16001V1BL87	C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
151	Cadena antisentido del Conjugado 15	mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps) mC	UCUUCUUAAACUGAGUUUC
152	Cadena de sentido del Conjugado 15	Ser(GN) (ps) fG (ps) mA (ps) fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA (ps) Ser(GN)	GAAACUCAGUUUAAGAAGA
153	Cadena antisentido del Conjugado 16	mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU (ps) fC (ps) mU	AUGUAGCCGAGGAUCUUCU
154	Cadena antisentido del Conjugado 16	Ser(GN) (ps) fA (ps) mG (ps) fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)	AGAAGAUCCUCGGCUACAU
155	Cadena antisentido del Conjugado 18	mA (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA	AACCAGAAGAAGCAGGUGA
156	Cadena de sentido del Conjugado 18	Ser(GN) (ps) fU (ps) mC (ps) fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU	UCACCUGCUUCUUCUGGUU

		mG fG (ps) mU (ps) fU (ps) Ser(GN)	
157	STS16001BV1	fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
158	Cadena de sentido del Conjugado de referencia 6	[ST23 (ps)]3 ltrb (ps) fG mA fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA	GAAACUCAGUUUAAGAAGA
159	Cadena de sentido del Conjugado de referencia 7	[ST23 (ps)]3 ltrb (ps) fA mG fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU	AGAAGAUCCUCGGCUACAU
160	Cadena antisentido del Conjugado de referencia 8	mU (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA	UACCAGAAGAAGCAGGUGA
161	Cadena de sentido del Conjugado de referencia 8	[ST23 (ps)]3 ST41 (ps)fU mC fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (ps) fA	UCACCUGCUUCUUCUGGUA
162	Cadena de sentido del Conjugado de referencia 9	[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
163	Cadena de sentido del Conjugado 21 sin ligando	mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU

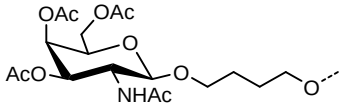
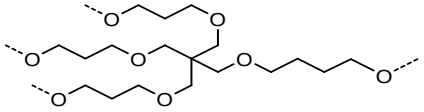
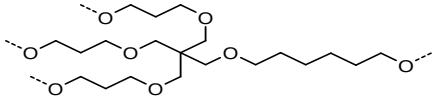
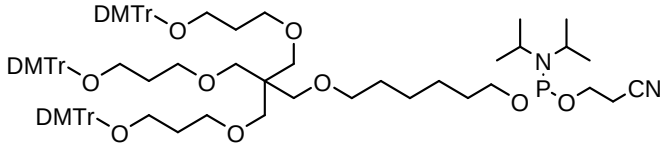
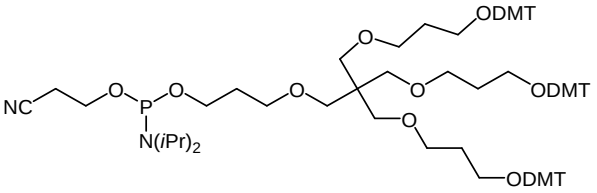
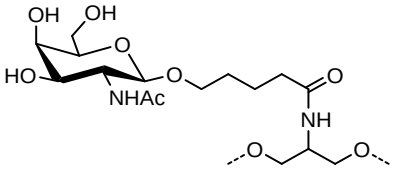
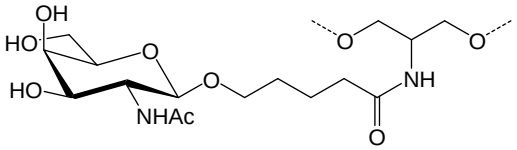
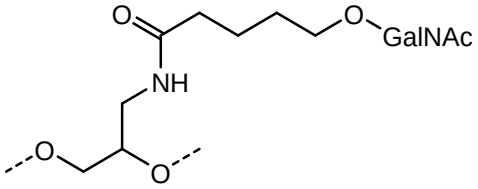
164	Cadena de sentido del Conjugado 21	[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
165	Cadena antisentido del Conjugado 21	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG	AUAACUCUGUCCAUUACCG

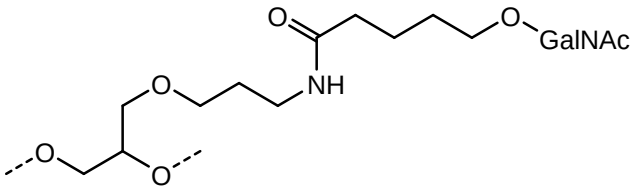
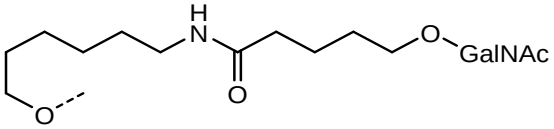
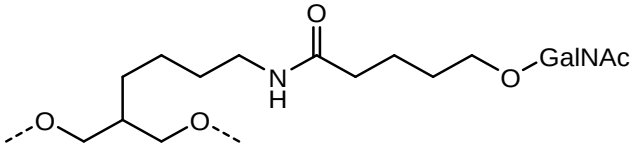
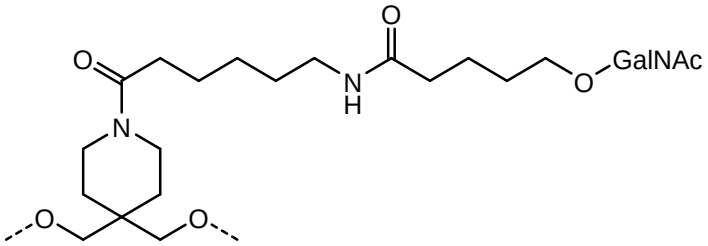
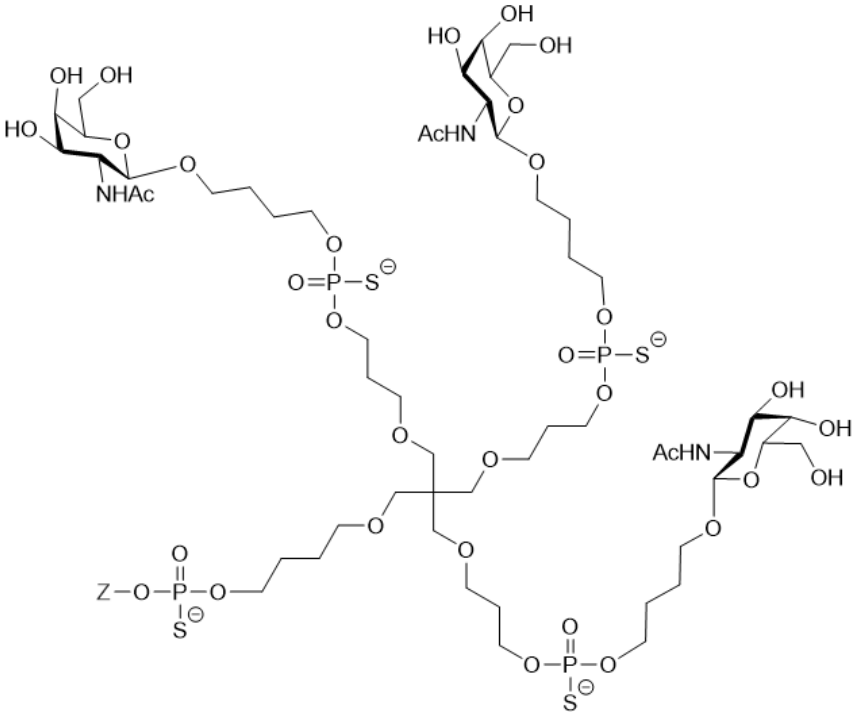
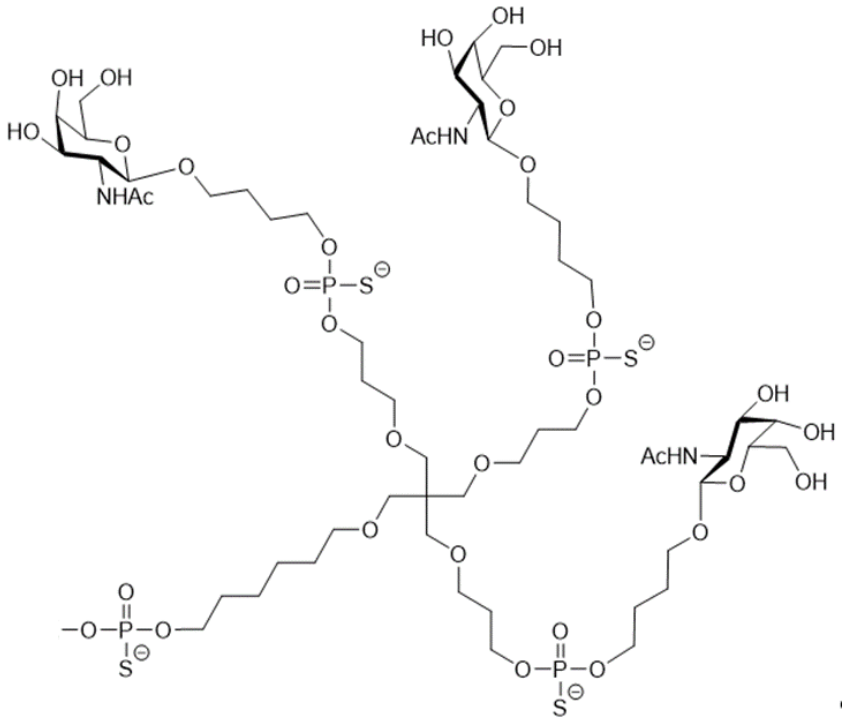
Una única secuencia puede tener más de un nombre. En esos casos, uno de los nombres se proporciona en la tabla de secuencias de resumen.

Donde se enseñan enlazadores específicos y o enlaces modificados dentro de una secuencia de ARN, tal como (ps) y [ST23 (ps)]3 ST41 (ps) etc., estas son partes opcionales de la secuencia, pero son una modalidad preferida de esa secuencia.

Las siguientes abreviaturas se pueden utilizar, particularmente en las secuencias enumeradas:

Abreviatura	**Significado**
1	2'F-dU
2	2'F-dA
3	2'F-dC
4	2'F-dG
5	2'OMe-rU
6	2'OMe-rA
7	2'OMe-rC
8	2'OMe-rG
mA, mU, mC, mG, OMeA, OMeU, OMeC, OMeG	ARN 2’desoxi-2‘-F
2’-OMe	Modificación 2’-O-Metilo
fA, fU, fC, fG	Nucleótidos de ARN 2’desoxi-2‘-F

2’-F, 2’-fluoro, 2’ fluoro	Modificación 2’-fluoro
(ps)	fosforotioato
(vp)	Vinil-(E)-fosfonato
ivA, ivC, ivU, ivG	ARN invertido (3’-3’)
FAM	6-Carboxifluoresceína
BHQ	Black Hole Quencher 1
ST23	
ST41/C4XLT	
ST43 (o C6XLT)	
ST43-phos/ C6XLT-phos	
Enlace triple largo/ltrb/STKS (fosforamidita)	
Ser(GN)	
Ser(GN) (fosforamidita)	
C3Am(GN)	

GlyC3Am(GN)	
C6Am(GN)	
C7Am(GN)	
PipAm(GN)	
[ST23 (ps)]3 C4XLT (ps) = [ST23 (ps)]3 ST41 (ps) = L4	

[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) = [ST23 (ps)]3 ST43 (ps) = L6