MOLÉCULAS DE REVERSIR Y MÉTODOS PARA SU USO

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. No. 63/444.375, presentada el 9 de febrero de 2023, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

ANTECEDENTES

La interferencia por ARN (iARN) es un mecanismo conservado evolutivamente en el cual ARN no codificantes cortos endógenos (microARN) o exógenos (ARNip, ARNhp) disminuyen la expresión génica de los transcriptos de ARNm de una manera que depende de la secuencia. Como una vía nativa que aprovecha un mecanismo catalítico celular eficaz, el ARNi se puede usar para lograr un silenciamiento robusto, durable, y específico de transcriptos génicos de interés. En los últimos años, se han validado de manera exitosa varios fármacos basados en iARN en los estudios clínicos, con beneficio demostrado a bajas dosis y dosificación, tan infrecuente como hasta 6 meses, en comparación con estrategias alternativas de silenciamiento génico. Las soluciones novedosas de administración junto con ARNip muy modificados químicamente han mejorado la potencia, durabilidad y seguridad y, por lo tanto, expandido mucho el alcance de los fármacos basados en iARN, culminando en cuatro fármacos aprobados y varios otros en desarrollo clínico. En el hígado, la administración infrecuente de ARNip estabilizados metabólicamente conjugados con N-galactosamina (GalNAc) resulta en un potente silenciamiento génico que persiste durante meses en humanos con perfiles favorables de seguridad y tolerabilidad. Con su duración de acción prolongada,

los fármacos basados en iARN pueden beneficiarse de una tecnología que permite la rápida reversión de la actividad silenciadora y provee control personalizado respecto a la farmacología con ARNi, un atributo deseado para las medicinas de precisión personalizada.

Sin embargo, en algunos casos, un sujeto puede responder de manera pobre al tratamiento con un agente de ARNhd o recibir una dosis muy alta. En dichos casos, se podría administrar un compuesto que revierta la actividad silenciadora de iARN del agente de ARNhd para al menos reducir parcialmente la actividad de iARN del agente de ARNhd. En otros casos, el efecto a largo plazo del ARNhd hace que el esperar a que ese efecto disminuya lentamente mediante la depuración natural sea una opción poco atractiva.

En consecuencia, existe una necesidad en el arte de composiciones y métodos que provean un control personalizado de la farmacología de la iARN y, por lo tanto, la actividad terapéutica y/o efectos secundarios de las terapéuticos basados en ARNip *in vivo*.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee oligonucleótidos que inhiben la actividad de iARN (los REVERSIR) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. La presente invención también provee métodos de uso de dichos oligonucleótidos para inhibir la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido en un sujeto, tal como un sujeto que lo requiere, por ejemplo, un sujeto que recibió una dosis muy alta del agente de ARNhd o que está experimentando un efecto secundario por la

administración del agente de ARNhd.

La presente invención se basa, por lo menos, en parte, en el descubrimiento de que la actividad de los REVERSIR, oligonucleótidos que revierten la actividad de silenciamiento por iARN de los agentes de ARNhd usados para controlar y personalizar la farmacología por ARNi, es abolida cuando se incluye un nucleótido térmicamente desestabilizante de la hebra antisentido de los agentes de ARNhd previamente demostrado que son inhibidos por los REVERSIR. La presente invención también se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de que los REVERSIR inhiben la actividad de interferencia por iARN de los agentes de ARNhd que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido de los agentes de ARNhd.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención provee un oligonucleótido de hebra simple para inhibir la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. El oligonucleótido de hebra simple incluye una secuencia nucleotídica sustancialmente complementaria a la hebra antisentido del agente de ARNhd, donde el oligonucleótido de hebra simple tiene entre 16 y 30 nucleótidos de longitud, donde sustancialmente todos los nucleótidos del oligonucleótido de hebra simple comprenden una modificación nucleotídica, y donde por lo menos tres de las modificaciones nucleotídicas son una modificación nucleotídica de alta afinidad.

En una forma de realización, sustancialmente todos los nucleótidos comprenden una modificación nucleotídica que se selecciona del grupo que

consiste en una modificación con 2’-O-alquilo, una modificación con 2’-alcoxilo sustituido, una modificación con 2’-alquilo sustituido, una modificación con 2’-halo, una modificación con desoxinucleótido, una modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA), una modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA) D-metilenoxilo (4′-CH_2-O-2′), una modificación con 2’-O-(2-Metoxietilo) (MOE), ácido nucleico con puente (2′,4′-BNA), 2′-O-Etilo (cEt), y una modificación con 2’-O-metilo.

En otra forma de realización, todos los nucleótidos comprenden una modificación nucleotídica que se selecciona del grupo que consiste en una modificación con 2’-O-alquilo, una modificación con 2’-alcoxilo sustituido, una modificación con 2’-alquilo sustituido, una modificación con 2’-halo, una modificación con desoxinucleótido, una modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA), una modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA) D-metilenoxilo (4′-CH_2-O-2′), una modificación con 2’-O-(2-Metoxietilo) (MOE), ácido nucleico con puente (2′,4′-BNA), 2′-O-Etilo (cEt), y una modificación con 2’-O-metilo.

En una forma de realización, por lo menos cuatro o cinco, por ejemplo, 4, 5 o 6, de las modificaciones nucleotídicas pueden ser modificaciones nucleotídicas de alta afinidad.

En una forma de realización, por lo menos dos de las modificaciones nucleotídicas de alta afinidad están en las posiciones 2 y 6; posiciones 2 y 5; posiciones 2 y 7; posiciones 2 y 8; posiciones 2 y 9; posiciones 2 y 14; posiciones 2 y 15; y/o posiciones 2 y 16, contando desde el extremo 3’ del oligonucleótido.

En una forma de realización, las modificaciones nucleotídicas de alta

afinidad están en las posiciones 2, 6, 8 y 14; 2, 4, 5, 6 y 7; 2, 4, 6, 8 y 13; 2, 4, 6, 8 y 14; 2, 4, 6, 8 y 15; 2, 4, 6, 8 y 16; 2, 8, 10 y 14; 2, 4, 6, 8 y 14; o 2, 8, 12 y 14, contando desde el extremo 3’ del oligonucleótido.

En una forma de realización, por lo menos uno de los nucleótidos que comprende una modificación nucleotídica de alta afinidad forma un apareamiento de bases con el nucleótido que comprende el nucleótido térmicamente desestabilizante de la hebra antisentido del agente de ARNhd.

En una forma de realización, la modificación de alta afinidad es una modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA).

En una forma de realización, la modificación de alta afinidad es una modificación de ácido nucleico con etilo con restricción estérica (cEtNA).

En una forma de realización, la modificación de alta afinidad es un ácido nucleico con puente (BNA) modificación.

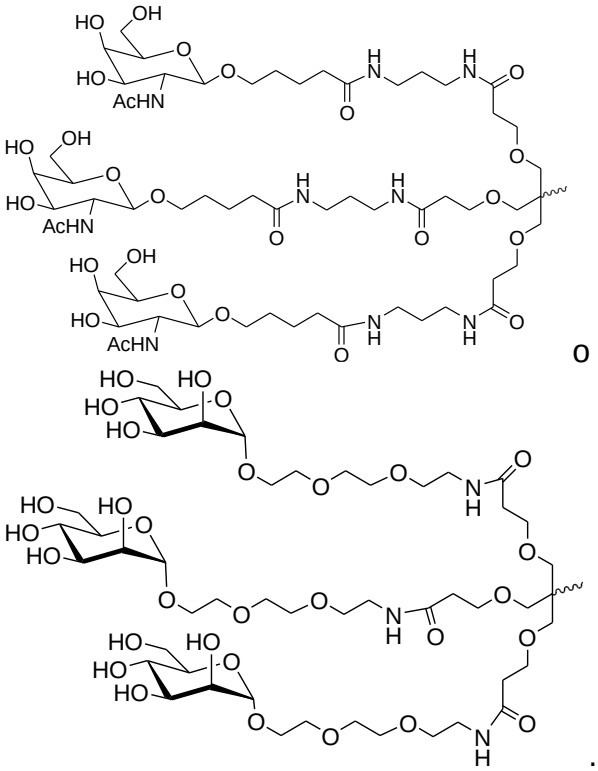
El oligonucleótido de hebra simple además puede comprender por lo menos cinco, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, modificaciones internucleotídicas de fosforotioato.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple está conjugado a por lo menos un ligando.

En una forma de realización, el ligando es un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

En una forma de realización, el ligando es uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un conector ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

En una forma de realización, el ligando es



En una forma de realización, el ligando está conjugado a un nucleósido que comprende un desoxiazúcar en el oligonucleótido de hebra simple.

En una forma de realización, el desoxiazúcar es una 2'-desoxirribosa.

En una forma de realización, el ligando está conjugado al extremo 3' del oligonucleótido de hebra simple.

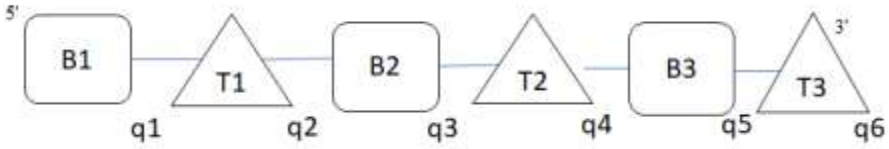
En otro aspecto, la presente invención provee un oligonucleótido de hebra simple para inhibir la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido,

donde el oligonucleótido de hebra simple comprende una secuencia nucleotídica sustancialmente complementaria a la hebra antisentido del agente de ARNhd,

donde el oligonucleótido de hebra simple tiene entre 18 y 24 nucleótidos

de longitud,

donde el oligonucleótido de hebra simple comprende por lo menos cinco modificaciones internucleotídicas de fosforotioato y está representado por la fórmula (I):



Fórmula I

donde:

B1, B2 y B3 representan cada uno de manera independiente un nucleótido que comprende una modificación nucleotídica que se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en una modificación con 2'-desoxilo, 2'-ribo, 2'-O-alquilo, una modificación con 2'-alcoxilo sustituido, una modificación con 2'-alcoxialquilo sustituido, una modificación con 2'-alquilo sustituido, y una modificación con 2'-halo;

T1, T2, y T3 representan cada uno de manera independiente un nucleótido que comprende una modificación nucleotídica que se selecciona del grupo que consiste en una modificación con desoxinucleótido, una modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA) D-metilenoxilo (4′-CH_2-O-2′), una modificación con 2'-O-(2-Metoxietilo) (MOE), una modificación con cEt, o una modificación BNA diferente, una 2'-desoxi-2'-Fluoro, y una modificación con 2'-O-metilo;

q^1, q^3 y q^5 tienen cada uno de manera independiente entre 3 y 12 nucleótidos de longitud;

q^2, q^4 y q^6 tienen de manera independiente entre 1 y 6 nucleótidos de longitud; y

donde el oligonucleótido de hebra simple está conjugado a por lo menos un ligando.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple comprende entre 5 y 15 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 14 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 13 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 12 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 11 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 10 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 9 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 8 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 7 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; o entre 5 y 6 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple comprende entre 6 y 14 modificaciones internucleotídicas fosforotioato.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple tiene entre 18 y 22 o entre 18 y 20 nucleótidos de longitud.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple es por lo menos aproximadamente 90% complementario a la hebra antisentido de longitud completa del agente de ARNhd.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple es 90% complementario a los nucleótidos 2 a 16 de la hebra antisentido del agente de ARNhd.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple es completamente complementario a la hebra antisentido del agente de ARNhd.

En una forma de realización, la secuencia nucleotídica de la hebra

antisentido del agente de ARNhd comprende la secuencia nucleotídica 5’-UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA-3’.

En una forma de realización, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante se selecciona del grupo que consiste en una modificación abásica; una falta de complementariedad con el nucleótido opuesto en el dúplex; una modificación de azúcar desestabilizante, una modificación con 2’-desoxilo, un nucleótido acíclico, un ácido nucleico no bloqueado (UNA), y un ácido nucleico glicólico (GNA).

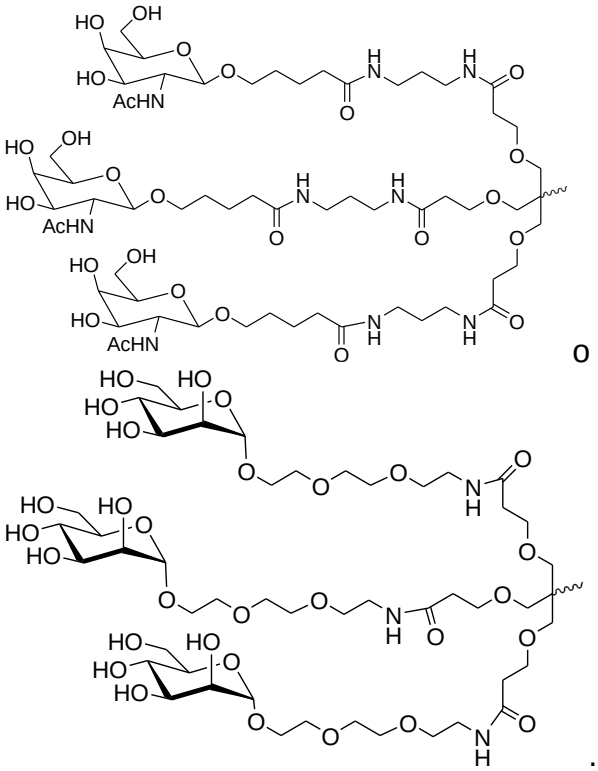
En una forma de realización, la secuencia nucleotídica de la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende la secuencia nucleotídica 5’-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa -3’.

En una forma de realización, la secuencia nucleotídica del oligonucleótido de hebra simple es por lo menos 90% idéntica a la secuencia nucleotídica completa de cualquiera de las secuencias nucleotídicas sin modificar de la Tabla 6.

En una forma de realización, el ligando es un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

En una forma de realización, el ligando es uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un conector ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

En una forma de realización, el ligando es



En una forma de realización, el ligando está conjugado a un nucleósido que comprende un desoxiazúcar en el oligonucleótido de hebra simple.

En una forma de realización, el desoxiazúcar es una 2'-desoxirribosa.

En una forma de realización, el ligando está conjugado al extremo 3' del oligonucleótido de hebra simple.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple comprende una secuencia nucleotídica modificada que difiere en no más de 4 nucleótidos modificados de cualquiera de las secuencias nucleotídicas modificadas de la Tabla 6.

La presente invención también provee células y composiciones farmacéuticas, por ejemplo, que comprenden una solución amortiguadora (por ejemplo, acetato, citrato, prolamina, carbonato, o fosfato, o cualquier combinación de los mismos) o una solución no amortiguada (por ejemplo,

solución salina o agua), que comprende los oligonucleótidos de hebra simple de la invención.

En un aspecto, la presente invención provee un método para aliviar un efecto secundario de un agente de ARNhd en un sujeto que inhibe la expresión de un gen diana y que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. El método incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica de la invención, aliviando de esta manera el efecto secundario del agente de ARNhd en el sujeto.

En un aspecto, la presente invención provee un método para inhibir la actividad inhibidora de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. El método incluye poner en contacto el agente de ARNhd con el oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica de la invención, inhibiendo de esta manera la actividad inhibidora de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNhd se encuentra en una célula.

En una forma de realización, la célula se encuentra dentro de un sujeto humano.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar a un sujeto que lo requiere. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica de la invención, tratando de esta manera al sujeto.

En una forma de realización, al sujeto que lo requiere se le administró previamente un agente de ARNi de hebra doble que inhibe la expresión de un gen diana y que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido.

En una forma de realización, el gen diana es angiotensinógeno (AGT).

En una forma de realización, el sujeto que lo requiere padece hipotensión.

En una forma de realización, el sujeto que lo requiere padece hiperpotasemia.

En una forma de realización, el sujeto que lo requiere padece disfunción renal.

En una forma de realización, el método además comprende administrar al sujeto una terapia o agente terapéutico adicional que se selecciona del grupo que consiste en fluidos/sal de la dieta aumentados, tratamiento con fludrocortisona/midodrina, fluidos intravenosos, medicamentos vasopresores, disminución de la dosis o interrupción de medicamentos antihipertensivos concomitantes, una dieta baja en potasio, medicamentos tiazida/diuréticos de asa, quelantes orales de potasio, calcio, glucosa, insulina, y hemodiálisis, o combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una forma de realización, el oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica se administra al sujeto por vía intravenosa.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 1:1, 2:1 o

3:1 con la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 1:1 con la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 1:2 a la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 1:3 a la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 1:4 a la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 1:5 a la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 1:10 a la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 2:1 con la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 3:1 con la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 5:1 con la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica tiene una relación de aproximadamente 10:1 con la dosis del agente de ARNhd administrada previamente al sujeto.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica se divide en tres dosis y se administra al sujeto en intervalos de 24 horas.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica se divide en dos dosis y se administra al sujeto en intervalos de 24 horas.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica se divide en tres dosis y se administra al sujeto en intervalos de 12 horas.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica se divide en dos dosis y se administra al sujeto en intervalos de 12 horas.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica se divide en tres dosis y se administra al sujeto en intervalos de 8 horas.

En una forma de realización, la dosis del oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica se divide en dos dosis y se administra al sujeto en intervalos de 8 horas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La **Figura 1A** es un gráfico en el que se describe la inhibición del silenciamiento de un agente de ARNhd dirigido contra TTR y conjugado a un ligando GalNAc por un REVERSIR en ratones.

La **Figura 1B** es un gráfico en el que se describe la inhibición del silenciamiento de un agente de ARNhd dirigido contra TTR y conjugado a un ligando GalNAc por un REVERSIR en ratones.

La **Figura 1C** es un gráfico en el que se describe la incapacidad de un REVERSIR previamente demostrado que inhibe el silenciamiento de agentes de ARNhd conjugados a un ligando GalNAc (el agente de ARNhd en la Figura 1A y 1B) para inhibir el silenciamiento de agentes de ARNhd dirigidos contra la misma región del ARNm y que comprende la misma secuencia nucleotídica y sustancialmente las mismas modificaciones nucleotídicas excepto por la inclusión de una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en ratones.

La **Figura 2** es un gráfico en el que se describe el efecto del alargamiento de los REVERSIR y la administración de una dosis de hasta 100 veces mayor que la de los REVERSIR dirigidos contra ARNhd no desestabilizantes sobre la capacidad para inhibir el silenciamiento de agentes de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante y conjugado a un ligando GalNAc en ratones. En el gráfico también se describe la redosificación exitosa del agente de ARNhd GalNAc 30 días después de la administración del agente REVERSIR y en la recuperación. La redosificación exitosa significa la reanudación de la farmacología de ARNi, con un perfil similar al grupo control (sin REVERSIR) en ratones.

La **Figura 3A** es un gráfico en el que se describe el efecto de la

administración intravenosa de 0,3 mg/kg de un REVERSIR formulado en un LNP sobre la actividad silenciadora de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido y el efecto de la administración subcutánea de 3 mg/kg en ratones de un REVERSIR conjugado con GalNAc sobre la actividad silenciadora de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido en ratones.

La **Figura 3B** es un gráfico en el que se describe el efecto de la administración subcutánea de 3 mg/kg de un REVERSIR conjugado con GalNAc sobre la actividad silenciadora de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido en ratones.

La **Figura 4A** es un gráfico en el que se describe el efecto *in vitro* de los REVERSIR indicados sobre la actividad silenciadora de iARN de AD-85481 cuando las células fueron transfectadas con los REVERSIR.

La **Figura 4B** es un gráfico en el que se describe el efecto *in vitro* de los REVERSIR indicados sobre la actividad silenciadora de iARN de AD-85481 cuando los REVERSIR fueron ensayados mediante la libre captación a las células.

La **Figura 5** es una Tabla en la que se muestra la actividad *in vitro* de los REVERSIR A-515518, A-515556, A-515559, A-515586 y A-515589.

La **Figura 6A** es un gráfico en el que se describe el efecto de la administración intravenosa de 0,3 mg/kg de los REVERSIR indicados formulados en un LNP sobre la actividad silenciadora de iARN de un AD-85481 en ratones.

La **Figura 6B** es un gráfico en el que se describe el efecto de la administración subcutánea de 3 mg/kg de los REVERSIR conjugados con GalNAc indicados sobre la actividad silenciadora de iARN de AD-85481 en ratones.

En la **Figura 7A** se describen de manera esquemática las secuencias nucleotídicas modificadas de A-762636, A-762655, A-762680, A-762689, A-762722 y A-762645.

La **Figura 7B** es un gráfico en el que se describe los niveles de ARNm de AGT de humano en ratones administrados con un AAV que codifica para AGT de humano a los puntos de tiempo indicados luego de la administración subcutánea de una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481 y una dosis individual de 3 mg/kg de los REVERSIR conjugados con GalNAc indicados.

En la **Figura 8A** se describen de manera esquemática las secuencias nucleotídicas modificadas de A-762689, A-762722 y A-762645.

La **Figura 8B** es un gráfico en el que se describe los niveles de ARNm de AGT de humano en ratones administrados con un AAV que codifica para AGT de humano a los puntos de tiempo indicados luego de la administración subcutánea de una dosis individual de 3 mg/kg AD-85481 y una dosis individual de 1 mg/kg o 3 mg/kg de los REVERSIR indicados.

En la **Figura 9** se describe de manera esquemática el diseño del estudio para la evaluación de A-762722 y A-762645 en primates no humanos y las secuencias nucleotídicas modificadas de A-762722 y A-762645.

La **Figura 10A** es un gráfico en el que se describe el efecto de la administración subcutánea de 1 mg/kg o 3 mg/kg de los REVERSIR conjugados con GalNAc indicados sobre la actividad silenciadora de iARN de

AD-85481 en primates no humanos.

La **Figura 10B** es un gráfico en el que se describe el efecto de la administración intravenosa de 0,3 mg/kg del REVERSIR indicado formulado en un LNP sobre la actividad silenciadora de iARN de un AD-85481 en primates no humanos.

En la **Figura 11A** se describen de manera esquemática las secuencias nucleotídicas modificadas de A-762645, A-809917, A809918, A-809919, A-809920, A-809921, A-809922, A-809923, A-809924, A809924 y A-809925.

La **Figura 11B** es un gráfico en el que describen los niveles de ARNm de AGT de humano en ratones administrados con un AAV que codifica para AGT de humano a los puntos de tiempo indicados luego de la administración subcutánea de una dosis individual de 3 mg/kg AD-85481 y una dosis individual de 3 mg/kg de los REVERSIR indicados.

En la **Figura 12A** se describen de manera esquemática las secuencias nucleotídicas modificadas de A-762645, A809918, A-809925, A2423818 o A2423819.

La **Figura 12B** es un gráfico en el que se describe niveles de ARNm de AGT de humano en ratones administrados con un AAV que codifica para AGT de humano a los puntos de tiempo indicados luego de la administración subcutánea de una dosis individual de 3 mg/kg AD-85481 y una dosis individual de 3 mg/kg de los REVERSIR indicados.

La **Figura 12C** es un gráfico en el que se describe niveles de ARNm de AGT de humano en ratones administrados con un AAV que codifica para AGT de humano a los puntos de tiempo indicados luego de la administración subcutánea de una dosis individual de 3 mg/kg AD-85481 y una dosis individual

de 3 mg/kg de los REVERSIR indicados.

La **Figura 13A** es un gráfico en el que se describe el efecto de la administración subcutánea de 3 mg/kg de los REVERSIR indicados sobre la actividad silenciadora de iARN de AD-85481 en primates no humanos.

La **Figura 13B** es un gráfico en el que se describe el efecto de reversión de la administración subcutánea de 3 mg/kg de los REVERSIR indicados sobre la actividad silenciadora de iARN de AD-85481 en primates no humanos.

La **Figura 13C** es una Tabla en la que se describe el efecto de la administración subcutánea de 3 mg/kg de los REVERSIR indicados sobre la actividad silenciadora de iARN de AD-85481 en primates no humanos.

La **Figura 14A** son gráficos que describen el efecto de los REVERSIR indicados sobre los niveles de IL-6, IL-8, IL1B, y TNFalfa en un ensayo de transfección de sangre entera de humano diluida (incubación de 24 horas).

La **Figura 14B** es un gráfico en el que se describe el efecto de los REVERSIR indicados sobre los niveles de IL-8 y MCP-1 en un ensayo de sangre entera de humano de 6 horas.

La **Figura 14C** son gráficos en los que se describen los efectos de los REVERSIR indicados sobre el recuento de plaquetas y los recuentos de células en sangre entera de primates no humanos.

La **Figura 15A** son gráficos en los que se describe el % de AGT remanente y la reversión del silenciamiento de AGT usando relaciones variables de RVR/ARNhd y formulaciones conjugadas con GalNAc y LNP en primates no humanos.

La **Figura 15B** es un gráfico en el que se describe que el REVERSIR A-762645 presentó una farmacología potente y durable luego de la dosificación

de AD-85481 (Zilebesiran) en primates no humanos.

La **Figura 15C** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración subcutánea o intravenosa del REVERSIR indicado para niveles variables de dosis.

La **Figura 16A** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente normalizado a la predosis luego de la administración subcutánea del REVERSIR indicado para niveles variables de dosis en un modelo de ratón hAGT-AAV pretratado con 10 mg/kg de AD-85481. Para el modelo de ratón hAGT-AAV, se expresó un gen de AGT de humano en los hepatocitos del ratón mediante transducción con el virus AAV8 específico por hígado.

La **Figura 16B** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración subcutánea de REVERSIR en un modelo de ratón hAGT-AAV pretratado con 3 mg/kg de AD-85481. Para el modelo de ratón hAGT-AAV, se expresó un gen de AGT de humano en los hepatocitos del ratón mediante transducción con el virus AAV8 específico por hígado.

La **Figura 17** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración subcutánea de REVERSIR A-762645 en un modelo de ratón transgénico de hAGT pretratado con 10 mg/kg de AD-85481. Para el modelo de ratón hAGT-AAV, se insertó un gen de AGT de humano al azar en múltiples áreas en el genoma del ratón (generado durante la etapa de célula madre embrionaria).

La **Figura 18** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración subcutánea de REVERSIR conjugado con GalNAc A-762645 en un modelo de ratón PXB pretratado con 10 mg/kg de AD-85481.

La **Figura 19A** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración de relaciones variables de REVERSIR a ARNhd en una rata.

La **Figura 19B** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración de cargas variables de ARNhd AD-85481.

La **Figura 19C** es un gráfico en el que se describe la reversión del noqueo de AGT con un REVERSIR en una formulación LNP y un REVERSIR con un ligando GalNac administrado por vía subcutánea a una rata.

La **Figura 19D** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración intravenosa en bolo y la administración subcutánea del REVERSIR A-762645.

En la **Figura 20** se describen de manera esquemática las secuencias nucleotídicas modificadas de los REVERSIR A-3903617, A-3903618, A-3903619, A-3903620, A-3903621, A-3903622, A-3903623, A-3903624, A-3903625, A-3903626, A-3903627, A-3903628, A-3903629, A-3903630 y A-3903631.

La **Figura 21** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración subcutánea del REVERSIR indicado conjugado con GalNAc en un modelo de ratón hAGT-AAV pretratado con 3 mg/kg o 10 mg/kg de AD-85481. Para el modelo de ratón hAGT-AAV, se expresó un gen de AGT de humano en los hepatocitos del ratón mediante transducción con el virus AAV8 específico por hígado.

La **Figura 22** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración subcutánea del REVERSIR indicado

conjugado con GalNAc en un modelo de ratón hAGT-AAV pretratado con 3 mg/kg o 10 mg/kg de AD-85481. Para el modelo de ratón hAGT-AAV, se expresó un gen de AGT de humano en los hepatocitos del ratón mediante transducción con el virus AAV8 específico por hígado.

La **Figura 23** es un gráfico en el que se describe el % de AGT remanente luego de la administración subcutánea del REVERSIR indicado conjugado con GalNAc en un modelo de ratón hAGT-AAV pretratado con 3 mg/kg o 10 mg/kg de AD-85481. Para el modelo de ratón hAGT-AAV, se expresó un gen de AGT de humano en los hepatocitos del ratón mediante transducción con el virus AAV8 específico por hígado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee oligonucleótidos de hebra simple (REVERSIR) que inhiben la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. La presente invención también provee métodos de uso de dichos oligonucleótidos para inhibir la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido en un sujeto, tal como un sujeto que lo requiere, por ejemplo, un sujeto que recibió una dosis muy alta del agente de ARNhd o que está experimentando un efecto secundario de la administración del agente de ARNhd, por ejemplo, efecto fuera de diana.

La presente invención se basa, por lo menos, en parte, en el descubrimiento que la actividad de los REVERSIR, oligonucleótidos que revierten la actividad de silenciamiento por ARNi de agentes de ARNhd usados

para el control y personalización de la farmacología por ARNi, es abolida cuando se incluye un nucleótido térmicamente desestabilizante de la hebra antisentido de los agentes de ARNhd que demostraron previamente ser inhibidos por los REVERSIR.

La presente invención también se basa, por lo menos en parte, en la identificación de los REVERSIR que tienen la capacidad de inhibir la actividad de iARN de una clase de agentes de ARNhd que comprenden un nucleótido térmicamente desestabilizante de la hebra antisentido. Esta clase nueva de los REVERSIR se caracteriza por una combinación de propiedades estructurales, por ejemplo, una combinación de longitud, contenido de fosforotioato (PS) y ubicación especifica de una modificación nucleotídica de alta afinidad, tal como una modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA), en relación al nucleótido térmicamente desestabilizante de la hebra antisentido del agente de ARNhd.

La siguiente descripción detallada describe cómo elaborar y usar oligonucleótidos que inhiben la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido, así como los usos y métodos para tratar a sujetos que lo requieren.

I. Definiciones

Con el objetivo de que la presente invención sea más comprendida de manera más fácil, primero se definen ciertos términos. Además, se debe observar que cada vez que se indica un valor o rango de valores de un parámetro, se pretende que los valores y rangos intermedios a los valores indicados también sean parte de esta invención.

Los artículos “una/o” y “un” se usan en la presente para referirse a uno o

más de uno (es decir, a por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” se refiere a un elemento o más de un elemento, por ejemplo, una pluralidad de elementos.

El término "que incluye" se usa en la presente para referirse a, y se usa como sinónimo con, la expresión "que incluye pero no se limita a".

El término "o" se usa en la presente para referirse a, y se usa como sinónimo con, el término "y/o", a menos que el contexto lo indica claramente de otra manera. Por ejemplo, “hebra sentido o hebra antisentido” se comprende como “hebra sentido o hebra antisentido o hebra sentido y hebra antisentido”.

El término “aproximadamente” se usa en la presente para referirse a dentro de los rangos típicos de tolerancias en el arte. Por ejemplo, “aproximadamente” se puede comprender como aproximadamente 2 desviaciones estándares respecto a la media. En determinadas formas de realización, aproximadamente se refiere a $\pm$10%. En determinadas formas de realización, aproximadamente se refiere a $\pm$5%. Cuando aproximadamente está presente antes de una serie de números o de un rango, se comprende que “aproximadamente” puede modificar cada uno de los números en la serie o rango.

El término “por lo menos”, “no menos que”, o “o más” antes de un número o serie de números se comprende que incluye el número adyacente al término “por lo menos”, y todos los números posteriores o enteros que podrían estar lógicamente incluidos, tal como resulta claro a partir del contexto. Por ejemplo, el número de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico debe ser un entero. Por ejemplo, “por lo menos 19 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de 21 nucleótidos” se refiere a que 19, 20 o 21 nucleótidos tienen la

propiedad indicada. Cuando por lo menos está presente antes de una serie de números o un rango, se comprende que “por lo menos” puede modificar cada uno de los números en la serie o rango.

Tal como se usa en la presente, “no más de” o “o menos” se comprende como el valor adyacente a la expresión y los valores o enteros inferiores lógicos, tal como resulte lógico a partir del contexto, hasta cero. Por ejemplo, un dúplex con una sobreextensión de “no más de 2 nucleótidos” tiene una sobreextensión de 2, 1 o 0 nucleótidos. Cuando “no más de” está presente antes de una serie de números o un rango, se comprende que “no más de” puede modificar cada uno de los números en la serie o rango. Tal como se usan en la presente, los rangos incluyen el límite superior y el límite inferior.

En caso de un conflicto entre un sitio diana indicado y la secuencia nucleotídica de una hebra sentido o antisentido, prevalece la secuencia indicada.

En caso de un conflicto entre una secuencia y su sitio indicado en un transcripto u otra secuencia, prevalece la secuencia nucleotídica indicada en la memoria descriptiva.

Tal como se usa en la presente, el término “nucleósido” se refiere a una glicosilamina que comprende una nucleobase y un azúcar. Los nucleósidos incluyen, a título enunciativo no taxativo, los nucleósidos de origen natural, nucleósidos abásicos, nucleósidos modificados, y nucleósidos que tienen bases miméticas y/o grupos azúcar.

Tal como se usa en la presente, el término “nucleótido” se refiere a una glicosamina que comprende una nucleobase y un azúcar que tiene un grupo fosfato unido de manera covalente al azúcar. Los nucleótidos pueden estar

modificados por cualquiera de una variedad de sustituyentes.

Tal como se usa en la presente, el término “nucleobase” se refiere a la porción base de un nucleósido o nucleótido. Una nucleobase puede comprender cualquier átomo o grupo de átomos con capacidad de formar puente de hidrogeno con una base de otro ácido nucleico.

Tal como se usa en la presente, el término “unidad base heterocíclica” se refiere a una nucleobase que comprende un heterociclo.

Tal como se usa en la presente, el término “compuesto oligomérico” se refiere a una estructura polimérica que comprende dos o más subestructuras y con capacidad de hibridizar con una región de una molécula de ácido nucleico. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos son oligonucleósidos. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos son compuesto antisentido. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos son compuestos REVERSIR. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos comprenden grupos conjugados.

Tal como se usa en la presente “oligonucleósido” se refiere a un oligonucleótido en el cual las uniones internucleosídicas no contienen un átomo fósforo.

Tal como se usa en la presente, el término “oligonucleótido” se refiere a un compuesto oligomérico que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En cierta forma de realización, uno o más nucleótidos de un oligonucleótido están modificados. En determinadas formas de realización, un oligonucleótido comprende ácido ribonucleico (ARN) o ácido

desoxirribonucleico (ADN). En determinadas formas de realización, los oligonucleótidos están compuestos por nucleobases de origen natural y/o no natural, azúcares y uniones internucleosídicas covalentes, y además pueden incluir conjugados de ácidos no nucleicos.

Tal como se usa en la presente, el término “compuesto REVERSIR” o “REVERSIR” se refiere a un compuesto oligomérico de hebra simple, tal como un oligonucleótido de hebra simple, que es complementario con y que tiene la capacidad de hibridizar (dirigido a) con por lo menos una hebra de un agente de ARNhd que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. Sin limitaciones, el compuesto REVERSIR puede no solo bloquear los efectos farmacodinámicos diana no pretendidos (PD), sino también bloquear cualquier actividad potencial fuera de diana que podría producirse con un agente de ARNhd, por ejemplo, un agente de ARNhd conjugado o no conjugado. Los REVERSIR se unen a y se internalizan en una célula a través de un receptor asialoglicoproteína (ASPGR) y se unen de manera irreversible a la hebra antisentido de un agente de ARNhd en un complejo RISC funcional. La unión del REVERSIR anula el reconocimiento diana del ARNm y la escisión iniciada por la hibridización del agente de ARNhd.

Tal como se usa en la presente, el término “actividad de REVERSIR” se refiere a cualquier disminución en la intensidad y/o duración de cualquier actividad de ARNhd atribuible a la hibridización de un compuesto REVERSIR a una de las hebras del ARNhd.

Los compuestos REVERSIR descritos en la presente son particularmente eficaces para reducir la actividad de los ARNhd que contienen un nucleótido térmicamente desestabilizante de la hebra antisentido. Por

ejemplo, los compuestos REVERSIR descritos en la presente pueden reducir en 24 horas a 7 días la actividad de un ARNhd en por lo menos aproximadamente 20% o por lo menos aproximadamente 30%, o por lo menos aproximadamente 40%, o por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, o por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%, o por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% o hasta, e incluyendo, una disminución del 100% (es decir, nivel ausente en comparación con una muestra de referencia), o cualquier disminución entre 20 y 100% o entre 50 y 100% en comparación con un nivel de referencia. El nivel de referencia puede ser la actividad de ARNhd en ausencia del compuesto REVERSIR.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR descritos en la presente pueden reducir la actividad de ARNhd en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por ejemplo en 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más y hasta, e incluyendo, la reducción o inhibición completa de la actividad de ARNhd, en menos de siete (por ejemplo, dentro de seis días, cinco días, cuatro días, tres días, dos días o un día) de administración o uso del compuesto REVERSIR.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR pueden reducir de manera completa la actividad de ARNhd dentro de los cuatro días de administración o uso del compuesto REVERSIR. Por reducción completa de la actividad de ARNhd se comprende una reducción de la actividad de ARNhd de por lo menos 80% en relación a un nivel de referencia.

Los términos “ARNi”, “agente de ARNi”, “agente de iARN”, “agente de interferencia por ARN” usados como sinónimo en la presente, se refieren a un agente que contiene ARN como el término que se define en la presente, y que media la escisión dirigida de un transcripto de ARN por medio de una vía del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El ARNi dirige la degradación específica de secuencia del ARNm a través de un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). El ARNi modula, por ejemplo, inhibe, la expresión de una secuencia de ARNm diana, por ejemplo, en una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

En determinadas formas de realización, un “ARNi” para usar en las composiciones, usos, y métodos de la invención es un ARN de hebra doble y es referido en la presente como un “agente de ARN de hebra doble”, “molécula de ARN de hebra doble (ARNhd)”, “agente de ARNhd”, o “ARNhd”. El término “ARNhd”, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tiene una estructura de dúplex que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, referidas por tener orientaciones “sentido” y “antisentido” respecto a un ARN diana. En algunas formas de realización de la invención, un ARN de hebra doble (ARNhd) inicia la degradación de un ARN diana, por ejemplo, un ARNm, mediante un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional referido en la presente como interferencia por ARN o iARN.

El término “hebra antisentido” o "hebra guía" se refiere a la hebra de un ARNi, por ejemplo, un ARNhd, que incluye una región que es sustancialmente complementaria con una secuencia diana.

El término “hebra sentido” o "hebra pasajera " tal como se usa en la presente, se refiere a la hebra de un ARNi que incluye una región que es sustancialmente complementaria con una región de la hebra antisentido como el término definido en la presente.

El término “modificación o modificaciones térmicamente desestabilizantes” incluye la o las modificaciones que podrían resultar con un ARNhd con una menor temperatura de fusión general (T_m) que la T_m del ARNhd sin tener dicha o dichas modificaciones. Por ejemplo, la o las modificaciones térmicamente desestabilizantes pueden disminuir la T_m del ARNhd entre 1 y 4 °C, tal como uno, dos, tres o cuatro grados Celsius. Y el término “nucleótido térmicamente desestabilizante” se refiere a un nucleótido que contiene una o más modificaciones térmicamente desestabilizantes.

Las modificaciones térmicamente desestabilizantes ejemplificativas incluyen modificaciones abásicas; faltas de complementariedad con el nucleótido opuesto en el dúplex; y modificaciones del azúcar tales como modificaciones 2’-desoxi o nucleótidos acíclicos por ejemplo, ácidos nucleicos no bloqueados (UNA) o ácidos nucleicos glicólicos (GNA), o ribonucleótidos con unión 2’-5’ (“3’-ARN”).

Tal como se usa en la presente el término “detectar la actividad de ARNhd” o “medir la actividad de ARNhd” significa que se lleva a cabo una prueba para detectar o para medir la actividad de ARNhd en una muestra particular y se compara con la de una muestra control. Dicha detección y/o medida puede incluir valores de cero. Por lo tanto, si una prueba para la detección de la actividad de ARNhd resulta en un hallazgo de nada de actividad de ARNhd (una actividad de ARNhd de cero), el paso de “detectar la actividad

de ARNhd” se ha llevado a cabo de todas maneras.

Tal como se usa en la presente el término “muestra control” se refiere a una muestra que no se ha puesto en contacto con ningún compuesto oligomérico.

Tal como se usa en la presente, el término “motivo” se refiere al patrón de nucleótidos modificados y no modificados de un compuesto oligomérico.

Tal como se usa en la presente “unión internucleosídica” se refiere a una unión covalente entre nucleósidos adyacentes.

Tal como se usa en la presente “unión internucleosídica de origen natural” se refiere a una unión fosfodiéster 3′ a 5′.

Tal como se usa en la presente, el término “oligómero quimérico” se refiere a un compuesto oligomérico que tiene por lo menos un azúcar, nucleobase o unión internucleosídica que está diferencialmente modificada en comparación con por lo menos otro azúcar, nucleobase o unión internucleosídica dentro del mismo compuesto oligomérico. El resto de los azúcares, nucleobases y uniones internucleosídicas pueden estar independientemente modificadas o no modificadas o pueden ser iguales o diferentes.

Tal como se usa en la presente, el término “oligonucleótido quimérico” se refiere a un oligonucleótido que tiene por lo menos un azúcar, nucleobase o unión internucleosídica que está diferencialmente modificada en comparación con por lo menos otro azúcar, nucleobase o unión internucleosídica dentro del mismo oligonucleótido. El resto de los azúcares, nucleobases y uniones internucleosídicas pueden estar independientemente modificadas o no modificadas o pueden ser iguales o diferentes.

Tal como se usa en la presente, el término “compuesto oligomérico de esqueleto mixto” se refiere a un compuesto oligomérico donde por lo menos una unión internucleosídica del compuesto oligomérico es diferente a por lo menos otra unión internucleosídica del compuesto oligomérico.

Tal como se usa en la presente, el término “proteína diana” se refiere a una proteína cuya modulación se desea. Por ejemplo, la proteína diana es el Angiotensinógeno (AGT).

Tal como se usa en la presente, el término “gen diana” se refiere a un gen que codifica para una proteína diana. Por ejemplo, el gen diana es el Angiotensinógeno (AGT).

Tal como se usa en la presente, el término “ácido nucleico diana” se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico cuya expresión o actividad es capaz de ser modulada por un compuesto de ARNhd conjugado o no conjugado. Los ácidos nucleicos diana incluyen, a título enunciativo no taxativo, ARN (incluyendo, a título enunciativo no taxativo pre-ARNm y ARNm o partes de los mismos) transcripto a partir de un ADN que codifica para una proteína diana, y también ADNc derivado de dicho ARN, y miARN. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser un gen celular (o ARNm transcripto a partir del gen) cuya expresión se asocia con un trastorno o estado de enfermedad particular, o bien una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso.

Tal como se usa en la presente, el término “ARNip diana” y “ARNhd diana” se refiere a un compuesto que es alcanzado por un compuesto REVERSIR.

Tal como se usa en la presente, el término “direccionar” o “direccionado a” se refiere a la asociación de la hebra antisentido de un ARNhd con una

molécula de ácido nucleico diana particular o una región particular de nucleótidos dentro de una molécula de ácido nucleico diana.

Tal como se usa en la presente, el término “complementariedad de nucleobases” se refiere a una nucleobase que tiene la capacidad de formar apareamiento de bases con otra nucleobase. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria a la timina (T). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria al uracilo (U). En determinadas formas de realización, la nucleobase complementaria se refiere a una nucleobase de un compuesto antisentido que tiene la capacidad de formar apareamiento de bases con una nucleobase de su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar uniones de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico diana, entonces la posición de la formación de uniones de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera complementaria en ese par de nucleobases.

Tal como se usa en la presente, el término “nucleobase no complementaria” se refiere a un par de nucleobases que no forman puentes de hidrógeno entre sí o que se otra manera no hibridizan.

Tal como se usa en la presente, el término “complementario” se refiere a la capacidad de un compuesto oligomérico para hibridizar con otro compuesto oligomérico o ácido nucleico a través de complementariedad de nucleobases. En determinadas formas de realización, un compuesto oligomérico y su diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleobases que se pueden unir entre sí para permitir una asociación estable entre el compuesto

antisentido y la diana. Los expertos en el arte reconocen que es posible la inclusión de faltas de complementariedad sin eliminar la capacidad de los compuestos oligoméricos para permanecer en asociación. Por lo tanto, en la presente se describen compuestos oligoméricos que pueden comprender hasta aproximadamente 20% de nucleótidos que presentan faltas de complementariedad (es decir, no son nucleobases complementarias a los nucleótidos correspondientes de la diana). Preferiblemente los compuestos oligoméricos contienen no más de aproximadamente 15%, más preferiblemente no más de aproximadamente 10%, más preferiblemente no más de 5% o ninguna falta de complementariedad. El resto de los nucleótidos son nucleobases complementarias o de otra manera no alteran la hibridización (por ejemplo, bases universales). Los expertos en el arte reconocerían que los compuestos que se proveen en la presente presentan por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o 100% de complementariedad con un ácido nucleico diana.

Los términos “complementario”, “completamente complementario” y “sustancialmente complementario” se pueden usar en la presente para referirse a la complementariedad de bases entre dos oligonucleótidos o polinucleótidos, tal como la hebra antisentido de un agente de ARN de hebra doble y un REVERSIR, como se comprenderá a partir del contexto de su uso.

Tal como se usa en la presente, “hibridización” designa al apareamiento de compuestos oligoméricos complementarios (por ejemplo, una hebra antisentido de un ARNhd y su ácido nucleico diana o un REVERSIR a su ARNhd diana). Sin limitarse a ningún mecanismo en particular, el mecanismo

más común de apareamiento involucra el enlace de hidrógeno, que puede ser un enlace de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen reverso, entre bases de nucleósido o nucleótido (nucleobases) complementarias. Por ejemplo, la base natural adenina es la nucleobase complementaria a las nucleobases naturales timidina y uracilo que se aparean a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La base natural guanina es la nucleobase complementaria a las bases naturales citosina y 5-metil citosina. La hibridización puede ocurrir bajo diversas circunstancias.

Tal como se usa en la presente, el término “hidridiza específicamente” se refiere a la capacidad de un compuesto oligomérico para hibridizar con un sitio de ácido nucleico con mayor afinidad de lo que hibridiza con otro sitio de ácido nucleico. En determinadas formas de realización, la hebra antisentido de un ARNhd hibridiza específicamente con más de un sitio diana.

Tal como se usa en la presente, el término “modulación” se refiere a una perturbación de la función o de la actividad en comparación con el nivel de la función o de la actividad antes de la modulación. Por ejemplo, la modulación incluye el cambio, ya sea un aumento (estimulación o inducción) o una disminución (inhibición o reducción) de la expresión génica. En otro ejemplo, la modulación de la expresión puede incluir alterar la selección del sitio de corte y empalme del procesamiento del pre-ARNm.

Tal como se usa en la presente, el término “expresión” se refiere a todas las funciones y pasos mediante los que la información codificada en un gen se convierte a las estructuras que están presentes y que operan en una célula. Dichas estructuras incluyen, a título enunciativo no taxativo los productos de la transcripción y la traducción.

Tal como se usa en la presente, “variante” se refiere a un transcripto alternativo de ARN que se puede producir a partir de la misma región genómica de ADN. Las variantes incluyen, a título enunciativo no taxativo “variantes de pre-ARNm” que son transcriptos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcriptos producidos a partir del mismo ADN genómico ya sea en su posición de inicio o de terminación y que contienen secuencias tanto intrónicas como exónicas. Las variantes también incluyen, a título enunciativo no taxativo, aquellas con uniones de corte y empalme alternativas, o codones de inicio y de terminación alternativos.

Tal como se usa en la presente, “modificación nucleotídica de alta afinidad” se refiere a un nucleótido que tiene por lo menos una nucleobase, unión internucleosídica o unidad de azúcar modificada, en comparación con los nucleótidos de origen natural, de manera tal que la modificación aumenta la afinidad de un compuesto antisentido, que comprende el nucleótido modificado de alta afinidad, por el ácido nucleico diana. Las modificaciones de alta afinidad incluyen, a título enunciativo no taxativo, los nucleótidos que comprenden azúcares 2′-modificados.

Tal como se usa en la presente, el término “2′-modificado” o “2′-sustituido” designa a un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2′ distinto a H u OH. Los monómeros 2′-modificados, incluyen, a título enunciativo no taxativo, BNA y monómeros (por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos) con sustituyentes en 2′, tales como alilo, amina, azida, tio, O-alilo, O—C_1-C_{10} alquilo, —OCF3, O—$(CH_2)_2$-O—CH_3, 2′-O$(CH_2)_2SCH_3$, O—$(CH_2)_2$-O—N(Rm)(Rn), o O—CH_2-C(═O)—N(Rm)(Rn), donde cada Rm y Rn es, en forma independiente, H o C_1-C_{10} alquilo sustituido o no sustituido. En

determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos comprenden un monómero 2′-modificado que no tiene la fórmula 2′-O$(CH_2)_nH$, donde *n* es entre uno y seis. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos comprenden un monómero 2′-modificado que no tiene la fórmula 2′-OCH_3. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos comprenden un monómero 2′-modificado que no tiene la fórmula o, como otra opción, 2′-O$(CH_2)_2OCH_3$.

Tal como se usa en la presente, el término “ácido nucleico bloqueado” o “LNA” o “nucleósido bloqueado” o “nucleótido bloqueado” se refiere a un nucleósido o un nucleótido donde la parte de furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos de carbono en el anillo de furanosa, formando así un sistema de anillo bicíclico. Los ácidos nucleicos bloqueados también se denominan ácidos nucleicos bicíclicos (BNA).

Tal como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, el término “metilenoxi LNA” solo, se refiere a β-D-metilenoxi LNA.

Tal como se usa en la presente, el término “MOE” se refiere a un sustituyente 2′-O-metoxietilo.

Tal como se usa en la presente, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales de los compuestos activos que conservan la actividad biológica deseada del compuesto activo y que no producen los efectos toxicológicos indeseados del mismo.

Tal como se usa en la presente, el término “estructura de casquete” o “unidad de casquete terminal” se refiere a las modificaciones químicas que se han incorporado en cualquiera de los extremos de un compuesto antisentido.

La expresión “poner en contacto una célula”, tal como poner en contacto

una célula con un REVERSIR, tal como se usa en la presente, incluye poner en contacto una célula mediante cualquier medio posible. El paso de poner en contacto una célula incluye poner en contacto una célula *in vitro* o poner en contacto una célula *in vivo*. El paso de poner en contacto se puede hacer directa o indirectamente. Por lo tanto, por ejemplo, el REVERSIR se puede poner en contacto físico con la célula mediante la persona que lleva a cabo el método, o como alternativa, el REVERSIR se puede poner en una situación que permita o que cause que subsiguientemente se ponga en contacto con la célula.

El paso de poner en contacto una célula *in vitro* se puede realizar, por ejemplo, mediante la incubación de la célula con el REVERSIR. El paso de poner en contacto una célula *in vivo* se puede realizar, por ejemplo, mediante la inyección del REVERSIR en o cerca del tejido donde se localiza la célula, o mediante la inyección del REVERSIR en otra área, por ejemplo, el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de manera tal que el agente alcance subsiguientemente el tejido donde se localiza la célula a ser contactada. También son posibles combinaciones de métodos *in vitro* e *in vivo* para el paso de poner en contacto. Por ejemplo, también se puede poner en contacto una célula *in vitro* con un REVERSIR y subsiguientemente trasplantarse a un sujeto.

En determinadas formas de realización, el paso de poner en contacto una célula con un REVERSIR incluye “introducir” o “administrar el REVERSIR dentro de la célula” facilitando o efectuando la captación o la absorción dentro de la célula. La absorción o la captación de un REVERSIR puede ocurrir a través de difusión no facilitada o procesos celulares activos, o mediante

agentes o dispositivos auxiliares. La introducción de un REVERSIR en una célula puede ser *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, para la introducción *in vivo*, se puede inyectar el REVERSIR en un sitio tisular o administrarse por vis sistémica. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en el arte tales como la electroporación y la lipofección. Más adelante en la presente se describen otras estrategias o bien estas son conocidas en el arte.

El término “nanopartícula lipídica” o “LNP” es una vesícula que comprende una capa lipídica que encapsula una molécula farmacéuticamente activa, tal como una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ARNi o un plásmido del que se transcribe un ARNi. Las LNP se describen en, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.858.225, 6.815.432, 8.158.601 y 8.058.069, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia. En algunas formas de realización, uno o más de los oligonucleótidos (REVERSIR) que inhiben la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) se describen en la presente encapsulados en una LNP.

"Cantidad terapéuticamente eficaz," tal como se usa en la presente, tiene la finalidad de incluir la cantidad de un REVERSIR que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, mediante la disminución, la mejora o el mantenimiento de la enfermedad existente o de uno o más síntomas de la enfermedad). La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo del REVERSIR, de cómo se administra el REVERSIR, de la enfermedad y su severidad y el historial, edad, peso, historial familiar, constitución genética, de los tipos de tratamientos precedentes y concomitantes, si corresponde, y de

otras características individuales del sujeto a ser tratado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" también incluye una cantidad de un REVERSIR que produce algún efecto deseado con una proporción razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento. El REVERSIR que se emplea en los métodos de la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente para producir una proporción razonable de beneficio/riesgo aplicable a dicho tratamiento.

Tal como se usa en la presente, “administrar” significa proveer un agente de ARNi y/o REVERSIR al sujeto animal tal como un humano, e incluye, a título enunciativo no taxativo la administración mediante un profesional médico y la autoadministración.

Tal como se usa en la presente, el término “coadministrar” significa proveer el agente de ARNi y el REVERSIR a un sujeto, tal como un sujeto humano. En determinadas formas de realización, el agente de ARNi y el REVERSIR se administran juntos. En determinadas formas de realización, el agente de ARNi y el REVERSIR se administran por separado. En determinadas formas de realización, el agente de ARNi y el REVERSIR se administran al mismo tiempo. En determinadas formas de realización, el agente de ARNi y el REVERSIR se administran a diferentes tiempos. En determinadas formas de realización, el agente de ARNi y el REVERSIR se administran a través de la misma ruta de administración. En determinadas formas de realización, el agente de ARNi y el REVERSIR se administran a través de diferentes rutas de administración. En determinadas formas de realización, el agente de ARNi y el REVERSIR están contenidos en la misma formulación farmacéutica. En determinadas formas de realización, el agente de ARNi y el REVERSIR están

en formulaciones separadas.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para referirse a aquellos compuestos, materiales (incluyendo sales), composiciones, o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de sujetos humanos y sujetos animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, adecuados para una proporción razonable de beneficio/riesgo.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en la presente significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, asistente de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco, estearato de magnesio, calcio o cinc, o ácido esteárico), o material encapsulador de solvente, implicado en la vehiculización o transporte del compuesto objetivo desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no nocivo para el sujeto que se está tratando. Dichos vehículos son conocidos en el arte. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos para la administración por inyección.

Tal como se usa en la presente, el término "*in vitro*" se refiere a eventos que ocurren en un ambiente artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de ocurrir dentro de un organismo (por ejemplo animal o una planta). Tal como se usa en la presente, el término “*ex vivo*” se refiere a células que se retiran de un organismo vivo y se cultivan fuera del organismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo). Tal como se

usa en la presente, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo (por ejemplo animal, planta y/o microbio).

Tal como se usa en la presente, un “sujeto” es un animal, tal como un mamífero, incluyendo un primate (tal como un humano, un primate no humano, por ejemplo, un mono y un chimpancé), un no primate (tal como una vaca, un cerdo, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de indias, un gato, un perro, una rata, un ratón), o un ave que expresa la secuencia diana universal, ya sea en forma endógena o heteróloga. En una forma de realización, el sujeto es un humano. En algunas formas de realización, el sujeto es una humana femenina. En otras formas de realización, el sujeto es un humano masculino. En una forma de realización, el sujeto es un sujeto adulto. En otra forma de realización, el sujeto es un sujeto pediátrico.

En las jurisdicciones que prohíben el patentamiento de métodos que se practican en el cuerpo humano, el significado de “administrar” una composición a un sujeto humano debe restringirse a la prescripción de una sustancia controlada que un sujeto humano se autoadministrará mediante cualquier técnica (por ejemplo, por vía oral, inhalación, aplicación tópica, inyección, inserción, etc.). Se pretende realizar la interpretación razonable más amplia que sea consistente con las leyes o regulaciones que definen el objeto patentable. En las jurisdicciones que no prohíben el patentamiento de métodos que se practican en el cuerpo humano, la “administración” de las composiciones incluye tanto métodos practicados en el cuerpo humano como así también las actividades anteriores.

Tal como se usa en la presente, el término “administración parenteral”, se refiere a la administración a través de inyección o infusión. La administración

parenteral incluye, a título enunciativo no taxativo, administración subcutánea, administración intravenosa o administración intramuscular.

Tal como se usa en la presente, el término “administración subcutánea” se refiere a la administración justo por debajo de la piel. La “administración intravenosa” significa la administración en una vena.

Tal como se usa en la presente, el término “dosis” se refiere a una cantidad especificada de un agente farmacéutico provisto en una administración única. En determinadas formas de realización, una dosis se puede administrar en dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, cuando se desea una administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se adapta fácilmente a una inyección única. En dichas formas de realización, se pueden usar dos o más inyecciones para conseguir la dosis deseada. En determinadas formas de realización, se puede administrar una dosis en dos o más inyecciones para minimizar la reacción en el sitio de la inyección en una persona.

Tal como se usa en la presente, el término “unidad de dosificación” se refiere a una forma en la que se provee un agente de ARNi y/o REVERSIR. En determinadas formas de realización, una unidad de dosificación es un vial que comprende agente de ARNi y/o REVERSIR liofilizados. En determinadas formas de realización, una unidad de dosificación es un vial que comprende agente de ARNi y/o REVERSIR reconstituidos.

Tal como se usa en la presente, el término “ingrediente farmacéuticamente activo” se refiere a la sustancia en una composición farmacéutica que provee un efecto deseado.

Tal como se usa en la presente, el término “efectos secundarios” se refiere a respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento diferente de los efectos deseados. En determinadas formas de realización, los efectos secundarios incluyen, sin limitación, reacciones en el sitio de la inyección, anormalidades en pruebas de la función hepática, anormalidades en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anormalidades en el sistema nervioso central y miopatías. Por ejemplo, niveles aumentados de aminotransferasas en suero pueden indicar toxicidad hepática o anormalidad de la función hepática. Por ejemplo, bilirrubina aumentada puede indicar toxicidad hepática o anormalidad de la función hepática.

El término “muestra”, tal como se usa en la presente, incluye una recolección de fluidos similares, células, o tejidos aislados de un sujeto, así como fluidos, células, o tejidos presentes en un sujeto. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, líquido cefalorraquídeo, fluidos oculares, linfa, orina, saliva, y similares. Las muestras de tejidos pueden incluir muestras de tejidos, órganos, o regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivar de órganos particulares, partes de órganos, o fluidos o células de esos órganos. En determinadas formas de realización, las muestras pueden derivar del hígado (por ejemplo, hígado entero o ciertos segmentos o ciertos tipos de células en el hígado, tales como, por ejemplo, hepatocitos). En algunas formas de realización, una “muestra derivada de un sujeto” se refiere a orina obtenida del sujeto. Una “muestra derivada de un sujeto” puede referirse a sangre o suero o plasma derivado de sangre del sujeto.

Tal como se usa en la presente, el término “alquilo”, tal como se usa en

la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado saturado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, a título enunciativo no taxativo, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Los grupos alquilo típicamente incluyen entre 1 y aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente entre 1 y aproximadamente 12 átomos de carbono (C1-C12 alquilo) siendo más preferido entre 1 y aproximadamente 6 átomos de carbono. El término “alquilo inferior” tal como se usa en la presente incluye entre 1 y aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, el término “alquenilo”, tal como se usa en la presente, se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene por lo menos un enlace doble carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, a título enunciativo no taxativo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alquenilo típicamente incluyen entre 2 y aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente entre 2 y aproximadamente 12 átomos de carbono siendo más preferido entre 2 y aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, el término “alquinilo”, tal como se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene por lo menos un

enlace triple carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, a título enunciativo no taxativo, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, y similares. Los grupos alquinilo típicamente incluyen entre 2 y aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente entre 2 y aproximadamente 12 átomos de carbono siendo más preferido entre 2 y aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquinilo tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, el término “aminoalquilo” tal como se usa en la presente, se refiere a un radical alquilo sustituido con amino. Este término se refiere a que incluye grupos C1-C12 alquilo que tienen un sustituyente amino en cualquier posición y donde el grupo alquilo une el grupo aminoalquilo a la molécula parental. Las porciones alquilo y/o amino del grupo aminoalquilo además pueden estar sustituidas con grupos sustituyentes.

Tal como se usa en la presente, el término “alifático”, tal como se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono donde la saturación entre dos átomos de carbono cualesquiera es un enlace simple, doble o triple. Un grupo alifático preferiblemente contiene entre 1 y aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente entre 1 y aproximadamente 12 átomos de carbono siendo más preferido entre 1 y aproximadamente 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático puede estar interrumpida con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Dichos grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen sin limitación polialcoxilos, tales como polialquilenglicoles, poliaminas, y poliiminas. Los grupos alifáticos tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente

grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, el término “alicíclico” o “aliciclilo” se refiere a un sistema de anillo cíclico donde el anillo es alifático. El sistema de anillo puede comprender uno o más anillos donde por lo menos un anillo es alifático. Los alicíclicos preferidos incluyen anillos que tienen entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo. Alicíclico tal como se usa en la presente puede incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales. Tal como se usa en la presente, el término “alcoxilo”, tal como se usa en la presente, se refiere a un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno donde el átomo de oxígeno se usa para unir el grupo alcoxilo a una molécula parental. Los ejemplos de grupos alcoxilo incluyen, a título enunciativo no taxativo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, n-butoxilo, sec-butoxilo, ter-butoxilo, n-pentoxilo, neopentoxilo, n-hexoxilo y similares. Los grupos alcoxilo tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales. Tal como se usa en la presente, los términos “halo” y “halógeno”, tal como se usan en la presente, se refieren a un átomo seleccionado entre fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro.

Tal como se usa en la presente, los términos “arilo” y “aromático”, tal como se usan en la presente, se refieren a radicales de sistema de anillos carbocíclicos mono o policíclicos que tienen uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, a título enunciativo no taxativo, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares. Los sistemas de anillos arilos preferidos tienen entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usan en la presente, los términos “aralquilo” y “arilalquilo”, tal como se usan en la presente, se refiere a un radical formado entre un grupo alquilo y un grupo arilo donde el grupo alquilo se usa para unir el grupo aralquilo a una molécula parental. Los ejemplos incluyen, a título enunciativo no taxativo, bencilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales unidos al alquilo, al arilo o a ambos grupos que forman el grupo radical.

Tal como se usa en la presente, el término “radical heterocíclico” tal como se usa en la presente, se refiere a un radical de sistema de anillos mono o policíclicos que incluye por lo menos un heteroátomo y está insaturado, parcialmente saturado o completamente saturado, que incluye de esta manera grupos heteroarilo. Heterocíclico también se refiere a que incluye sistemas de anillos fusionados donde uno o más de los anillos fusionados contienen por lo menos un heteroátomo y los otros anillos pueden contener uno o más heteroátomos u opcionalmente no contienen heteroátomos. Un grupo heterocíclico típicamente incluye por lo menos un átomo seleccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen, [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y similares. Los grupos heterocíclicos tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales. Tal como se usan en la presente, los términos “heteroarilo” y “heteroaromático”, tal como se usan en la presente, se refieren a un radical que comprende un anillo aromático mono o policíclico, sistema de anillos o sistema de anillos fusionados donde por lo

menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo también tiene como intención incluir sistemas de anillos fusionados que incluyen sistemas donde uno o más de los anillos fusionados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo típicamente incluyen un átomo de anillo seleccionado entre azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, a título enunciativo no taxativo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo, y similares. Los radicales heteroarilo pueden estar unidos a una molécula parental directamente o a través de una unidad conectora tal como un grupo alifático o heteroátomo. Los grupos heteroarilo tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, el término “heteroarilalquilo”, tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo heteroarilo tal como se definió precedentemente que tiene un radical alquilo que puede unir el grupo heteroarilalquilo a una molécula parental. Los ejemplos incluyen, a título enunciativo no taxativo, piridinilmetilo, pirimidiniletilo, naftiridinilpropilo y similares. Los grupos heteroarilalquilo tal como se usa en la presente pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales en una o ambas de las porciones heteroarilo o alquilo.

Tal como se usa en la presente, el término “estructura mono o policíclica” como se usa en la presente invención incluye todos los sistemas de anillos que sin individuales o policíclicos que tienen anillos que están fusionados o conectados y se pretende que incluya sistemas de anillos

individuales y mezclados seleccionados de manera individual entre alifático, alicíclico, arilo, heteroarilo, aralquilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroaromático, heteroarilalquilo. Dichas estructuras mono y policíclicas pueden contener anillos que son uniformes o que tienen grados variables de saturación que incluye completamente saturados, parcialmente saturados o completamente insaturados. Cada anillo puede comprender átomos de anillo seleccionados entre C, N, O y S para dar lugar a los anillos heterocíclicos así como anillos que comprenden solo átomos de anillo C que pueden estar presentes en un motivo mezclado tal como por ejemplo bencimidazol donde un anillo tiene solo átomos de anillo carbono y el anillo fusionado tiene dos átomos de nitrógeno. Las estructuras mono o policíclicas pueden estar sustituidas adicionalmente con grupos sustituyentes tales como por ejemplo ftallimida que tiene dos grupos =O unidos a uno de los anillos. En otro aspecto, las estructuras mono o policíclicas pueden estar unidas a una molécula parental directamente a través de un átomo de anillo, a través de un grupo sustituyente o una unidad conectora bifuncional.

Tal como se usa en la presente, el término “acilo”, se refiere a un radical formado por la eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general —C(O)—X donde X típicamente es alifático, alicíclico o aromático. Los ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfinilos aromáticos, sulfinilos alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Los grupos acilos tales como se usan en la presente pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, el término “hidrocarbilo” incluye grupos que comprenden C, O y H. Se incluyen grupos lineales, ramificados y cíclicos

que tienen cualquier grado de saturación. Dichos grupos hidrocarbilos pueden incluir uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S y pueden estar mono o polisustituidos adicionalmente con uno o más grupos sustituyentes.

Tal como se usan en la presente, los términos “sustituyente” y “grupo sustituyente”, tal como se usa en la presente, incluyen grupos que típicamente están agregados a otros grupos o compuestos parentales para aumentar las propiedades deseadas o para brindar efectos deseados. Los grupos sustituyentes pueden ser protegidos o desprotegidos y se pueden agregar a un sitio disponible o a muchos sitios disponibles en un compuesto parental. Los grupos sustituyentes también pueden estar sustituidos adicionalmente con otros grupos sustituyentes y pueden estar unidos directamente o a través de un grupo conector tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo a un compuesto parental. Dichos grupos incluyen sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo (—C(O)Raa), carboxilo (—C(O)O—Raa), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxilo, oxo sustituido (—O—Raa), arilo, aralquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (—NRbbRcc), imino (═NRbb), amido (—C(O)N—RbbRcc o —N(Rbb)C(O)Raa), azido (—N3), nitro (—NO2), ciano (—CN), carbamido (—OC(O)NRbbRcc o —N(Rbb)C(O)ORaa), ureido (—N(Rbb)C(O)NRbbRcc), tioureido (—N(Rbb)C(S)NRbbRcc), guanidinilo (—N(Rbb)C(═NRbb)NRbbRcc), amidinilo (—C(═NRbb)-NRbbRcc o —N(Rbb)C(NRbb)Raa), tiol (—SRbb), sulfinilo (—S(O)Rbb), sulfonilo (—S(O)2Rbb), sulfonamidilo (—S(O)2NRbbRcc o —N(Rbb)S(O)2Rbb) y grupos conjugados. Donde cada Raa, Rbb y Rcc es, en forma independiente, H, un grupo funcional químico opcionalmente unido o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida que incluye sin limitación H, alquilo, alquenilo, alquinilo,

alifático, alcoxilo, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo.

II. Compuestos REVERSIR de la invención

La presente invención provee compuestos REVERSIR que inhiben la actividad inhibidora de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido.

En general, los compuestos REVERSIR de la invención son oligonucleótidos de hebra simple (oligómeros) de entre 16 y 30 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 16 y 24, entre 18 y 22 o entre 18 y 20 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos de hebra simple comprenden una secuencia nucleotídica sustancialmente complementaria a la hebra antisentido de un agente de ARNhd que comprende un modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante. La secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos puede tener por lo menos aproximadamente 90%, por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de complementariedad con la secuencia nucleotídica completa de la hebra antisentido del agente de ARNhd.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR son compuestos oligoméricos químicamente modificados, en comparación con los oligómeros de origen natural, tales como el ADN o el ARN.

Por lo tanto, en cierta forma de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos un nucleótido modificado, es decir, por lo menos un monómero modificado.

En otras formas de realización, sustancialmente todos los nucleótidos del oligonucleótido son nucleótidos modificados, por ejemplo, no más de 5, 4,

3, 2, o 1 de los nucleótidos son nucleótidos no modificados, por ejemplo, sustancialmente todos los nucleótidos comprenden una modificación nucleotídica que se selecciona del grupo que consiste en una modificación con 2'-O-alquilo, una modificación con 2'-alcoxilo sustituido, una modificación con 2'-alquilo sustituido, una modificación con 2'-halo, una modificación con desoxinucleótido, una modificación con D-metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) ácido nucleico bloqueado (LNA), una modificación con 2'-O-(2-Metoxietilo) (MOE), ácido nucleico con puente (2′,4′-BNA), 2′-O-Etilo (cEt), y una modificación con 2'-O-metilo.

En aún otra forma de realización, todos los nucleótidos del oligonucleótido son nucleótidos modificados, por ejemplo, todos los nucleótidos comprenden una modificación nucleotídica que se selecciona del grupo que consiste en una modificación con 2'-O-alquilo, una modificación con 2'-alcoxilo sustituido, una modificación con 2'-alquilo sustituido, una modificación con 2'-halo, una modificación con desoxinucleótido, una modificación con D-metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico con puente (2′,4′-BNA), 2′-O-Etilo (cEt), y una modificación con 2'-O-metilo.

En ciertas de dichas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden una o más modificaciones de alta afinidad. En una forma de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden cuatro modificaciones de alta afinidad. En una forma de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden cinco modificaciones de alta afinidad.

En determinadas formas de realización, dicha modificación de alta afinidad se selecciona entre modificaciones (por ejemplo, nucleósidos y

nucleótidos) que comprenden azúcares 2′-modificados, incluyendo, a título enunciativo no taxativo: BNA y modificaciones (por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos) con sustituyentes en 2′ tales como alilo, amina, azida, tio, O-alilo, O—C_1-C_{10} alquilo, —OCF_3, O—$(CH_2)_2$-O—CH3, 2′-O$(CH_2)_2SCH_3$, O—$(CH_2)_2$-O—N(Rm)(Rn), o O—CH_2-C(═O)—N(Rm)(Rn), donde cada Rm y Rn es, en forma independiente, H o C_1-C_{10} alquilo sustituido o sin sustituir.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden una o más modificaciones con β-D-Metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden una o más modificaciones con α-D-Metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden una o más modificaciones con (S)-cEt.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden una o más modificaciones de alta afinidad con la condición de que el compuesto no comprenda ningún nucleótido que comprenda un 2′-O$(CH_2)_n$H, donde *n* es entre uno y seis.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden una o más modificaciones de alta afinidad con la condición de que el compuesto no comprenda ningún nucleótido que comprenda un 2′-OCH_3 o un 2′-O$(CH_2)_2OCH_3$.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) modificaciones de alta afinidad con la condición de

que el compuesto no comprenda ningún α-L-Metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden una o más modificaciones de alta afinidad con la condición de que el compuesto no comprenda ningún β-D-Metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden una o más modificaciones de alta afinidad con la condición de que el compuesto no comprenda ningún α-L-Metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA ni β-D-Metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA.

En algunas formas de realización, por lo menos uno de los nucleótidos que comprende una modificación nucleotídica de alta afinidad forma un apareamiento de bases con el nucleótido que comprende el nucleótido térmicamente desestabilizante de la hebra antisentido del agente de ARNhd.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos dos modificaciones nucleotídicas de alta afinidad, por ejemplo, LNA. En algunas formas de realización, las por lo menos dos modificaciones nucleotídicas de alta afinidad, por ejemplo, LNA, están en las posiciones 2 y 6; las posiciones 2 y 5; las posiciones 2 y 7; las posiciones 2 y 8; las posiciones 2 y 9; las posiciones 2 y 14; las posiciones 2 y 15; y/o las posiciones 2 y 16, contando desde el extremo 3’ del oligonucleótido.

En una forma de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden cuatro modificaciones de alta afinidad, por ejemplo, cuatro LNA. En una forma de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden cinco modificaciones de alta afinidad, por ejemplo, cinco LNA.

En determinadas formas de realización, las modificaciones nucleotídicas

de alta afinidad, por ejemplo, LNA, están en las posiciones 2, 6, 8, y 14; 2, 4, 5, 6, y 7; 2, 4, 6, 8, y 13; 2, 4, 6, 8, y 14; 2, 4, 6, 8, y 15; 2, 4, 6, 8, y 16; 2, 8, 10, y 14; 2, 4, 6, 8, y 14; o 2, 8, 12, y 14, contando desde el extremo 3' del oligonucleótido.

La porción base de origen natural de un nucleósido típicamente es una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, se puede unir un grupo fosfato a la unidad 2′, 3′ o 5′ hidroxilo del azúcar. En la formación de los oligonucleótidos, aquellos grupos fosfato unen de manera covalente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Entre los oligonucleótidos, habitualmente se refiere que los grupos fosfato forman el esqueleto internucleosídico o internucleotídico del oligonucleótido. La unión o esqueleto de origen natural de ARN y de ADN es una unión fosfodiéster 3′ a 5′.

Además de nucleobases "sin modificar" o "naturales" tales como las nucleobases purinas adenina (A) y guanina (G), y las nucleobases pirimidinas timina (T), citosina (C) y uracilo (U), muchas nucleobases modificadas o miméticos de nucleobases conocidos por aquellos expertos en el arte son aceptadas entre los compuestos descritos en la presente. Las nucleobases sin modificar o naturales pueden ser modificadas o reemplazadas para proveer oligonucleótidos que tienen propiedades mejoradas. Por ejemplo, se pueden preparar oligonucleótidos resistentes a nucleasas con esas bases o con nucleobases sintéticas y naturales (por ejemplo, inosina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina, o tubercidina) y cualquiera de las modificaciones de oligómero descritas en la presente. Como alternativa, se pueden emplear

análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases precedentes y “bases universales”. Cuando se reemplaza una base natural por una base no natural y/o base universal, se dice que el nucleótido comprende una nucleobase modificada y/o una modificación de nucleobase en la presente. La nucleobases modificadas y/o modificaciones de nucleobases también incluyen bases naturales, no naturales y universales, que comprenden unidades conjugadas, por ejemplo un ligando descrito en la presente. Las unidades conjugadas preferidas para la conjugación con nucleobases incluyen grupos amino catiónicos que pueden ser conjugados a la nucleobase mediante un alquilo, alquenilo apropiado o un conector con una unión amida.

Un compuesto REVERSIR como se describe en la presente también puede incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia referidas en el arte simplemente como “base”). Tal como se usa en la presente, nucleobases “sin modificar” o “naturales” incluyen las bases purinas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidinas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas ejemplificativas incluyen, a título enunciativo no taxativo, otras nucleobases sintéticas y naturales tales como inosina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina, tubercidina, 2-(halo)adenina, 2-(alquil)adenina, 2-(propil)adenina, 2-(amino)adenina, 2-(aminoalquill)adenina, 2-(aminopropil)adenina, 2-(metiltio)-N^6-(isopentenil)adenina, 6-(alquil)adenina, 6-(metil)adenina, 7-(deaza)adenina, 8-(alquenilo)adenina, 8-(alquil)adenina, 8-(alquinilo)adenina, 8-(amino)adenina, 8-(halo)adenina, 8-(hidroxil)adenina, 8-(tioalquil)adenina, 8-(tiol)adenina, N^6-(isopentil)adenina, N^6-(metil)adenina, N^6, N^6-(dimetil)adenina, 2-(alquil)guanina,2-(propil)guanina, 6-(alquil)guanina, 6-(metil)guanina, 7-(alquil)guanina, 7-(metil)guanina, 7-(deaza)guanina,

8-(alquil)guanina, 8-(alquenilo)guanina, 8-(alquinilo)guanina, 8-(amino)guanina, 8-(halo)guanina, 8-(hidroxil)guanina, 8-(tioalquil)guanina, 8-(tiol)guanina, N-(metil)guanina, 2-(tio)citosina, 3-(deaza)-5-(aza)citosina, 3-(alquil)citosina, 3-(metil)citosina, 5-(alquil)citosina, 5-(alquinilo)citosina, 5-(halo)citosina, 5-(metil)citosina, 5-(propinil)citosina, 5-(propinil)citosina, 5-(trifluorometil)citosina, 6-(azo)citosina, N^4-(acetil)citosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 2-(tio)uracilo, 5-(metil)-2-(tio)uracilo, 5-(metilaminometil)-2-(tio)uracilo, 4-(tio)uracilo, 5-(metil)-4-(tio)uracilo, 5-(metilaminometil)-4-(tio)uracilo, 5-(metil)-2,4-(ditio)uracilo, 5-(metilaminometil)-2,4-(ditio)uracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-(alquil)uracilo, 5-(alquinilo)uracilo, 5-(alilamino)uracilo, 5-(aminoalil)uracilo, 5-(aminoalquil)uracilo, 5-(guanidinioalquil)uracilo, 5-(1,3-diazol-1-alquil)uracilo, 5-(cianoalquil)uracilo, 5-(dialquilaminoalquil)uracilo, 5-(dimetilaminoalquil)uracilo, 5-(halo)uracilo, 5-(metoxi)uracilo, ácido uracil-5-oxiacético, 5-(metoxicarbonilmetil)-2-(tio)uracilo, 5-(metoxicarbonil-metil)uracilo, 5-(propinil)uracilo, 5-(propinil)uracilo, 5-(trifluorometil)uracilo, 6-(azo)uracilo, dihidrouracilo, N^3-(metil)uracilo, 5-uracilo (es decir, pseudouracilo), 2-(tio)pseudouracilo,4-(tio)pseudouracilo,2,4-(ditio)psuedouracilo,5-(alquil)pseudouracilo, 5-(metil)pseudouracilo, 5-(alquil)-2-(tio)pseudouracilo, 5-(metil)-2-(tio)pseudouracilo, 5-(alquil)-4-(tio)pseudouracilo, 5-(metil)-4-(tio)pseudouracilo, 5-(alquil)-2,4-(ditio)pseudouracilo, 5-(metil)-2,4-(ditio)pseudouracilo, pseudouracilo 1-sustituido, 2(tio)-pseudouracilo1-sustituido, 4-(tio)pseudouracilo 1-sustituido, 2,4-(ditio)pseudouracilo 1-sustituido, 1-(aminocarboniletilenil)-pseudouracilo, 1-(aminocarboniletilenil)-2(tio)-pseudouracilo, 1-(aminocarboniletilenil)-4-(tio)pseudouracilo,

1-(aminocarboniletilenil)-2,4-(ditio)pseudouracilo, 1-(aminoalquilaminocarboniletilenil)-pseudouracilo, 1-(aminoalquilamino-carboniletilenil)-2(tio)-pseudouracilo, 1-(aminoalquilaminocarboniletilenil)-4-(tio)pseudouracilo, 1-(aminoalquilaminocarboniletilenil)-2,4-(ditio)pseudouracilo, 1,3-(diaza)-2-(oxo)-fenoxazin-1-ilo, 1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-ilo, 1,3-(diaza)-2-(oxo)-fentiazin-1-ilo, 1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fentiazin-1-ilo, 1,3-(diaza)-2-(oxo)-fenoxazin-1-ilo 7-sustituido, 1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-ilo 7-sustituido, 1,3-(diaza)-2-(oxo)-fentiazin-1-ilo 7-sustituido, 1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fentiazin-1-ilo 7-sustituido, 7-(aminoalquilhidroxi)-1,3-(diaza)-2-(oxo)-fenoxazin-1-ilo, 7-(aminoalquilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-ilo, 7-(aminoalquilhidroxi)-1,3-(diaza)-2-(oxo)-fentiazin-1-ilo, 7-(aminoalquilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fentiazin-1-ilo, 7-(guanidinioalquilhidroxi)-1,3-(diaza)-2-(oxo)-fenoxazin-1-ilo, 7-(guanidinioalquilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-ilo, 7-(guanidinioalquil-hidroxi)-1,3-(diaza)-2-(oxo)-fentiazin-1-ilo, 7-(guanidinioalquilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fentiazin-1-ilo, 1,3,5-(triaza)-2,6-(dioxa)-naftaleno, inosina, xantina, hipoxantina, nubularina, tubercidina, isoguanisina, inosinilo, 2-aza-inosinilo, 7-deaza-inosinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobencimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo, 3-(metil)isocarboestirililo, 5-(metil)isocarboestirililo, 3-(metil)-7-(propinil)isocarboestirililo, 7-(aza)indolilo, 6-(metil)-7-(aza)indolilo, imidizopiridinilo, 9-(metil)-imidizopiridinilo, pirrolopirizinilo, isocarboestirililo, 7-(propinil)isocarboestirililo, propinil-7-(aza)indolilo, 2,4,5-(trimetil)fenilo, 4-(metil)indolilo, 4,6-(dimetil)indolilo, fenilo, naftalenilo, antracenilo, fenantracenilo, pirenilo, estilbenilo, tetracenilo, pentacenilo, difluorotolilo, 4-

(fluoro)-6-(metil)bencimidazol, 4-(metil)bencimidazol, 6-(azo)timina, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 6-(aza)pirimidina, 2-(amino)purina, 2,6-(diamino)purina, pirimidinas 5-sustituidas, purinas N^2-sustituidas, purinas N^6-sustituidas, purinas O^6-sustituidas, 1,2,4-triazoles sustituidos, pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, 6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, *para*-sustituido-6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, *orto*-sustituido-6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, bis-*orto*-sustituido-6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, *para*-(aminoalquilhidroxi)- 6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, *orto*-(aminoalquilhidroxi)- 6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, bis-*orto*--(aminoalquilhidroxi)- 6-fenil-pirrolo-pirimidin-2-on-3-ilo, piridopirimidin-3-ilo, 2-oxo-7-amino-piridopirimidin-3-ilo, 2-oxo-piridopirimidina-3-ilo, o cualquier derivado O-alquilado o N-alquilado de los mismos. Como alternativa, se pueden emplear análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases precedentes y “bases universales”.

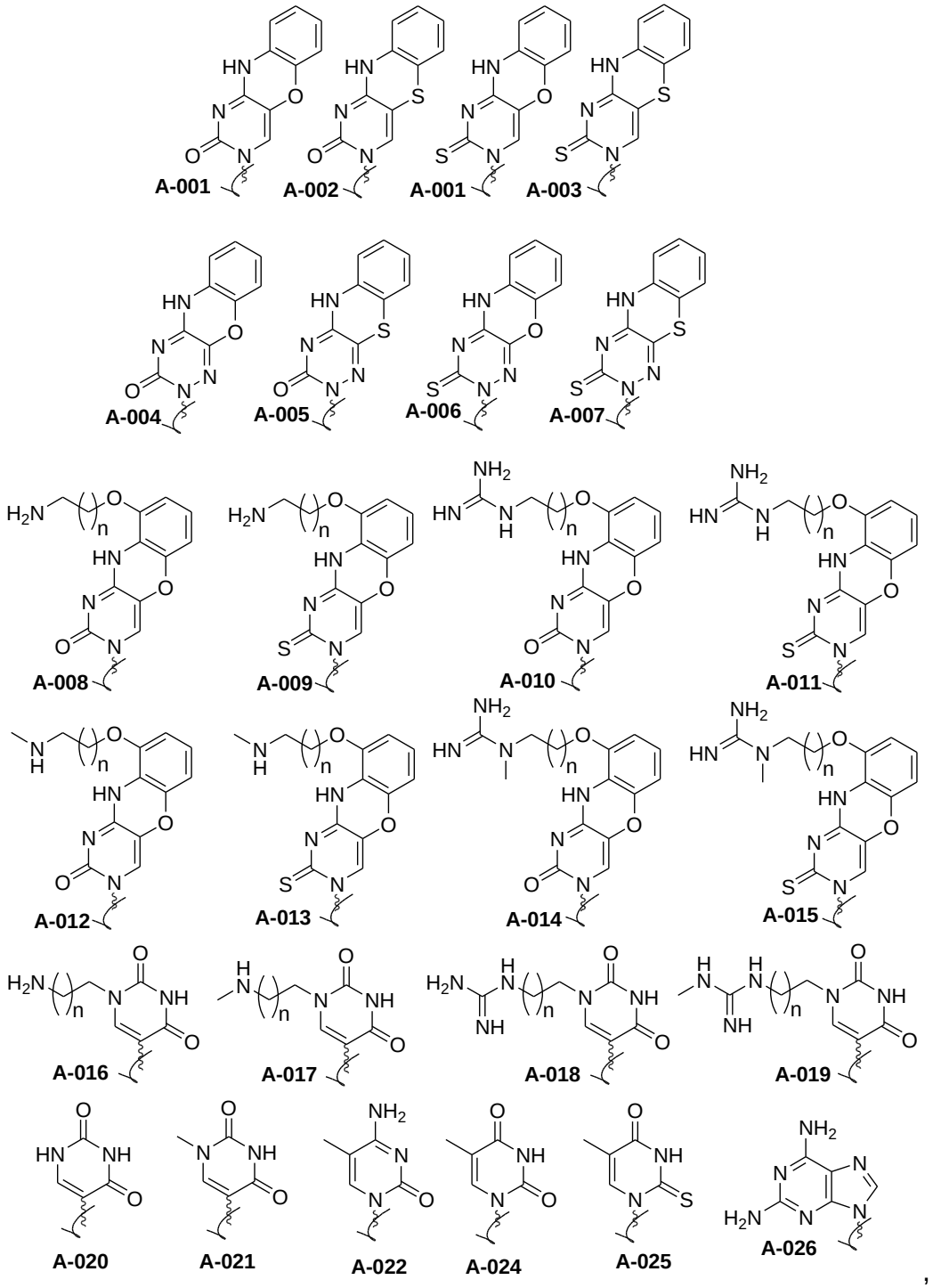
Tal como se usa en la presente, una nucleobase universal es cualquier nucleobase que puede formar apareamiento de bases con las cuatro nucleobases de origen natural sin afectar de manera sustancial el comportamiento de fusión, reconocimiento por enzimas intracelulares o actividad del dúplex del oligonucleótido. Algunas nucleobases universales ejemplificativas incluyen, a título enunciativo no taxativo, 2,4-difluorotolueno, nitropirrolilo, nitroindolilo, 8-aza-7-deazaadenina, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol, 3-metil isocarboestirililo, 5- metil isocarboestirililo, 3-metil-7-propinilisocarboestirililo, 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidizopiridinilo, 9-metil-imidizopiridinilo, pirrolopirizinilo, isocarboestirililo, 7-propinilo isocarboestirililo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilinolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antracenilo, fenantracenilo, pirenilo, estilbenilo,

tetracenilo, pentacenilo y derivados estructurales de los mismos (véase por ejemplo, Loakes, 2001, *Nucleic Acids Research*, 29, 2437-2447).

Otras nucleobases incluyen las que se divulgan en la Patente de los EE.UU. No. 3.687.808; las que se divulgan en la Solicitud Internacional No. PCT/US09/038425, presentada el 26 de marzo de 2009; las que se divulgan en la Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990; las divulgadas por English y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; las que se divulgan en Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijin, P.Ed. Wiley-VCH, 2008; y las divulgadas por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993. Los contenidos de todas las citas precedentes se incorporan a la presente a modo de referencia.

En determinadas formas de realización, una nucleobase modificada es una nucleobase que es prácticamente similar en estructura a la nucleobase parental, tal como por ejemplo una 7-deaza purina, una 5-metil citosina, o una pinza G. En determinadas formas de realización, los miméticos de nucleobase incluyen estructuras más complicadas, tales como por ejemplo un mimético de nucleobase de tricíclico fenoxazina. Los métodos para la preparación de las nucleobases modificadas anteriormente indicadas son bien conocidos para los expertos en el arte.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) nucleobase pinza G que se selecciona entre las siguientes:



,

donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Los compuestos REVERSIR que se proveen en la presente pueden comprender uno o más monómeros, incluyendo un nucleósido o nucleótido,

que tiene una unidad de azúcar modificada. Por ejemplo, el anillo de azúcar de furanosilo de un nucleósido se puede modificar de varias maneras incluyendo, a título enunciativo no taxativo, mediante el agregado de un grupo sustituyente, el puente entre dos átomos de anillo no geminales para formar un ácido nucleico bloqueado o ácido nucleico bicíclico. En determinadas formas de realización, los compuestos comprenden uno o más monómeros que son LNA.

En algunas formas de realización de un ácido nucleico bloqueado, la posición 2' del furanosilo está conectada a la posición 4' mediante un conector que se selecciona en forma independiente entre $–[C(R1)(R2)]_n–$, $–[C(R1)(R2)]_n–O–$, $–[C(R1)(R2)]_n$-N(R1)–, $–[C(R1)(R2)]_n$-N(R1)–O-, $—[C(R1R2)]_n$-O-N(R1)—, –C(R1)=C(R2)–O–, –C(R1)=N–, –C(R1)=N–O-, —C(═NR1)-, —C(═NR1)-O-, —C(═O)—, —C(═O)O—, —C(═S)—, —C(═S)O—, —C(═S)S—, —O—, —Si(R1)2-, $—S(═O)_x$- y —N(R1)-;

en donde:

x es 0, 1, o 2;

n es 1, 2, 3, o 4;

cada R1 y R2 es, en forma independiente, H, un grupo protector, hidroxilo, C1-C12 alquilo, C1-C12 alquilo sustituido, C2-C12 alquenilo, C2-C12 alquenilo sustituido, C2-C12 alquinilo, C2-C12 alquinilo sustituido, C5-C20 arilo, C5-C20 arilo sustituido, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical C5-C7 alicíclico, radical C5-C7 alicíclico sustituido, halógeno, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, COOJ1, acilo (C(═O)—H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(═O)2-J1), o sulfoxilo (S(═O)-J1); y

cada J1 y J2 es, en forma independiente, H, C1-C12 alquilo, C1-C12 alquilo sustituido, C2-C12 alquenilo, C2-C12 alquenilo sustituido, C2-C12

alquinilo, C2-C12 alquinilo sustituido, C5-C20 arilo, C5-C20 arilo sustituido, acilo (C(═O)—H), acilo sustituido, un radical heterocíclico, un radical heterocíclico sustituido, C1-C12 aminoalquilo, C1-C12 aminoalquilo sustituido o un grupo protector.

En una forma de realización, cada uno de los conectores de los compuestos LNA es, en forma independiente, —[C(R1)(R2)]n-, —[C(R1)(R2)]n-O—, —C(R1R2)-N(R1)-O— o —C(R1R2)-O—N(R1)-. En otra forma de realización, cada uno de dichos conectores es, en forma independiente, 4′-CH_2-2′, 4′-$(CH_2)_2$-2′, 4′-$(CH_2)_3$-2′, 4′-CH_2-O-2′, 4′-$(CH_2)_2$-O-2′, 4′-CH_2-O—N(R1)-2′ y 4′-CH_2-N(R1)-O-2′- donde cada R1 es, en forma independiente, H, un grupo protector o C1-C12 alquilo.

Ciertos LNA han sido preparados y descritos en la literatura de patentes así como en literatura científica (Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y col., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; WO 94/14226; WO 2005/021570; Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; los ejemplos de patentes de los EE.UU. presentadas y solicitudes publicadas que describen LNA incluyen, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 7.053.207; 6.268.490; 6.770.748; 6.794.499; 7.034.133; y 6.525.191; y las Publicaciones presubsidio de los EE.UU. Nos. 2004-0171570; 2004-0219565; 2004-0014959; 2003-0207841; 2004-0143114; y 20030082807.

En la presente también se proveen LNA en los cuales el grupo 2′-hidroxilo del anillo de azúcar ribosilo está conectado al átomo de carbono 4′ del anillo de azúcar formando de esa manera una unión metilenoxilo (4′-CH_2-O-2′)

para formar la unidad de azúcar bicíclica (revisión en Elayadi y col., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch y col., Chem. Biol., 2001, 8 1-7; y Orum y col., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; véanse también las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.268.490 y 6.670.461). La unión puede ser un grupo metileno (—CH_2-) que forma puente entre el átomo de oxígeno 2′ y el átomo de carbono 4′, para el cual se usa el término metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA para la unidad bicíclica; en el caso de un grupo etileno en esta posición, se usa el término etilenoxi (4′-CH_2CH_2-O-2′) LNA (Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456: Morita y col., Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2226). El metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA y otros análogos de azúcar bicíclicos presentan estabilizades térmicas del dúplex muy elevadas con ADN y ARN complementarios (Tm=+3 a +10° C.), estabilidad contra la degradación 3′-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. Se han descrito oligonucleótidos antisentido potentes y no tóxicos que comprenden BNA (Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638).

Un isómero de metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA que también ha sido descrito es el alfa-L-metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA que ha mostrado tener estabilidad superior contra una 3′-exonucleasa. Los alfa-L-metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA fueron incorporados en gápmeros (*gapmers*) antisentido y quimeras que muestran potente actividad antisentido (Frieden y col., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

Se ha descrito la síntesis y preparación de los monómeros de metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización, y propiedades de reconocimiento de ácido nucleico (Koshkin y col., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). También se

describen los BNA y la preparación de los mismos en WO 98/39352 y WO 99/14226.

También se han preparado análogos de metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA, fosforotioato-metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA y 2′-tio-LNA (Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos de polimerasas de ácido nucleico (Wengel y col., WO 99/14226). Además, en el arte se ha descrito la síntesis de 2′-amino-LNA, un análogo de oligonucleótido de alta afinidad con restricción conformacional novedoso (Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2′-amino- y 2′-metilamino-LNA y la estabilidad térmica de sus dúplex con hebras complementarias de ARN y ADN se ha informado previamente.

Las unidades azúcar modificadas son bien conocidas y se pueden usar para alterar, típicamente aumentar, la afinidad del compuesto antisentido por su diana y/o aumentar la resistencia a nucleasa. Una lista representativa de azúcares modificados preferidos incluye a título enunciativo no taxativo azúcares modificados bicíclicos, que incluyen metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA y etilenoxi (4′-$(CH_2)_2$-O-2′ puente) ENA; azúcares sustituidos, especialmente azúcares 2′-sustituidos que tienen un grupo sustituyente 2′-F, 2′-OCH_3 o uno 2′-$O(CH_2)_2$-OCH_3; y azúcares modificados con 4′-tio. Los azúcares también se pueden reemplazar por grupos miméticos de azúcares entre otros. Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos para los expertos en el arte. Algunas patentes y publicaciones representativas que divulgan la preparación de dichos azúcares modificados incluyen, a título

enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; 5.700.920; 6.531.584 y 6.600.032; y WO 2005/121371.

Los ejemplos de modificaciones de grupo “oxi”-2’ hidroxilo incluyen alcoxilo o ariloxilo (OR, por ejemplo, R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, n =1-50; ácidos nucleicos “bloqueados” (LNA) en los cuales la parte de furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos de carbono en el anillo de furanosa, formando de esta manera un sistema de anillo bicíclico; O-AMINA o $O-(CH_2)_n$AMINA (n = 1-10, AMINA = NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, etilendiamina o poliamino); y $O-CH_2CH_2(NCH_2CH_2NMe_2)_2$.

Las modificaciones “desoxi” incluyen hidrógeno (es decir azúcares desoxirribosa, que son de relevancia particular para las sobreextensiones de hebra simple); halo (por ejemplo, fluoro); amino (por ejemplo NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$-AMINE (AMINE = NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino); -NHC(O)R (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxilo; tioalquilo; alquilo; cicloalquilo; arilo; alquenilo y alquinilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos por ejemplo, con una funcionalidad amino.

Otras 2’-modificaciones adecuadas, por ejemplo, MOE modificado, se

describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20130130378, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia.

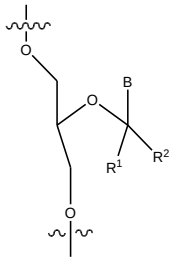
Una modificación en la posición 2' puede estar presente en la configuración de arabinosa donde el término "configuración de arabinosa" se refiere a la ubicación de un sustituyente en el C2' de la ribosa en la misma configuración que el 2'-OH se encuentra en la arabinosa.

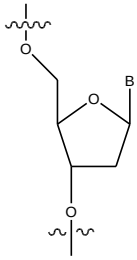
El azúcar puede comprender dos modificaciones diferentes en el mismo carbono en el azúcar, por ejemplo, modificación *gem*. El grupo azúcar también puede contener uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta respecto al carbono correspondiente en la ribosa. Por lo tanto, un compuesto REVERSIR puede incluir uno o más monómeros que contienen por ejemplo, arabinosa, como el azúcar. El monómero puede tener una unión alfa en la posición 1' en el azúcar, por ejemplo, alfa-nucleósidos. El monómero también puede tener la configuración opuesta en la posición 4', por ejemplo, C5' y H4' o sustituyentes que los reemplazan están intercambiados entre sí. Cuando el C5' y H4' o sustituyentes que los reemplazan están intercambiados entre sí, se dice que el azúcar está modificado en la posición 4'.

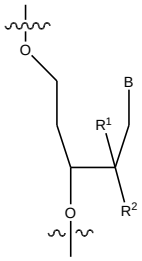
Los compuestos REVERSIR de la invención también pueden incluir azúcares abásicos, es decir, un azúcar que carece de una nucleobase en el C-1' o tiene otros grupos químicos en lugar de una nucleobase en C1'. Véase por ejemplo la Patente de los EE.UU. No. 5.998.203, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad. Estos azúcares abásicos también pueden contener de manera adicional modificaciones en uno o más de los átomos del azúcar constituyente. Los compuestos REVERSIR también pueden

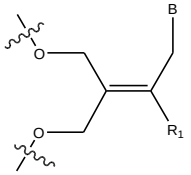
contener uno o más azúcares que son el isómero L, por ejemplo L-nucleósidos. La modificación del grupo azúcar también puede incluir el reemplazo del 4'-O por un azufre, nitrógeno opcionalmente sustituido o grupo CH_2. En algunas formas de realización, la unión entre el C1' y la nucleobase tiene la configuración α.

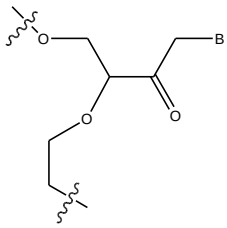
Las modificaciones del azúcar también pueden incluir nucleótidos acíclicos, donde un enlace C-C entre carbonos de la ribosa (por ejemplo, C1'-C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4', C1'-O4') está ausente y/o por lo menos uno de los carbonos u el oxígeno de la ribosa (por ejemplo, C1', C2', C3', C4' o O4') están independientemente o en combinación ausentes del nucleótido. En algunas formas de realización, un nucleótido acíclico es



,


,


,


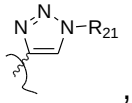
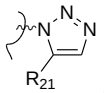
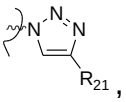
o


,

donde B es una nucleobase modificada o sin modificar, R_1 y R_2 independientemente son H, halógeno, OR_3, o alquilo; y R_3 es H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar).

En algunas formas de realización, las modificaciones del azúcar se seleccionan del grupo que consiste en 2'-H, 2′-*O*-Me (2′-*O*-metil), 2′-*O*-MOE (2′-*O*-metoxietil), 2'-F, 2′-*O*-[2-(metilamino)-2-oxoetil] (2′-*O*-NMA), 2'-*S*-metilo, 2'-O-CH_2-(4'-C) (LNA), 2'-O-CH_2CH_2-(4'-C) (ENA), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) y *gem* 2'-OMe/2'F con 2'-O-Me en la configuración de arabinosa.

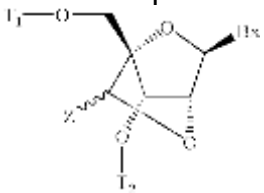
Se debe comprender que cuando un nucleótido particular está unido a través de su posición 2’ al próximo nucleótido, las modificaciones del azúcar descritas en la presente pueden ubicarse en la posición 3’ del azúcar para ese nucleótido particular, por ejemplo, el nucleótido que está unido a través de su posición 2’. Una modificación en la posición 3’ puede estar presente en la configuración de xilosa donde el término “configuración de xilosa” se refiere a la ubicación de un sustituyente en el C3’ de la ribosa en la misma configuración que se encuentra el 3’-OH en el azúcar xilosa.

El hidrógeno unido al C4’ y/o C1’ puede reemplazarse por un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, donde el esqueleto del alquilo, alquenilo y alquinilo pueden contener uno o más de O, S, S(O), SO_2, N(R’), C(O), N(R’)C(O)O, OC(O)N(R’), CH(Z’), unión que contiene fósforo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocíclico opcionalmente sustituido o cicloalquilo opcionalmente sustituido, donde R’ es hidrógeno, acilo o alifático opcionalmente sustituido, Z’ se selecciona del grupo que consiste en OR_{11}, COR_{11}, CO_2R_{11},  ,  ,  ,  , $NR_{21}R_{31}$, $CONR_{21}R_{31}$, $CON(H)NR_{21}R_{31}$, $ONR_{21}R_{31}$, $CON(H)N=CR_{41}R_{51}$, $N(R_{21})C(=NR_{31})NR_{21}R_{31}$, $N(R_{21})C(O)NR_{21}R_{31}$, $N(R_{21})C(S)NR_{21}R_{31}$, $OC(O)NR_{21}R_{31}$, $SC(O)NR_{21}R_{31}$, $N(R_{21})C(S)OR_{11}$, $N(R_{21})C(O)OR_{11}$, $N(R_{21})C(O)SR_{11}$, $N(R_{21})N=CR_{41}R_{51}$, $ON=CR_{41}R_{51}$, SO_2R_{11}, SOR_{11}, SR_{11}, y heterocíclico sustituido o sin sustituir; R_{21} y R_{31} en cada aparición son independientemente hidrógeno, acilo, alifático sustituido o sin sustituir, arilo, heteroarilo, heterocíclico, OR_{11}, COR_{11}, CO_2R_{11}, o $NR_{11}R_{11}$’; o R_{21} y R_{31}, en conjunto con los átomos a los cuales están unidos, forman un anillo

heterocíclico; R_{41} y R_{51} en cada aparición son independientemente hidrógeno, acilo, alifático sustituido o sin sustituir, arilo, heteroarilo, heterocíclico, OR_{11}, COR_{11}, o CO_2R_{11}, o $NR_{11}R_{11}$'; y R_{11} y R_{11}' son independientemente hidrógeno, alifático, alifático sustituido, arilo, heteroarilo, o heterocíclico. En algunas formas de realización, el hidrógeno unido al C4' del nucleótido terminal 5' está reemplazado.

En algunas formas de realización, C4' y C5' juntos forman un heterocíclico opcionalmente sustituido, que comprende preferiblemente por lo menos un -PX(Y)-, donde X es H, OH, OM, SH, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxilo opcionalmente sustituido, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido o dialquilamino opcionalmente sustituido, donde M es independientemente en cada aparición un metal alcalino o metal de transición con una carga total de +1; e Y es O, S, o NR', donde R' es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido. Preferiblemente esta modificación se encuentra en el extremo terminal 5' del oligonucleótido.

En determinadas formas de realización, los LNA incluyen nucleótidos bicíclicos que tienen la fórmula:



en donde:

Bx es una unidad base heterocíclica;

T1 es H o un grupo protector de hidroxilo;

T2 es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo fósforo reactivo;

Z es C1-C6 alquilo, C2-C6 alquenilo, C2-C6 alquinilo, C1-C6 alquilo sustituido, C2-C6 alquenilo sustituido, C2-C6 alquinilo sustituido, acilo, acilo sustituido, o amida sustituida.

En una forma de realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, en forma independiente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos independientemente seleccionados entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 y CN, donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es O, S o NJ1.

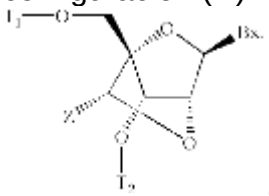
En ciertas de dichas formas de realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, en forma independiente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados en forma independiente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, y NJ3C(=X)NJ1J2, donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H, C1-C6 alquilo, o C1-C6 alquilo sustituido y X es O o NJ 1.

En determinadas formas de realización, el grupo Z es C1-C6 alquilo sustituido con uno o más Xx, donde cada Xx es en forma independiente OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 o CN; donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es O, S o NJ1. En otra forma de realización, el grupo Z es C1-C6 alquilo sustituido con uno o más Xx, donde cada Xx es en forma independiente halo (por ejemplo, fluoro), hidroxilo, alcoxilo (por ejemplo, CH3O—),alcoxilo o azido sustituido.

En determinadas formas de realización, el grupo Z es —CH2Xx, donde Xx es OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 o CN; donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es

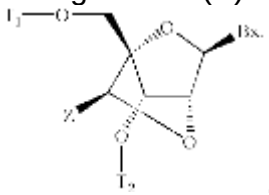
O, S o NJ1. En otra forma de realización, el grupo Z es —CH2Xx, donde Xx es Halo (por ejemplo, fluoro), hidroxilo, alcoxilo (por ejemplo, CH3O—) o azido.

En ciertas de dichas formas de realización, el grupo Z tiene la configuración (R):



.

En ciertas de dichas formas de realización, el grupo Z es tiene la configuración (S):



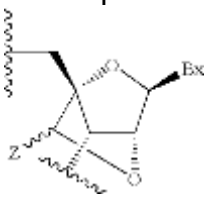
.

En determinadas formas de realización, cada T1 y T2 es un grupo protector de hidroxilo. Una lista preferida de grupos protectores de hidroxilo incluye bencilo, benzoilo, 2,6-diclorobencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, mesilato, tosilato, dimetoxitritilo (DMT), 9-fenilxantina-9-yl (Pixil) y 9-(p-metoxifenil)xantina-9-ilo (MOX). En determinadas formas de realización, T1 es un grupo protector de hidroxilo seleccionado entre acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo y dimetoxitritilo donde un grupo protector de hidroxilo más preferido es T1 que es 4,4′-dimetoxitritilo.

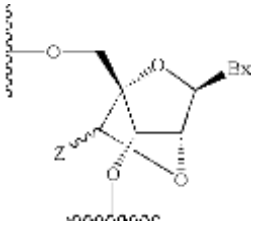
En determinadas formas de realización, T2 es un grupo fósforo reactivo donde los grupos fósforo reactivos preferidos incluyen diisopropilcianoetoxifosforamidita y H-fosfonato. En determinadas formas de realización T1 es 4,4′-dimetoxitritilo y T2 es diisopropilcianoetoxifosforamidita.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR

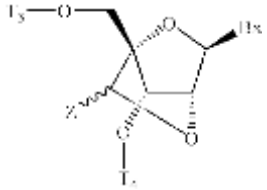
tienen por lo menos un monómero de la fórmula:



o de la fórmula:



o de la fórmula:



donde

Bx es una unidad base heterocíclica;

T3 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo conector internucleosídico unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

T4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo conector internucleosídico unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

donde por lo menos uno de T3 y T4 es un grupo conector internucleosídico unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un

compuesto oligomérico; y

Z es C1-C6 alquilo, C2-C6 alquenilo, C2-C6 alquinilo, C1-C6 alquilo sustituido, C2-C6 alquenilo sustituido, C2-C6 alquinilo sustituido, acilo, acilo sustituido, o amida sustituida.

En una forma de realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, en forma independiente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos seleccionados en forma independiente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 y CN, donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es O, S o NJ1.

En una forma de realización, cada uno de los grupos sustituidos, está, en forma independiente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados en forma independiente entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, y NJ3C(=X)NJ1J2, donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es O o NJ1.

En ciertas de dichas formas de realización, por lo menos un Z es C1-C6 alquilo o C1-C6 alquilo sustituido. En determinadas formas de realización, cada Z es, en forma independiente, C1-C6 alquilo o C1-C6 alquilo sustituido. En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es C1-C6 alquilo. En determinadas formas de realización, cada Z es, en forma independiente, C1-C6 alquilo. En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es metilo. En determinadas formas de realización, cada Z es metilo. En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es etilo. En determinadas formas de realización, cada Z es etilo. En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es C1-C6 alquilo sustituido. En determinadas formas de

realización, cada Z es, en forma independiente, C1-C6 alquilo sustituido. En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es metilo sustituido. En determinadas formas de realización, cada Z es metilo sustituido. En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es etilo sustituido. En determinadas formas de realización, cada Z es etilo sustituido.

En determinadas formas de realización, por lo menos un grupo sustituyente es C1-C6 alcoxilo (por ejemplo, por lo menos un Z es C1-C6 alquilo sustituido con uno o más C1-C6 alcoxilo). En otra forma de realización, cada grupo sustituyente es, en forma independiente, C1-C6 alcoxilo (por ejemplo, cada Z es, en forma independiente, C1-C6 alquilo sustituido con uno o más C1-C6 alcoxilo).

En determinadas formas de realización, por lo menos un grupo sustituyente C1-C6 alcoxilo es CH3O— (por ejemplo, por lo menos un Z es CH_3OCH_2-). En otra forma de realización, cada grupo sustituyente C1-C6 alcoxilo es CH_3O— (por ejemplo, cada Z es CH_3OCH_2-).

En determinadas formas de realización, por lo menos un grupo sustituyente es Halógeno (por ejemplo, por lo menos un Z es C1-C6 alquilo sustituido con uno o más halógeno). En determinadas formas de realización, cada grupo sustituyente es, en forma independiente, halógeno (por ejemplo, cada Z es, en forma independiente, C1-C6 alquilo sustituido con uno o más halógeno). En determinadas formas de realización, por lo menos un grupo sustituyente halógeno es fluoro (por ejemplo, por lo menos un Z es CH_2FCH_2-, CHF_2CH_2- o CF_3CH_2-). En determinadas formas de realización, cada grupo sustituyente halo es fluoro (por ejemplo, cada Z es, en forma independiente, CH_2FCH_2-, CHF_2CH_2- o CF_3CH_2-).

En determinadas formas de realización, por lo menos un grupo sustituyente es Hidroxilo (por ejemplo, por lo menos un Z es C1-C6 alquilo sustituido con uno o más hidroxilo). En determinadas formas de realización, cada grupo sustituyente es, en forma independiente, hidroxilo (por ejemplo, cada Z es, en forma independiente, C1-C6 alquilo sustituido con uno o más hidroxilo). En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es $HOCH_2$-. En otra forma de realización, cada Z es $HOCH_2$-.

En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es CH_3-, CH_3CH_2-, CH_2OCH_3-, CH_2F— o $HOCH_2$-. En determinadas formas de realización, cada Z es, en forma independiente, CH_3-, CH_3CH_2-, CH_2OCH_3-, CH_2F— o $HOCH_2$-.

En determinadas formas de realización, por lo menos un grupo Z es C1-C6 alquilo sustituido con uno o más Xx, donde cada Xx es, en forma independiente, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 o CN; donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es O, S o NJ1. En otra forma de realización, por lo menos un grupo Z es C1-C6 alquilo sustituido con uno o más Xx, donde cada Xx es, en forma independiente, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxilo, alcoxilo (por ejemplo, CH3O—) o azido.

En determinadas formas de realización, cada grupo Z es, en forma independiente, C1-C6 alquilo sustituido con uno o más Xx, donde cada Xx es en forma independiente OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 o CN; donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es O, S o NJ1. En otra forma de realización, cada grupo Z es, en forma independiente, C1-C6 alquilo sustituido con uno o más Xx, donde

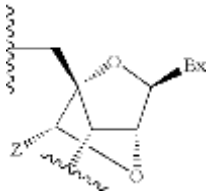
cada Xx es en forma independiente halo (por ejemplo, fluoro), hidroxilo, alcoxilo (por ejemplo, CH3O—) o azido.

En determinadas formas de realización, por lo menos un grupo Z es —CH_2Xx, donde Xx es OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 o CN; donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es O, S o NJ1 En determinadas formas de realización, por lo menos un grupo Z es —CH_2Xx, donde Xx es Halo (por ejemplo, fluoro), hidroxilo, alcoxilo (por ejemplo, CH_3O—) o azido.

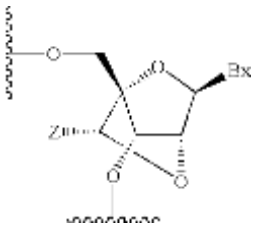
En determinadas formas de realización, cada grupo Z es, en forma independiente, —CH_2Xx, donde cada Xx es, en forma independiente, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 o CN; donde cada J1, J2 y J3 es, en forma independiente, H o C1-C6 alquilo, y X es O, S o NJ1. En otra forma de realización, cada grupo Z es, en forma independiente, —CH_2Xx, donde cada Xx es, en forma independiente, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxilo, alcoxilo (por ejemplo, CH_3O—) o azido.

En determinadas formas de realización, por lo menos un Z es CH_3-. En otra forma de realización, cada Z es, CH_3.

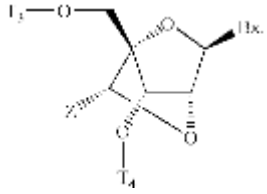
En determinadas formas de realización, el grupo Z de por lo menos un monómero tiene la configuración (R) representado por la fórmula:



o la fórmula:



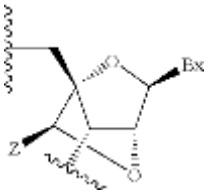
o la fórmula:



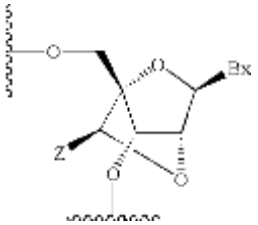
.

En determinadas formas de realización, el grupo Z de cada monómero de la fórmula tiene la configuración (R).

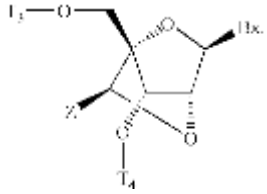
En determinadas formas de realización, el grupo Z de por lo menos un monómero tiene la configuración (S) representado por la fórmula:



o la fórmula:



o la fórmula:

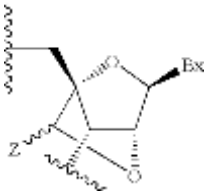


En determinadas formas de realización, el grupo Z de cada monómero de la fórmula tiene la configuración (S).

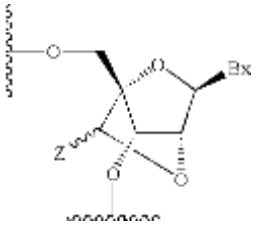
En determinadas formas de realización, T3 es H o un grupo protector de

hidroxilo. En determinadas formas de realización, T4 es H o un grupo protector de hidroxilo. En otra forma de realización T3 es un grupo conector internucleosídico unido a un nucleósido, un nucleótido o una subunidad monomérica. En determinadas formas de realización, T4 es un grupo conector internucleosídico unido a un nucleósido, un nucleótido o una subunidad monomérica. En determinadas formas de realización, T3 es un grupo conector internucleosídico unido a un oligonucleósido o un oligonucleótido. En determinadas formas de realización, T4 es un grupo conector internucleosídico unido a un oligonucleósido o un oligonucleótido. En determinadas formas de realización, T3 es un grupo conector internucleosídico unido a un compuesto oligomérico. En determinadas formas de realización, T4 es un grupo conector internucleosídico unido a un compuesto oligomérico. En determinadas formas de realización, por lo menos uno de T3 y T4 comprende un grupo conector internucleotídico seleccionado entre fosfodiéster o fosforotioato.

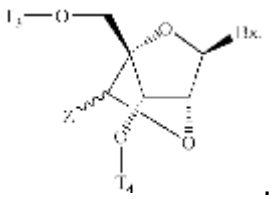
En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR tienen por lo menos una región de por lo menos dos monómeros contiguos de la fórmula:



o de la fórmula:



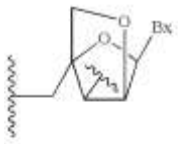
o de la fórmula:



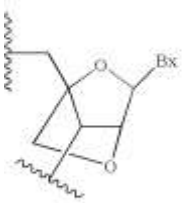
.

En ciertas de dichas formas de realización, los LNA incluyen, a título enunciativo no taxativo, (A) α-L-Metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA, (B) β-D-Metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) LNA, (C) Etilenoxi (4′-(CH2)2-O-2′) LNA, (D) Aminooxi (4′-CH2-O—N(R)-2′) LNA y (E) Oxiamino (4′-CH2-N(R)—O-2′) LNA, como se describe a continuación:

(A)



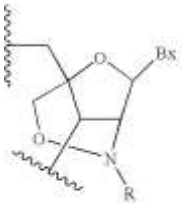
(B)



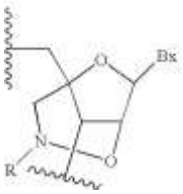
(C)



(D)

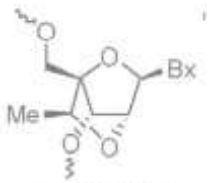


(E)



En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos dos regiones de por lo menos dos monómeros contiguos de la fórmula precedente. En determinadas formas de realización, el compuesto comprende un compuesto oligomérico con falta de complementariedad. En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos una región de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 14 nucleósidos β-D-2′-desoxirribofuranosilo contiguos. En determinadas formas de realización, el compuesto comprende por lo menos una región de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 12 nucleósidos β-D-2′-desoxirribofuranosilo contiguos.

En determinadas formas de realización, el compuesto REVERSIR comprende por lo menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) monómero S-cEt de la fórmula:

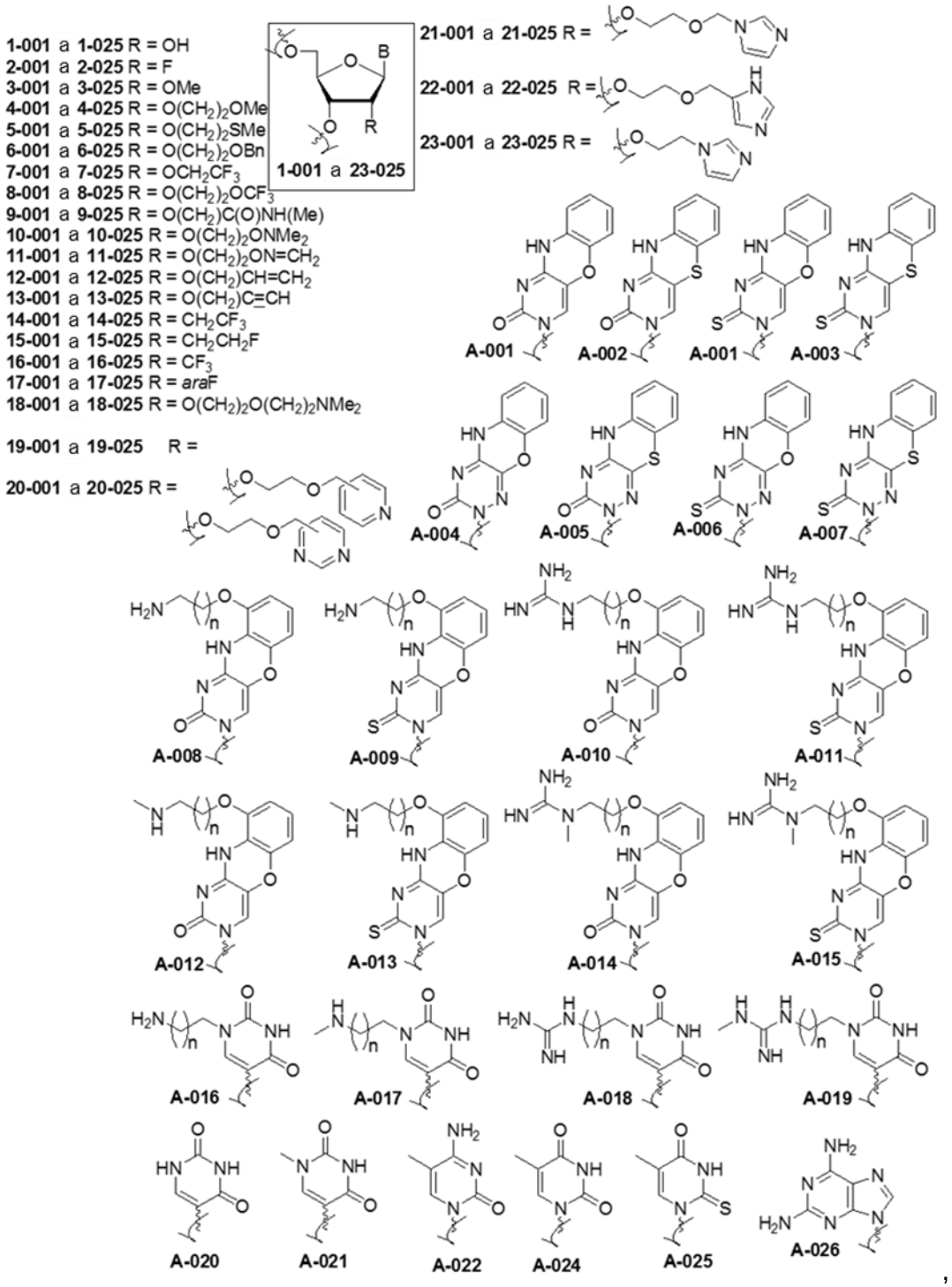


S-cEt (C)

.

donde Bx es una unidad base heterocíclica.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) nucleótido seleccionado entre los siguientes:



,

donde B es A-001 a A-026 y n es 0 a 6 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6).

En determinadas formas de realización, los monómeros incluyen miméticos de azúcar. En ciertas de dichas formas de realización, se usa un

mimético en lugar del azúcar o combinación azúcar-unión internucleosídica, y la nucleobase se mantiene para la hibridización con una diana seleccionada. Los ejemplos representativos de un mimético de azúcar incluyen, a título enunciativo no taxativo, ciclohexenilo o morfolino. Los ejemplos representativos de un mimético para una combinación azúcar-unión internucleosídica incluyen, a título enunciativo no taxativo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y grupos morfolino unidos mediante uniones aquirales no cargadas. En algunos casos, se usa un mimético en lugar de la nucleobase. Los miméticos de nucleobase representativos son bien conocidos en el arte e incluyen, a título enunciativo no taxativo, análogos de fenoxazina tricíclica y bases universales (Berger y col., Nuc Acid Res. 2000, 28:2911-14, que se incorpora a la presente a modo de referencia). Los métodos de síntesis de azúcar, nucleósido, nucleótido y miméticos de nucleobase son bien conocidos para los expertos en el arte.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos un monómero que es LNA y por lo menos una nucleobase pinza G. Por ejemplo, el compuesto REVERSIR puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más monómeros que son LNA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más nucleobases pinza G.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) monómero de ácido nucleico peptídico. En determinadas formas de realización, el compuesto REVERSIR comprende por lo menos un monómero que es LNA y por lo menos un monómero que es PNA. Por ejemplo, el compuesto REVERSIR puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más monómeros que son LNA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más monómeros que son PNA.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos un monómero PNA y por lo menos una nucleobase pinza G. Por ejemplo, el compuesto REVERSIR puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más monómeros PNA y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más nucleobases pinza G.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos un monómero LNA, por lo menos un monómero PNA y por lo menos una nucleobase pinza G. Por ejemplo, el compuesto REVERSIR puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más monómeros LNA; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más monómeros PNA y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más nucleobases pinza G.

En la presente se describen grupos conectores que unen monómeros (que incluyen, a título enunciativo no taxativo, nucleósidos y nucleótidos modificados y no modificados) juntos, formando de esta manera un compuesto oligomérico, es decir, un compuesto REVERSIR que comprende un oligonucleótido. Dichos grupos conectores también se conocen como unión interazúcar. Las dos clases principales de grupos conectores se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Las uniones que contienen fósforo representativas incluyen, a título enunciativo no taxativo, fosfodiésteres (P═O), fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato, y fosforotioatos (P═S). Los grupos conectores que no contienen fósforo representativos incluyen, a título enunciativo no taxativo, metilenmetilimino (—CH2-N(CH3)-O—CH2-),

tiodiéster (—O—C(O)—S—), tionocarbamato (—O—C(O)(NH)—S—); siloxano (—O—Si(H)2-O—); y N,N′-dimetilhidrazina (—CH2-N(CH3)-N(CH3)-). Los compuestos oligoméricos que tienen grupos conectores que no contienen fósforo son referidos como oligonucleósidos. Las uniones modificadas, a comparación de las uniones fosfodiéster naturales, se pueden usar para alterar, típicamente aumentar, la resistencia a nucleasa del compuesto oligomérico. En determinadas formas de realización, las uniones que tienen un átomo quiral se pueden preparar como mezclas racémicas, como enantiómeros separados. Las uniones quirales representativas incluyen, a título enunciativo no taxativo, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los métodos de preparación de uniones que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos para los expertos en el arte.

El grupo fosfato en el grupo conector se puede modificar por reemplazo de uno de los oxígenos por un sustituyente diferente. Un resultado de esta modificación puede ser la resistencia aumentada del oligonucleótido a la ruptura nucleolítica. Los ejemplos de grupos fosfato modificados fosforotioato, fosforoselenatos, fosfatos de borano, ésteres de fosfato de borano, fosfonatos ácidos, fosforoamidatos, alquil o arilfosfonatos y fosfotriésteres. En algunas formas de realización, uno de los átomos de oxígeno de fosfato que no son puente en la unión pueden ser reemplazados por cualquiera de los siguientes: S, Se, BR_3 (R es hidrógeno, alquilo, arilo), C (es decir un grupo alquilo, un grupo arilo, etc…), H, NR_2 (R es hidrógeno, alquilo, arilo opcionalmente sustituido), u OR (R es alquilo o arilo opcionalmente sustituido). El átomo de fósforo en un grupo fosfato sin modificar es aquiral. Sin embargo, el reemplazo de uno de los oxígenos que no son puente con uno de los átomos o grupos de

átomos precedentes hacen al átomo de fósforo quiral; en otras palabras un átomo de fósforo en un grupo fosfato modificado de esta manera es un centro estereogénico. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer la configuración “R” (en la presente Rp) o la configuración “S” (en la presente Sp).

Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos que no son puente reemplazados por azufre. El centro de fósforo en los fosforoditioatos es aquiral lo que impide la formación de diastereómeros de oligonucleótidos. Por lo tanto, si bien no se desea estar ligado a la teoría, pueden ser deseables modificaciones de ambos oxígenos que no son puente, lo que elimina el centro quiral, por ejemplo formación de fosforoditioato, en el sentido que no pueden producir mezclas de diastereómero. Por lo tanto, los oxígenos que no son puente pueden ser en forma independiente cualquiera de O, S, Se, B, C, H, N, o OR (R es alquilo o arilo).

El conector fosfato también puede ser modificado por el reemplazado del oxígeno del puente, (es decir el oxígeno que une el fosfato al azúcar del monómero), por nitrógeno (fosforoamidatos con puente), azufre (fosforotioatos con puente) y carbono (metilenfosfonatos con puente). El reemplazo puede ser en cualquiera de los oxígenos del puente o en ambos oxígenos del puente. Cuando el oxígeno del puente es el oxígeno 3’ de un nucleósido, se prefiere el reemplazo por carbono. Cuando el oxígeno del puente es el oxígeno 5’ de un nucleósido, se prefiere el reemplazo por nitrógeno.

Las uniones fosfato modificadas donde por lo menos uno de los oxígenos unidos al fosfato ha sido reemplazado o el grupo fosfato ha sido reemplazado por un grupo no fósforo, también son referidas como “uniones interazúcar no fosfodiéster” o “unión no fosfodiéster”.

En determinadas formas de realización, el grupo fosfato puede ser reemplazado por conectores que no contienen fósforo, por ejemplo desfosfo conectores. Los desfosfo conectores también son referidos en la presente como conectores no fosfodiéster. Si bien no se desea estar ligado a la teoría, se cree que el grupo fosfodiéster cargado es el centro de la reacción en la degradación nucleolítica, su reemplazo por miméticos estructurales neutros debería impartir una estabilidad frente a nucleasas aumentada. Nuevamente, si bien no se desea estar ligado a la teoría, puede ser deseable, en alguna forma de realización, introducir alteraciones en las que el grupo fosfato cargado es reemplazado por una unidad neutra.

Los ejemplos de unidades que pueden reemplazar el grupo fosfato incluyen, a título enunciativo no taxativo, amidas (por ejemplo amida-3 (3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5') y amida-4 (3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5')), hidroxilamino, siloxano (dialquilsiloxano), carboxamida, carbonato, carboximetilo, carbamato, éster de carboxilato, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfida, sulfonato, sulfonamida, éster de sulfonato, tioformacetal (3'-S-CH_2-O-5'), formacetal (3 '-O-CH_2-O-5'), oxima, metilenimino, metilencarbonilamino, metilenmetilimino (MMI, 3'-CH_2-N(CH_3)-O-5'), metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo, metilenoximetilimino, éteres (C3’-O-C5’), tioéteres (C3’-S-C5’), tioacetamido (C3’-N(H)-C(=O)-CH_2-S-C5’, C3’-O-P(O)-O-SS-C5’, C3’-CH_2-NH-NH-C5’, 3'-NHP(O)(OCH_3)-O-5' y 3'-NHP(O)(OCH_3)-O-5’ y uniones no iónicas que contienen partes de componentes N, O, S y CH_2 mezclados. Véase por ejemplo, Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi y P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 y 4, (pp. 40-65). Las formas de realización preferidas incluyen metilenmetilimino (MMI),

metilencarbonilamino, amidas, carbamato y conector de óxido de etileno.

Los expertos en el arte conocen que en ciertos casos el reemplazo de un oxígeno que no es puente puede llevar a un aumento en la escisión de la unión interazúcar por el 2'-OH vecino, por lo tanto en muchos casos, una modificación de un oxígeno que no es puente puede requerir la modificación del 2'-OH, por ejemplo, una modificación que no participa en la escisión de la unión interazúcar vecina, por ejemplo, azúcar arabinosa, 2'-O-alquilo, 2'-F, LNA y ENA.

Las uniones interazúcar no fosfodiéster preferidas incluyen fosforotioatos, fosforotioatos con por lo menos un 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% , 90% 95% o más de exceso enantiomérico de isómero Sp, fosforotioatos con por lo menos un 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% , 90% 95% o más de exceso enantiomérico de isómero Rp, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotrioestéres, alquil-fosfonatos (por ejemplo, metil-fosfonato), selenofosfatos, fosforamidatos (por ejemplo, N-alquilfosforamidato), y boranofosfonatos.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más y hasta incluir todas) unión modificada o no fosfodiéster. En una forma de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más y hasta incluir todas) uniones fosforotioato.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden por lo menos cinco modificaciones internucleotídicas de fosforotioato. En otras formas de realización, los compuestos REVERSIR de la

invención comprenden entre 5 y 15 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 14 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 13 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 12 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 11 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 10 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 9 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 8 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; entre 5 y 7 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato; o entre 5 y 6 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato. En aún otras formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención comprenden entre 6 y 14 modificaciones internucleotídicas de fosforotioato.

En algunas formas de realización, todas las uniones internucleotídicas en los compuestos revertidos son uniones internucleotídicas fosforotioato (PS). En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR comprenden por lo menos una unión internucleotídica fosforotioato (PS), pero no todas las uniones internucleotídicas en dicho compuesto REVERSIR son una unión fosforotioato. En otras palabras, en algunas formas de realización, menos del 100% (por ejemplo, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40% o menos) de las uniones internucleotídicas son uniones fosforotioato.

En algunas formas de realización, los compuestos REVERSIR comprenden por lo menos una unión internucleotídica fosforotioato y por lo menos una unión internucleosídica o internucleotídica que no es un fosforotioato. Por ejemplo, los compuestos REVERSIR comprenden por lo menos una unión internucleotídica fosforotioato y por lo menos una unión

internucleotídica fosfodiéster. En algunas formas de realización, la unión internucleotídica no fosforotioato se encuentra entre los nucleótidos terminal y el penúltimo.

En algunas formas de realización, la unión internucleotídica entre la nucleobase en el extremo 3’ del compuesto REVERSIR y el resto del compuesto REVERSIR es una unión fosfodiéster. En algunas formas de realización, todas las uniones internucleotídicas en los compuestos REVERSIR son fosforotioato excepto por la unión internucleotídica entre el nucleótido en el extremo 3’ del compuesto REVERSIR y el resto del compuesto REVERSIR.

También se pueden construir compuestos REVERSIR en los cuales el conector fosfato y el azúcar están reemplazados por sustitutos del nucleósido, nucleótido o nucleótido resistentes a nucleasas. Si bien no se desea estar ligado a la teoría, se cree que la ausencia de un esqueleto cargado de manera repetitiva disminuye la unión a proteínas que reconocen polianiones (por ejemplo nucleasas). Nuevamente, si bien no se desea estar ligado a la teoría, puede ser deseable en alguna forma de realización, introducir alteraciones en las cuales las bases están unidas por un esqueleto sustituto neutro. Los ejemplos incluyen el morfolino, ciclobutilo, pirrolidina, ácido nucleico peptídico (PNA), aminoetilglicilo PNA (*aeg*PNA) y sustitutos de nucleósidos de PNA con pirrolidina con esqueleto extendido (*bep*PNA). Un sustituto preferido es un sustituto de PNA.

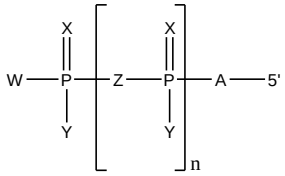
Los compuestos REVERSIR descritos en la presente pueden contener uno o más centros asimétricos y por lo tanto dando lugar a enantiómeros, diastereómeros, y otras configuraciones estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), tal como

para anómeros de azúcar, o como (D) o (L) tal como para aminoácidos. En los compuestos antisentido incluidos en la presente se proveen todos dichos posibles isómeros, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

Los extremos de los compuestos REVERSIR de la invención pueden estar modificados. Dichas modificaciones pueden estar en un extremo o en ambos. Por ejemplo, los extremos 3’ y/o 5’ de un oligonucleótido pueden estar conjugados con otras entidades moleculares funcionales tales como unidades de marcaje, por ejemplo, fluoróforos (por ejemplo, los indicadores pireno, TAMRA, fluoresceína, Cy3 o Cy5) o grupos protectores (basados por ejemplo, en azufre, silicio, boro o éster). Las unidades moleculares funcionales se pueden unir al azúcar mediante un grupo fosfato y/o un conector. El átomo terminal del conector puede conectarse a o reemplazar el átomo conector del grupo fosfato o el grupo C-3’ o C-5’ O, N, S o C del azúcar. Como alternativa, el conector puede conectarse a o reemplazar el átomo terminal de un sustituto de nucleótido (por ejemplo, PNA).

Cuando se interpone una disposición conector/entidad molecular funcional de fosfato-conector/fosfato entre dos hebras de un compuesto oligomérico de hebra doble, esta disposición puede sustituirse por un bucle de horquilla en un compuesto tipo horquilla.

Las modificaciones terminales útiles para modularla actividad incluyen la modificación del extremo 5’ del compuesto con fosfato o análogos de fosfato. En determinadas formas de realización, el extremo 5’ del compuesto está fosforilado o incluye un análogo fosforilo. Las modificaciones 5'-fosfato ejemplificativas incluyen aquellas que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones en el extremo 5’ también pueden

ser útiles para estimular o inhibir al sistema inmunológico de un sujeto. En algunas formas de realización, el extremo 5’ del compuesto comprende la modificación 

, donde W, X e Y se selecciona cada uno en forma independiente del grupo que consiste en O, OR (R es hidrógeno, alquilo, arilo), S, Se, BR_3 (R es hidrógeno, alquilo, arilo), BH_3^-, C (es decir un grupo alquilo, un grupo arilo, etc…), H, NR_2 (R es hidrógeno, alquilo, arilo), o OR (R es hidrógeno, alquilo o arilo); A y Z están cada uno en forma independiente en cada aparición ausentes, o son O, S, CH_2, NR (R es hidrógeno, alquilo, arilo), o alquileno opcionalmente sustituido, donde el esqueleto del alquileno puede comprender uno o más de O, S, SS y NR (R es hidrógeno, alquilo, arilo) internamente y/o en el extremo; y n es entre 0 y 2. En algunas formas de realización, n es 1 o 2. Se debe comprender que A está reemplazando el oxígeno unido al carbono 5’ del azúcar. Cuando n es 0, W e Y junto con el P al cual están unidos pueden formar un heterocíclico de entre 5 y 8 miembros opcionalmente sustituido, donde W e Y son cada uno en forma independiente O, S, NR’ o alquileno. Preferiblemente el heterocíclico está sustituido por un arilo o heteroarilo. En algunas formas de realización, uno o ambos hidrógenos en el C5’ de los nucleótidos 5’-terminales están reemplazados por un halógeno, por ejemplo, F.

Las modificaciones 5’ ejemplificativas incluyen, a título enunciativo no taxativo, 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'); 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'); 5'-alfa-tiotrifosfato; 5'-beta-tiotrifosfato; 5'-gamma-tiotrifosfato; 5'-fosforamidatos ($(HO)_2$(O)P-NH-5', (HO)(NH_2)(O)P-O-5'). Otra modificación en 5' incluye 5'-alquilfosfonatos (R(OH)(O)P-O-5', R=alquilo, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc…), 5'-alquileterfosfonatos (R(OH)(O)P-O-5', R=alquiléter, por ejemplo, metoximetilo (CH_2OMe), etoximetilo, etc…). Otras 5'-modificaciones ejemplificativas incluyen cuando Z es alquilo opcionalmente sustituido por lo menos una vez, por ejemplo, $((HO)_2(X)P-O[-(CH_2)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-$ 5', ((HO)2(X)P-O[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$- 5', ((HO)2(X)P-[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$-5'; fosfatos y miméticos de fosfato de dialquilo terminal: HO[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$- 5' , H_2N[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$- 5', H[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$-5', Me_2N[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$- 5', HO[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$- 5' , H_2N[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$- 5', H[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$- 5', Me_2N[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$- 5', donde a y b son cada uno en forma independiente entre 1 y 10. Otras formas de realización, incluyen el reemplazo de oxígeno y/o azufre por BH_3, BH_3^- y/o Se.

Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para monitorear la distribución, y en dichos casos los grupos preferidos que se pueden agregar incluyen fluoróforos, por ejemplo, fluoresceína o un indicador Alexa, por ejemplo, Alexa 488. Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para mejorar la captación, donde las modificaciones útiles para esto incluyen ligandos de direccionamiento. Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para el entrecruzamiento de un oligonucleótido con otra unidad; las modificaciones útiles para esto incluyen mitomicina C, psoraleno, y derivados de los mismos.

En determinadas formas de realización, los compuestos REVERSIR de la invención son compuestos oligoméricos quiméricos, es decir, oligonucleótidos quiméricos. En ciertas de dichas formas de realización, los oligonucleótidos quiméricos comprenden nucleótidos modificados de manera diferente. En determinadas formas de realización, los oligonucleótidos quiméricos son oligonucleótidos antisentido de esqueleto mixto.

En general, un compuesto oligomérico quimérico tendrá nucleósidos modificados que pueden estar en posiciones aisladas o agrupados entre sí en regiones que definirán un motivo particular. Cualquier combinación de modificaciones y/o grupos miméticos puede comprender un compuesto oligomérico quimérico como se describe en la presente.

En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos quiméricos típicamente comprenden por lo menos una región modificada de manera de conferir resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada, y/o afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana. En determinadas formas de realización, una región adicional del compuesto oligomérico puede servir como un sustrato para enzimas con capacidad de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN.

En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos quiméricos son gápmeros (*gapmers*). En ciertas de dichas formas de realización, un compuesto oligomérico de esqueleto mixto tiene un tipo de uniones internucleotídicas en una o ambas ramas y un tipo diferente de uniones internucleosídicas en la zona de falta de complementariedad. En ciertas de dichas formas de realización, el oligonucleótido de esqueleto mixto tiene uniones fosfodiéster en las ramas y uniones fosforotioato en la zona de

falta de complementariedad. En determinadas formas de realización en las cuales las uniones internucleotídicas en una rama son diferentes a las uniones internucleotídicas en la zona de falta de complementariedad, la unión internucleotídica que forma puente esa rama y la zona de falta de complementariedad es la misma que la unión internucleotídica en la rama. En determinadas formas de realización en las cuales las uniones internucleotídicas en una rama son diferentes a las uniones internucleotídicas en la zona de falta de complementariedad, la unión internucleotídica que forma puente entre esa rama y la zona de falta de complementariedad es la misma que la unión internucleotídica en la zona de falta de complementariedad.

En determinadas formas de realización, la presente invención provee compuestos REVERSIR de cualquiera de una variedad de rangos de longitudes. En determinadas formas de realización, la invención provee compuestos que consisten en entre 16 y 30, por ejemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la invención provee compuestos que comprenden: entre 16 y 17, entre 16 y 18, entre 16 y 19, entre 16 y 25, entre 16 y 21, entre 16 y 22, entre 16 y 23, entre 16 y 24, entre 16 y 25, entre 16 y 26, entre 16 y 27, entre 16 y 28, entre 16 y 29, entre 16 y 30, entre 17 y 18, entre 17 y 19, entre 17 y 20, entre 17 y 21, entre 17 y 22, entre 17 y 23, entre 17 y 24, entre 17 y 25, entre 17 y 26, entre 17 y 27, entre 17 y 28, entre 17 y 29, entre 17 y 30, entre 18 y 19, entre 18 y 20, entre 18 y 21, entre 18 y 22, entre 18 y 23, entre 18 y 24, entre 18 y 25, entre 18 y 26, entre 18 y 27, entre 18 y 28, entre 18 y 29, entre 18 y 30, entre 19 y 20, entre 19 y 21, entre 19 y 22, entre 19 y 23, entre 19 y 24, entre 19 y 25, entre 19 y 26, entre 19 y 29, entre 19 y 28, entre

19 y 29, entre 19 y 30, entre 20 y 21, entre 20 y 22, entre 20 y 23, entre 20 y 24, entre 20 y 25, entre 20 y 26, entre 20 y 27, entre 20 y 28, entre 20 y 29, entre 20 y 30, entre 21 y 22, entre 21 y 23, entre 21 y 24, entre 21 y 25, entre 21 y 26, entre 21 y 27, entre 21 y 28, entre 21 y 29, entre 21 y 30, entre 22 y 23, entre 22 y 24, entre 22 y 25, entre 22 y 26, entre 22 y 27, entre 22 y 28, entre 22 y 29, entre 22 y 30, entre 23 y 24, entre 23 y 25, entre 23 y 26, entre 23 y 27, entre 23 y 28, entre 23 y 29, entre 23 y 30, entre 24 y 25, entre 24 y 26, entre 24 y 27, entre 24 y 28, entre 24 y 29, entre 24 y 30, entre 25 y 26, entre 25 y 27, entre 25 y 28, entre 25 y 29, entre 25 y 30, entre 26 y 27, entre 26 y 28, entre 26 y 29, entre 26 y 30, entre 27 y 28, entre 27 y 29, entre 27 y 30, entre 28 y 29, entre 28 y 30, o entre 29 y 30 nucleótidos unidos.

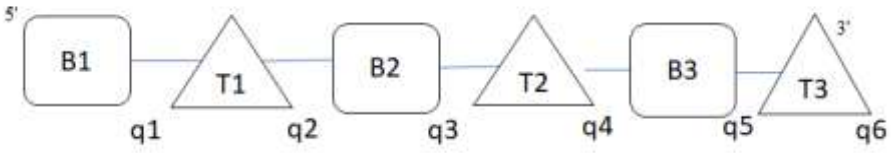
Tal como se indica precedentemente, los compuestos REVERSIR pueden ser de cualquier longitud. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el compuesto REVERSIR es un oligonucleótido modificado que consiste en entre 16 y 30 nucleótidos. Por ejemplo, el compuesto REVERSIR puede consistir en 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases unidas. En algunas formas de realización, el compuesto REVERSIR consiste en entre 16 y 24, entre 16 y 22 o entre 18 y 20 nucleobases unidas.

Tal como se describe en la presente, los compuestos REVERSIR son oligonucleótidos, por ejemplo, oligonucleótidos modificados, que son complementarios de manera sustancial con la hebra antisentido de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. Ahora sin desear de estar ligado a una teoría, los compuestos REVERSIR que son complementarios de manera

sustancial con la región semilla de la hebra antisentido del ARNhd (es decir, en las posiciones 2-8, o 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido) son particularmente eficaces para reducir la actividad de ARNhd. Por lo tanto, en muchas formas de realización, el compuesto REVERSIR es complementario de manera sustancial con los nucleótidos 2-8, 2-9, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14, 2-15 o 2-16 de la hebra antisentido de los agentes de ARNhd descritos en la presente. Por sustancialmente complementario en este contexto se comprende una complementariedad de por lo menos 90%, preferiblemente por lo menos 95%, y más preferiblemente complementariedad completa.

A. Compuestos REVERSIR modificados que comprenden motivos de la invención

La presente invención también incluye compuestos oligoméricos de entre 18 y 24 nucleótidos de longitud que comprenden una secuencia nucleotídica sustancialmente complementaria a la hebra antisentido del agente de ARNhd. Dichos compuestos oligoméricos en general incluyen por lo menos cinco modificaciones internucleotídicas de fosforotioato y están representados por la fórmula (I):



Fórmula I

donde:

B1, B2 y B3 representan cada uno de manera independiente un nucleótido que comprende una modificación nucleotídica que se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en una modificación con 2’-desoxilo, 2’-ribo, 2’-O-alquilo, una modificación con 2’-alcoxilo sustituido,

modificación con 2’-alcoxialquilo sustituido, una modificación con 2’-alquilo sustituido, y una modificación con 2’-halo;

T1, T2, y T3 representan cada uno de manera independiente un nucleótido que comprende una modificación nucleotídica que se selecciona del grupo que consiste en una modificación con desoxinucleótido, una modificación con D-metilenoxi (4′-CH_2-O-2′) ácido nucleico bloqueado (LNA), una modificación con 2’-O-(2-Metoxietilo) (MOE), una modificación con cEt, o una modificación BNA diferente, una 2’-desoxi-2’-Fluoro, y una modificación con 2’-O-metilo;

q^1, q^3 y q^5 tienen cada uno de manera independiente entre 3 y 12 nucleótidos de longitud;

q^2, q^4 y q^6 tienen de manera independiente entre 1 y 6 nucleótidos de longitud.

En otras formas de realización, la presente invención provee compuestos oligoméricos que son compuestos oligoméricos quiméricos, es decir compuestos REVERSIR quiméricos. Los compuestos oligoméricos “quiméricos” o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos oligoméricos que contienen dos o más regiones químicamente diferentes, compuestas cada una por al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido modificado o sin modificar en el caso de un oligonucleótido. Los compuestos oligoméricos quiméricos se pueden describir como que tienen un motivo particular. En algunas formas de realización, los motivos incluyen, a título enunciativo no taxativo, un motivo alternante, un motivo de falta de complementariedad, un motivo hemímero, un motivo uniformemente modificado por completo y un motivo posicionalmente modificado. Tal como se usa en la

presente, la expresión “región químicamente diferente” se refiere a una región oligomérica que es diferente a otras regiones por tener una modificación que no está presente en otra parte en el compuesto oligomérico o por no tener una modificación que está presente en otra parte en el compuesto oligomérico. Un compuesto oligomérico puede comprender dos o más regiones químicamente diferentes. Tal como se usa en la presente, una región que no comprende modificaciones también es considerada químicamente diferente.

Una región químicamente diferente puede repetirse dentro de un compuesto oligomérico. Por lo tanto, puede realizarse un patrón de regiones químicamente diferentes en un compuesto oligomérico de manera tal que una primera región químicamente diferente es seguida por una o más segundas regiones químicamente diferentes. Esta secuencia de regiones químicamente diferentes puede repetirse una o más veces. Preferiblemente, la secuencia se repite más de una vez. Ambas hebras de un compuesto oligomérico de hebra doble puede comprender estas secuencias. Cada región químicamente diferente puede comprender en realidad tan poco como monómeros individuales, por ejemplo, nucleótidos. En algunas formas de realización, cada región químicamente diferente comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 monómeros, por ejemplo, nucleótidos.

En algunas formas de realización, los nucleótidos alternantes comprenden la misma modificación, por ejemplo todos los nucleótidos de número impar en una hebra tienen la misma modificación y/o todos los nucleótidos de número par en una hebra tienen la modificación similar a la primera hebra. En algunas formas de realización, todos los nucleótidos de número impar en un compuesto oligomérico tienen la misma modificación y

todos los nucleótidos de número par tienen una modificación que no está presente en los nucleótidos de número impar y viceversa.

En algunas formas de realización, el oligonucleótido comprende dos regiones químicamente diferentes, donde cada región tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud.

En otras formas de realización, el compuesto oligomérico comprende tres regiones químicamente diferentes. La región del medio tiene aproximadamente entre 5 y 15, (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) nucleótidos de longitud y cada región flanqueante o rama tiene en forma independiente entre 1 y 10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) nucleótidos de longitud. Las tres regiones pueden tener modificaciones diferentes o las regiones rama pueden estar modificadas de manera similar entre sí. En algunas formas de realización, las regiones rama tienen la misma longitud, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud.

Tal como se usa en la presente el término "motivo alternante" se refiere a un compuesto oligomérico que comprende una secuencia contigua de subunidades monoméricas unidas donde las subunidades monoméricas tienen dos tipos diferentes de grupos azúcar que alternan esencialmente en la secuencia completa del compuesto oligomérico. Los compuestos oligoméricos que tienen un motivo alternante pueden describirse mediante la fórmula: 5'- A(-L-B-L-A)n(-L-B)nn-3' donde A y B son unidades monoméricas que tienen diferentes grupos azúcares, donde cada L es un grupo conector internucleosídico, n es entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 y nn es 0 o 1. Esto permite compuestos oligoméricos alternantes con entre aproximadamente 9 y aproximadamente 26 subunidades monoméricas de

longitud. Este rango de longitud no tiene como intención ser limitante ya que también son posibles compuestos oligoméricos más largos y más cortos para la presente invención. En una forma de realización, uno de A y B es un nucleósido con modificación en 2’ como se provee en la presente.

Tal como se usa en la presente, “tipo de modificación” en referencia a un nucleósido o un nucleósido de un “tipo” se refiere a la modificación de un nucleósido e incluye nucleósidos modificados y no modificados. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, un “nucleósido que tiene una modificación de un primer tipo” puede ser un nucleósido no modificado.

Tal como se usa en la presente, “región tipo” se refiere a una parte de un compuesto oligomérico donde los nucleósidos y las uniones internucleosídicas dentro de la región comprenden todas el mismo tipo de modificaciones; y los nucleósidos y/o las uniones internucleosídicas de cualquier porción vecina incluyen por lo menos un tipo diferente de modificación. Tal como se usa en la presente el término "motivo modificado de manera uniforme por completo" se refiere a un oligonucleótido que comprende una secuencia contigua de subunidades monoméricas unidas que tienen el mismo tipo de grupo azúcar. En una forma de realización, el motivo modificado de manera uniforme por completo incluye una secuencia contigua de nucleósidos de la invención. En una forma de realización, uno o ambos extremos 3' y 5' de la secuencia contigua de los nucleósidos provistos en la presente, comprenden grupos terminales tales como uno o más nucleósidos no modificados.

Tal como se usa en la presente el término "motivo hemímero" se refiere a un compuesto oligomérico que tiene una secuencia contigua corta de subunidades monoméricas que tienen un tipo de grupo azúcar ubicado en el

extremo 5' o el 3' donde el resto de las subunidades monoméricas tienen un tipo diferente de grupo azúcar. En general, un hemímero es un compuesto oligomérico de grupos azúcares uniformes que además comprenden una región corta (1, 2, 3, 4 o aproximadamente 5 subunidades monoméricas) que tiene grupos azúcares uniformes pero diferentes y ubicadas en el extremo 3' o 5' del compuesto oligomérico. En una forma de realización, el motivo hemímero comprende una secuencia contigua de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 28 subunidades monoméricas de un tipo con entre 1 y 5 o entre 2 y aproximadamente 5 subunidades monoméricas de un segundo tipo ubicadas en uno de los extremos terminales. En una forma de realización, un hemímero es una secuencia contigua de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 20 β-D-2'-desoxirribonucleósidos que tienen entre 1 y 12 nucleósidos contiguos de la invención ubicados en uno de los extremos terminales. En una forma de realización, un hemímero es una secuencia contigua de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 20 β-D-2'-desoxirribonucleósidos que tienen entre 1 y 5 nucleósidos contiguos de la invención ubicados en un extremo terminal. En una forma de realización, un hemímero es una secuencia contigua de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 18 β-D-2'-desoxirribo-nucleósidos que tienen entre 1 y 3 nucleósidos contiguos de la invención ubicados en uno de los extremos terminales. En una forma de realización, un hemímero es una secuencia contigua de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 14 β-D-2'-desoxirribonucleósidos que tienen entre 1 y 3 nucleósidos contiguos de la invención ubicados en uno de los extremos terminales.

Tal como se usa en la presente el término "motivo bloqmero” (*blockmer*

motif) se refiere a un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo demás contigua de subunidades monoméricas donde los grupos azúcares de cada subunidad de monómero son los mismos excepto por un bloque interno de interrupción de subunidades monoméricas contiguas que tienen un tipo diferente de grupo azúcar. Un bloqmero (*blockmer*) se superpone en parte con un gápmero (*gapmer*) en la definición pero típicamente solo las subunidades monoméricas en el bloque tienen grupos azucares que no son de origen natural en un bloqmero (*blockmer*) y solo las subunidades monoméricas en las regiones externas tienen grupos azucares que no son de origen natural en un gápmero (*gapmer*) con el remanente de las subunidades monoméricas en el bloqmero (*blockmer*) o gápmero (*gapmer*) siendo β-D-2'-desoxirribonucleósidos o β-D-ribonucleósidos. En una forma de realización, los oligonucleótidos del bloqmero (*blockmer*) se proveen en la presente donde todas las subunidades monoméricas comprenden grupos azúcares que no son de origen natural.

Tal como se usa en la presente el término "motivo posicionalmente modificado" se refiere a que incluye una secuencia por lo demás contigua de subunidades monoméricas que tienen un tipo de grupo azúcar que está interrumpido por dos o más regiones de entre 1 y aproximadamente 5 subunidades monoméricas contiguas que tienen otro tipo de grupo azúcar. Cada una de las dos o más regiones de entre 1 y aproximadamente 5 subunidades monoméricas contiguas están en forma independiente modificadas de manera uniforme respecto al tipo de grupo azúcar. En una forma de realización, cada una de las dos o más regiones tiene el tipo de grupo azúcar. En una forma de realización, cada una de las dos o más regiones tienen un tipo diferente de grupo azúcar. En una forma de realización, se

proveen oligonucleótidos posicionalmente modificados que comprenden una secuencia de entre 8 y 20 β-D-2'-desoxirribonucleósidos que además incluye dos o tres regiones de entre 2 y aproximadamente 5 nucleósidos contiguos de la invención. Los oligonucleótidos posicionalmente modificados se distinguen de los motivos con falta de complementariedad, motivos hemímero, motivos bloqmeros (*blockmer motifs*) y motivos alternantes ya que el patrón de sustitución regional definido por cualquier motivo posicional no encaja en la definición provista en la presente para uno de estos otros motivos. El término compuesto oligomérico posicionalmente modificado incluye varios patrones de sustitución específicos diferentes.

Tal como se usa en la presente el término "gápmero" (*gapmer*) o "compuesto oligomérico con falta de complementariedad" se refiere a un compuesto oligomérico que tiene dos regiones o ramas externas y una región o zona de falta de complementariedad interna. Las tres regiones forman una secuencia contigua de subunidades monoméricas con los grupos azúcares de las regiones externas que son diferentes de los grupos azúcares de la región interna y donde el grupo azúcar de cada subunidad monomérica en una región particular es la misma. Cuando los grupos azúcares de las regiones externas son las mismas el gápmero (*gapmer*) es un gápmero simétrico y cuando el grupo azúcar usado en la región externa 5' es diferente al grupo azúcar usado en la región externa 3', el gápmero (*gapmer*) es un gápmero asimétrico. En una forma de realización, las regiones externas son pequeñas (cada una en forma independiente de 1, 2, 3, 4 o aproximadamente 5 subunidades monoméricas) y las subunidades monoméricas comprenden grupos azúcares que no son de origen natural con la región interna que comprende β-D-2'-

desoxirribonucleósidos. En una forma de realización, las regiones externas comprenden cada una, en forma independiente, entre 1 y aproximadamente 5 subunidades monoméricas que tienen grupos azúcares que no son de origen natural y la región interna comprende entre 6 y 18 nucleósidos no modificados. La región interna o la zona de falta de complementariedad en general comprende β-D-2'-desoxirribo- nucleósidos pero puede comprender grupos azúcares que no son de origen natural.

En una forma de realización, los compuestos oligoméricos con falta de complementariedad comprenden una región interna de β-D-2'-desoxirribonucleósidos con una de las regiones externas que comprenden nucleósidos de la invención. En una forma de realización, el oligonucleótido con falta de complementariedad comprende una región interna de β-D-2'-desoxirribonucleósidos con ambas regiones externas que comprenden nucleósidos de la invención. En una forma de realización, el oligonucleótido con falta de complementariedad comprende una región interna de β-D-2'-desoxirribonucleósidos con ambas regiones externas que comprenden nucleósidos de la invención. En una forma de realización, se proveen oligonucleótidos con falta de complementariedad en la presente donde todas de las subunidades monoméricas comprenden grupos azúcares que no son de origen natural. En una forma de realización, se proveen oligonucléotidos con falta de complementariedad que comprenden uno o dos nucleósidos de la invención en el extremo 5', dos o tres nucleósidos de la invención en el extremo 3' y una región interna de entre 10 y 16 β-D-2'-desoxirribonucleósidos. En una forma de realización, se proveen oligonucleótidos con falta de complementariedad que comprenden un nucleósido de la invención en el

extremo 5’, dos nucleósidos de la invención en el extremo 3’ y una región interna de entre 10 y 16 β-D-2'-desoxirribonucleósidos. En una forma de realización, se proveen oligonucleótidos con falta de complementariedad que comprenden dos nucleósidos de la invención en el extremo 5’, dos nucleósidos de la invención en el extremo 3’ y una región interna de entre 10 y 14 β-D-2'-desoxirribonucleósidos. En una forma de realización, se proveen oligonucleótidos con falta de complementariedad que tienen entre aproximadamente 10 y aproximadamente 21 subunidades monoméricas de longitud. En una forma de realización, se proveen oligonucleótidos con falta de complementariedad que tienen entre aproximadamente 12 y aproximadamente 16 subunidades monoméricas de longitud. En una forma de realización, se proveen oligonucleótidos con falta de complementariedad que tienen entre aproximadamente 12 y aproximadamente 14 subunidades monoméricas de longitud.

En determinadas formas de realización, el monómero del extremo 5’ de un compuesto oligomérico de la invención comprende una unidad fósforo en el extremo 5’. En determinadas formas de realización el monómero del extremo 5’ comprende una modificación en 2’. En ciertas de dichas formas de realización, la modificación en 2’ del monómero del extremo 5’ es una modificación catiónica. En determinadas formas de realización, el monómero del extremo 5’ comprende una modificación 5’. En determinadas formas de realización, el monómero del extremo 5’ comprende una modificación en 2’ y una modificación en 5’. En determinadas formas de realización, el monómero del extremo 5’ es un nucleósido estabilizante de 5’. En determinadas formas de realización, las modificaciones del monómero del extremo 5’ estabiliza el fosfato 5’. En

determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos que comprenden modificaciones del monómero del extremo 5’ son resistentes a exonucleasas. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos que comprenden modificaciones del monómero del extremo 5’ tienen propiedades mejoradas de REVERSIR. En ciertas de dichas formas de realización, el compuesto oligomérico que comprende modificaciones del monómero del extremo 5’ tiene asociación mejorada con una hebra del ARNhd.

En determinadas formas de realización, el monómero del extremo 5’ está unido al resto del compuesto oligomérico mediante una unión modificada. En ciertas de dichas formas de realización, el monómero del extremo 5’ está unido al resto del compuesto oligomérico mediante una unión fosforotioato.

En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos de la presente invención comprenden una o más regiones de modificaciones alternantes. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos comprenden una o más regiones de modificaciones nucleósido alternantes. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos comprenden una o más regiones de modificaciones de unión alternantes. En ciertas formas de realización, los compuestos oligoméricos comprenden una o más regiones de modificaciones de nucleósidos y uniones alternantes.

En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos de la presente invención comprenden una o más regiones de nucleósidos con modificación 2’-F alternante y nucleósidos con modificación 2’-O-Me. En ciertas de dichas formas de realización, dichas regiones de nucleósidos con modificación 2’F y con modificación 2’O-Me alternantes también comprenden

uniones alternantes. En ciertas de dichas formas de realización, las uniones en el extremo 3’ de los nucleósidos con modificación 2’-F son uniones fosforotioato. En ciertas de dichas formas de realización, las uniones en el extremo 3’ de los nucleósidos 2’O-Me son uniones fosfodiéster.

En determinadas formas de realización, dichas regiones alternantes son:

(2’-F)-(PS)-(2’-OMe)-(PO)

En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 11 de dichas regiones alternantes. Dichas regiones pueden ser contiguas o pueden estar interrumpidas por nucleósidos o uniones modificadas de manera diferente.

En ciertas formas de realización, una o más regiones alternantes en un motivo alternante incluyen más de un nucleósido individual de un tipo. Por ejemplo, los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden incluir una o más regiones de cualquiera de los siguientes motivos de nucleósido:

ABA;

ABBA;

AABA;

AABBAA;

ABBABB;

AABAAB;

ABBABAABB;

ABABAA;

AABABAB;

ABABAA;

ABBAABBABABAA;

BABBAABBABABAA; o

ABABBAABBABABAA;

donde A es un nucleósido de un primer tipo y B es un nucleósido de un segundo tipo. En determinadas formas de realización, A y B se seleccionan cada uno entre 2'-F, 2'-OMe, LNA, ADN y MOE.

En determinadas formas de realización, A es ADN. En determinadas formas de realización B es ADN. En algunas formas de realización, A es 4'-CH_2O-2'-LNA. En determinadas formas de realización, B es 4'-CH_2O-2'-LNA. En determinadas formas de realización, A es ADN y B es 4'-CH_2O-2'-LNA. En determinadas formas de realización A es 4'-CH_2O-2'-LNA y B es ADN.

En determinadas formas de realización, A es 2'-OMe. En determinadas formas de realización B es 2'-OMe. En determinadas formas de realización, A es 2'-OMe y B es 4'-CH_2O-2'-LNA. En determinadas formas de realización, A es 4'-CH_2O-2'-LNA y B es 2'-OMe. En determinadas formas de realización, A es 2'-OMe y B es ADN. En determinadas formas de realización, A es ADN y B es 2'-OMe.

En determinadas formas de realización, A es (S)-cEt. En algunas formas de realización, B es (S)-cEt. En determinadas formas de realización, A es 2'-OMe y B es (S)-cEt. En determinadas formas de realización, A es (S)-cEt y B es 2'-OMe. En determinadas formas de realización, A es ADN y B es (S)-cEt. En determinadas formas de realización, A es (S)-cEt y B es ADN.

En determinadas formas de realización, A es 2'-F. En determinadas formas de realización B es 2'-F. En determinadas formas de realización, A es 2'-F y B es 4'-CH_2O-2'-LNA. En determinadas formas de realización, A es 4'-CH_2O-2'-LNA y B es 2'-F. En determinadas formas de realización, A es 2'-F y B

es (S)-cEt. En determinadas formas de realización, A es (S)-cEt y B es 2'-F. En determinadas formas de realización, A es 2'-F y B es ADN. En determinadas formas de realización, A es ADN y B es 2'-F. En determinadas formas de realización, A es 2'-OMe y B es 2'-F. En determinadas formas de realización, A es ADN y B es 2'-OMe. En determinadas formas de realización, A es 2'-OMe y B es ADN.

En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos que tienen dicho motivo alternante también comprenden un nucleósido en el extremo 5' que comprende una modificación estabilizante de fosfato. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos que tienen dicho motivo alternante también comprenden un nucleósido de extremo 5' que comprende un modificación catiónica en 2'. En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos que tienen dicho motivo alternante también comprenden una modificación en el extremo 5'.

En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos de la presente invención comprenden una región que tiene un motivo 2-2-3. Dichas regiones comprenden el siguiente motivo:

5'- $(E)_w$-$(A)_2$-$(B)_x$-$(A)_2$-$(C)_y$-$(A)_3$-$(D)_z$

en donde: A es un primer tipo de nucleósido modificado;

B, C, D, y E son nucleósidos que están modificados de manera diferente que A, sin embargo, B, C, D, y E pueden tener las mismas modificaciones o diferentes entre sí;

w y z son entre 0 y 15;

x e y son entre 1 y 15.

En determinadas formas de realización, A es un nucleósido con

modificación 2’-OMe. En determinadas formas de realización, B, C, D, y E son todos nucleósidos con modificación 2’-F. En determinadas formas de realización, A es un nucleósido con modificación 2’-OMe y B, C, D, y E son todos nucleósidos con modificación 2’-F.

En determinadas formas de realización, las uniones de un motivo 2-2-3 son todas uniones modificadas. En determinadas formas de realización, las uniones son todas uniones fosforotioato. En ciertas formas de realización, las uniones en el extremo 3’ de cada modificación del primer tipo son fosfodiéster.

En determinadas formas de realización, Z es 0. En dichas formas de realización, la región de tres nucleósidos del primer tipo se encuentran en el extremo 3’ del oligonucleótido. En determinadas formas de realización, dicha región se encuentra en el extremo 3’ del compuesto oligomérico, sin grupos adicionales unidos al extremo 3’ de la región de tres nucleósidos del primer tipo. En determinadas formas de realización, un compuesto oligomérico que comprende un oligonucleótido donde Z es 0, puede comprender un grupo terminal unido al nucleósido del extremo 3’. Dichos grupos terminales pueden incluir nucleósidos adicionales. Dichos nucleósidos adicionales típicamente son nucleósidos no hibridizantes.

En determinadas formas de realización, Z es 1-3. En determinadas formas de realización, Z es 2. En determinadas formas de realización, los nucleósidos de Z son nucleósidos con 2’-MOE. En determinadas formas de realización, Z representa nucleósidos no hibridizantes. Para evitar confusión, se indica que dichos nucleósidos no hibridizantes también se podrían describir como un grupo del extremo 3’ con Z=0.

Se debe comprender que se pueden combinar ciertos motivos y

modificaciones que se describieron precedentemente. Debido a que un motivo puede comprender solo unos pocos nucleósidos, un compuesto oligomérico particular puede comprender dos o más motivos. A modo de ejemplo no limitante, en determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos pueden tener dos o más motivos de nucleótido seleccionados entre LNA, uniones fosfortioato, 2'-OMe, uno o más ligandos conjugados.

Los compuestos oligoméricos que tienen cualquiera de los diferentes motivos de nucleósido descritos en la presente, también pueden tener cualquier motivo de unión. Por ejemplo, en los compuestos oligoméricos las primeros 1, 2, 3, 4 o 5 en el extremo 5' pueden ser uniones interazúcar y las primeras 4, 5, 6, 7 o 8 uniones interazúcar en el extremo 3' pueden ser uniones interazúcar modificadas. La región central de dicho compuesto oligomérico modificado puede tener uniones interazúcar basadas en cualquiera de los otros motivos descritos en la presente, por ejemplo, uniforme, alternante, hemímero, gápmero (*gapmer*), y similares. En algunas formas de realización, el compuesto oligomérico comprende una unión fosforotioato entre el primer y segundo de los monómeros en el extremo 5', uniones alternantes fosforotioato/fosfodiéster en la región central y 6, 7 u 8 uniones fosforotioato en el extremo 3'.

Cabe destacar que las longitudes de las regiones definidas por un motivo de nucleósido y la de un motivo de unión no requieren ser las mismas.

En algunas formas de realización, los compuestos oligoméricos de hebra simple incluyen por lo menos uno de los siguientes motivos:

(a) 5'-fosforotioato o 5'-fosforoditioato;

(b) una modificación catiónica de nucleótidos 1 y 2 en el extremo 5', donde la modificación catiónica se encuentra en la posición C5 de las

pirimidinas y C2, C6, C8, N2 exocíclico o N6 exocíclico de las purinas;

(c) por lo menos un nucleótido pinza G en los primeros dos nucleótidos terminales en el extremo 5’ y el otro nucleótido que tiene una modificación catiónica, donde la modificación catiónica se encuentra en la posición C5 de las pirimidinas o posición C2, C6, C8, N2 exocíclico o N6 exocíclico de las purinas;

(d) por lo menos un nucleótido con modificación 2’-F que comprende una modificación de base de la nucleobase;

(e) por lo menos un nucleótido con modificación *gem*-2’-O-metil/2’-F que comprende una modificación de nucleobase, preferiblemente el sustituyente metilo se encuentra la configuración arriba, por ejemplo en la configuración de arabinosa;

(f) un dinucleótido 5’-PuPu-3’ en el extremo 3’ donde ambos nucleótidos comprenden un MOE modificado en la posición 2’ como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20130130378, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

(g) un dinucleótido 5’-PuPu-3’ en el extremo 5’ donde ambos nucleótidos comprenden un MOE modificado en la posición 2’ como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20130130378;

(h) nucleótido en el extremo 5’ que tiene un MOE modificado en la posición 2’ como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20130130378;

(i) nucleótido en el extremo 5’ que tiene una modificación 3’-F;

(j) nucleótido en el extremo 5’ que comprende un 4’-sustituyente;

(k) nucleótido en el extremo 5' que comprende una modificación O4’;

(l) nucleótido en el extremo 3’ que comprende un 4’-sustituyente; y

(m) combinaciones de los mismos.

Los ejemplos precedentes se proveen solamente para ilustrar cómo se pueden usar los motivos descritos combinados y no tienen como intención limitar la invención a las combinaciones particulares o las modificaciones particulares usadas en la ilustración de las combinaciones. Además, los ejemplos específicos en la presente tienen como intención abarcar formas de realización más genéricas. Todos los ejemplos a lo largo de esta memoria descriptiva contemplan dicha interpretación genérica.

También se indica que las longitudes de los compuestos oligoméricos se pueden manipular fácilmente alargando o acortando una o más de las regiones descritas, sin alterar el motivo.

En algunas formas de realización, el compuesto oligomérico comprende dos o más regiones químicamente diferentes y tiene una estructura como se describe en la Solicitud Internacional No. PCT/US09/038433, presentada el 26 de marzo de 2009, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad.

III. Ligandos de la invención

En determinadas formas de realización, los compuestos oligoméricos están modificados por uniones covalentes de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico unido incluyendo a título enunciativo no taxativo farmacodinámica, farmacocinética, unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y depuración. Los grupos conjugados se usan de rutina en el arte de la química y están conectados directamente o a través de una unidad conectora o grupo conector opcional a un compuesto parental tal como

un compuesto oligomérico. Una lista preferida de grupos conjugados incluye sin limitación, intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolesteroles, unidades de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas e indicadores.

Los grupos conjugados preferidos posibles para la presente invención incluyen unidades lipídicas tales como una unidad colesterol (Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553); ácido cólico (Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053); un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan y col., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306; Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765); un tiocolesterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533); una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras y col., EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanov y col., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk y col., Biochimie, 1993, 75, 49); un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio-1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea y col., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777); una cadena de poliamina o de polietilenglicol (Manoharan y col., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969); ácido adamantano acético (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651); una unidad palmitilo (Mishra y col., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229); o una unidad octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923).

En general, una amplia variedad de entidades, por ejemplo, ligandos, se pueden acoplar a los compuestos oligoméricos descritos en la presente. Los

ligandos pueden incluir moléculas de origen natural, o moléculas recombinantes o sintéticas. Los ligandos ejemplificativos incluyen, a título enunciativo no taxativo, polilisina (PLL), poli ácido L-aspártico, poli ácido L-glutámico, copolímero de estireno-ácido maleico anhídrido, copolímero poli(L-lactida-co-glicolado), copolímero divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG, por ejemplo, PEG-2K, PEG-5K, PEG-10K, PEG-12K, PEG-15K, PEG-20K, PEG-40K), MPEG, $[MPEG]_2$, alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, polifosfazina, polietilenimina, grupos catiónicos, espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímero, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, tirotrofina, melanotrofina, lectina, glicoproteína, proteína A tensioactiva, mucina, poliaminoácidos glicosilados, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, aptámero, asialofetuína, hialuronano, procolágeno, inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), insulina, transferrina, albumina, conjugados de azúcar-albúmina, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), entrecruzadores (por ejemplo psoraleno, mitomicina C), porfirinas (por ejemplo, TPPC4, texafirina, Safirina), hidrocarbonos policíclicos aromáticos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificial (por ejemplo, EDTA), moléculas lipofílicas (por ejemplo, esteroides, ácidos biliares, 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), péptidos (por ejemplo, un péptido alfa hélice, péptido anfipático, péptido RGD, péptido de permeación celular, péptido endosomolítico/fusogénico), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, naproxeno, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupamientos de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos con Eu^{3+} de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP, AP, anticuerpos, hormonas y receptores de hormonas, lectinas, hidratos de carbono, hidratos de carbono multivalentes, vitaminas (por ejemplo, vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina y piridoxal), cofactores de vitaminas, lipopolisacárido, un activador de p38 MAP quinasa, un activador de NF-κB, taxon, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jasplakinolide, latrunculina A, faloidina, swinholide A, indanocina, mioservina, factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), interleuquina-1 beta, interferón gamma, lipoproteína de baja densidad natural o recombinante (LDL), lipoproteína de alta densidad natural o recombinante (HDL), y un agente de permeación celular (por ejemplo, agente de permeación celular α hélice).

Los grupos catiónicos ejemplificativos incluyen, a título enunciativo no taxativo, grupos amino protonados, derivados de por ejemplo, O-AMINA (AMINA = NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino); aminoalcoxilo, por ejemplo, $O(CH_2)_n$AMINA, (por ejemplo, AMINA = NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o

diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino); amino (por ejemplo NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, o aminoácido); y $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$-AMINA (AMINA = NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino).

Tal como se usa en la presente el término “ligando de direccionamiento” se refiere a cualquier molécula que provee una afinidad aumentada por una diana seleccionada, por ejemplo, una célula, tipo de célula, tejido, órgano, región del cuerpo, o un compartimiento, por ejemplo, un compartimiento celular, tisular o de órgano. Algunos de los ligandos de direccionamiento ejemplificativos incluyen, a título enunciativo no taxativo, anticuerpos, antígenos, folatos, ligandos de receptores, hidratos de carbono, aptámeros, ligandos de receptores de integrinas, ligandos de receptores de quimoquinas, transferrina, biotina, ligandos del receptor de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligandos de LDL y HDL.

Los ligandos de direccionamiento basados en hidratos de carbono incluyen, a título enunciativo no taxativo, D-galactosa, galactosa multivalente, N-acetil-D-galactosa (GalNAc), GalNAc multivalente, por ejemplo GalNAc2 y GalNAc3; D-manosa, manosa multivalente, lactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-gulucosamina, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados y lectinas. El término multivalente indica que hay presente más de una unidad de monosacárido. Dichas subunidades de monosacárido se pueden unir entre sí mediante uniones glicosídicas o conectarse a una molécula esqueleto.

Tal como se usan en la presente, los términos “agente modulador de la

PK” y “modulador PK” se refieren a moléculas que pueden modular la farmacocinética de la composición de la invención. Algunos moduladores PK ejemplificativos incluyen, a título enunciativo no taxativo, moléculas lipofílicas, ácidos biliares, esteroles, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, vitaminas, ácidos grasos, fenoxazina, aspirina, naproxeno, ibuprofeno, suprofeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, PEG, biotina, y ligandos de unión a transtiretina (por ejemplo, ácido tetraiodotiroacético, 2, 4, 6-triiodofenol y ácido flufenámico). También se conoce que los compuestos oligoméricos que comprenden un número de uniones interazúcar fosforotioato se unen a proteínas séricas, por lo tanto los compuestos oligoméricos cortos, por ejemplo oligonucleótidos que comprenden entre aproximadamente 5 y 30 nucleótidos (por ejemplo, entre 5 y 25 nucleótidos, preferiblemente entre 5 y 20 nucleótidos, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos), y que comprenden una pluralidad de uniones fosforotioato en el esqueleto también son posibles para la presente invención como ligandos (por ejemplo como ligandos moduladores de la PK). El oligonucleótido modulador de la PK puede comprender por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más uniones fosforotioato y/o fosforoditioato. En algunas formas de realización, todas las uniones internucleotídicas en el oligonucleótido modulador de la PK son uniones fosforotioato y/o fosforoditioatos. Además, los aptámeros que se unen a componentes del suero (por ejemplo proteínas séricas) también son posibles para la presente invención como ligandos moduladores de la PK. La unión a componentes del suero (por ejemplo proteínas séricas) se puede predecir a partir de ensayos de unión a albúmina, tal como aquellos descritos en

Oravcova, y col., Journal of Chromatography B (1996), 677: 1-27.

Cuando dos o más ligandos están presentes, los ligandos pueden tener todos las mismas propiedades, todos tener propiedades diferentes o algunos ligandos tener las mismas propiedades mientras que otros tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, un ligando puede tener propiedades direccionamiento, tener actividad endosomolítica o tener propiedades moduladoras de la PK. En una forma de realización preferida, todos los ligandos tienen propiedades diferentes.

Tal como se usa en la presente, cuando un ligando está unido a más de una hebra oligomérica, el punto de unión para un compuesto oligomérico puede ser un átomo del ligando mismo o un átomo en una molécula vehículo a la cual el ligando mismo está unido.

Los ligandos pueden estar acoplados a los compuestos oligoméricos en diferentes lugares, por ejemplo, extremo 3', extremo 5', y/o en una posición interna. Cuando están presentes dos o más ligandos, el ligando puede estar en extremos opuestos de un compuesto oligomérico. En formas de realización preferidas, el ligando es unido al compuesto oligomérico a través de una unión/conector interviniente. El ligando o ligando unido puede estar presente en un monómero cuando dicho monómero se incorpora a la hebra en crecimiento. En algunas formas de realización, el ligando se puede incorporar mediante el acoplamiento a un monómero "precursor" después de que dicho monómero "precursor" ha sido incorporado en la hebra en crecimiento. Por ejemplo, un monómero que tiene, por ejemplo, una unión terminada en amino (es decir, que no tiene ligando asociado), por ejemplo, monómero-conector-NH_2, se puede incorporar en la hebra del compuesto oligomérico en crecimiento. En una

operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor en la hebra, un ligando que tiene un grupo electrofílico, por ejemplo, un pentafluorofenil éster o grupo aldehído, puede ser unido posteriormente al monómero precursor por acoplamiento del grupo electrofílico del ligando con el grupo nucleofílico terminal de la unión del monómero precursor.

En otro ejemplo, se puede incorporar un monómero que tiene un grupo químico adecuado para participar en la reacción de química instantánea por ejemplo, un unión/conector terminado en azida o alquino. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor en la hebra, se puede unir un ligando que tiene un grupo químico complementario, por ejemplo un alquino o azida al monómero precursor mediante acoplamiento del alquino y la azida juntos.

En algunas formas de realización, el ligando se puede conjugar con nucleobases, unidades de azúcar, o uniones internucleosídicas del compuesto oligomérico. La conjugación a nucleobases purina o derivados de las mismas puede ocurrir en cualquier posición que incluye, átomos endocíclicos y exocíclicos. En algunas formas de realización, las posiciones 2, 6, 7 u 8 de una nucleobase purina están unidas a una unidad de conjugado. La conjugación a las nucleobases pirimidina o derivados de las mismas también puede ocurrir en cualquier posición. En algunas formas de realización, las posiciones 2, 5 y 6 de una nucleobase pirimidina pueden sustituirse por una unidad de conjugado. Cuando un ligando se conjuga a una nucleobase, la posición preferida es una que no interfiere con la hibridización, es decir, no interfiere con la formación de interacciones de uniones de hidrógeno requeridas para el apareamiento de bases.

La conjugación a unidades azúcares de los nucleósidos puede ocurrir en cualquier átomo de carbono. Los átomos de carbono ejemplificativos de una unidad de azúcar que se pueden unir a una unidad de conjugado incluyen los átomos de carbono 2', 3' y 5'. La posición 1' también puede unirse a una unidad de conjugado, tal como en un residuo abásico. Las uniones internucleosídicas también pueden portar unidades de conjugado. Para las uniones que contienen fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditiotato, fosforoamidato, y similares), la unidad de conjugado puede unirse directamente al átomo de fósforo o a un átomo de O, N o S unido al átomo de fósforo. Para las uniones internucleosídicas que contienen amina o amida (por ejemplo, PNA), la unidad de conjugado se puede unir al átomo de nitrógeno de la amina o amida o a un átomo de carbono adyacente.

En algunas formas de realización, el compuesto REVERSIR está conjugado con un ligando.

Si bien es útil el direccionamiento del compuesto REVERSIR a una ubicación deseada de acción, el ligando conjugado con el compuesto REVERSIR puede afectar negativamente la capacidad del compuesto REVERSIR para reducir la actividad de ARNhd. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la unión entre el ligando y el compuesto REVERSIR se puede diseñar para que se produzca la escisión después de que el compuesto REVERSIR alcance una ubicación deseada de acción. Esto puede ser logrado de diversas maneras. Por ejemplo, el conector que conecta el compuesto REVERSIR al ligando puede ser un conector escindible.

En algunas formas de realización, el nucleósido conjugado con el ligando comprende un desoxiazúcar, por ejemplo, un 2’-desoxiazúcar.

En algunas formas de realización de los diferentes aspectos descritos en la presente, el ligando está unido al nucleósido en el extremo 3’ del compuesto REVERSIR. En algunas formas de realización, el nucleótido conjugado al ligando está unido al resto del compuesto REVERSIR mediante un unión internucleotídica escindible. En alguna forma de realización, la unión internucleotídica escindible es una unión internucleotídica fosfodiéster.

En algunas formas de realización, el nucleótido conjugado a ligando comprende un desoxiazúcar y está unido al resto del compuesto REVERSIR mediante una unión internucleotídica escindible. En otras formas de realización adicionales, la unión internucleotídica escindible es una unión fosfodiéster.

En algunas formas de realización, el nucleótido conjugado a ligando comprende un desoxiazúcar y está unido al resto del compuesto REVERSIR mediante una unión internucleotídica que no es una unión fosfodiéster.

En algunas formas de realización, el ligando está conjugado al nucleótido en el extremo 3’ del compuesto REVERSIR.

En algunas formas de realización, el ligando está conjugado al extremo 5’ del compuesto REVERSIR. En algunas formas de realización, un primer ligando está conjugado al extremo 5’ del compuesto REVERSIR y un segundo ligando está conjugado al primer ligando.

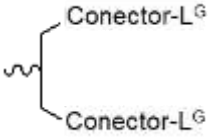
Existen numerosos métodos para preparar conjugados de compuestos oligoméricos. En general, un compuesto oligomérico se une a una unidad de conjugado mediante el contacto con un grupo reactivo (por ejemplo, OH, SH, amina, carboxilo, aldehído, y similares) en el compuesto oligomérico con un grupo reactivo en la unidad de conjugado. En algunas formas de realización, un grupo reactivo es electrofílico y el otro es nucleofílico.

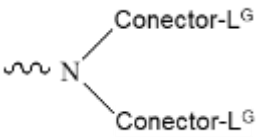
Por ejemplo, un grupo electrofílico puede ser una funcionalidad que contiene carbonilo y un grupo nucleofílico puede ser una amina o tiol. Los métodos para la conjugación de ácidos nucleicos y compuestos oligoméricos relacionados con y sin grupos conectores se encuentran bien descritos en la literatura tal como, por ejemplo, en Manoharan in Antisense Research and Applications, Crooke y LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Capítulo 17, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

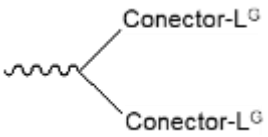
Las patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de conjugados de compuestos oligoméricos, por ejemplo, oligonucleótidos, incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.828.979; 4.948.882; 5.218. 105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578. 717. 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118. 802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578. 718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762. 779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904. 582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082. 830; 5.112.963; 5.149.782; 5.214.136; 5.245.022; 5.254. 469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317. 098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203. 5.451.463; 5.510. 475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574. 142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599. 923; 5.599.928; 5.672.662; 5.688.941; 5.714.166; 6.153. 737; 6.172.208; 6.300.319; 6.335.434; 6.335.437; 6.395. 437; 6.444.806; 6.486.308; 6.525.031; 6.528.631; 6.559. 279; cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad a modo de referencia.

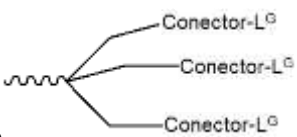
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos

REVERSIR, comprende un ligando que tiene una estructura que se muestra a continuación:



,


,


, o


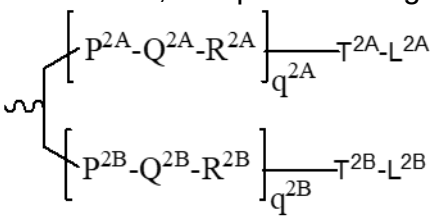
,

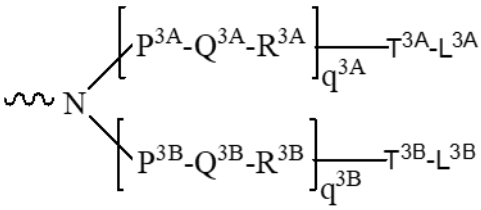
en donde:

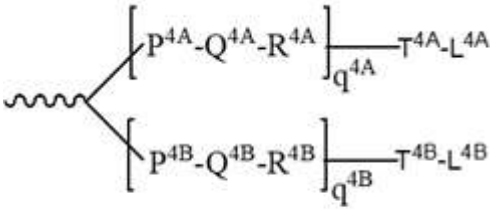
L^G es en forma independiente en cada aparición un ligando, por ejemplo, hidrato de carbono, por ejemplo monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, polisacárido; y

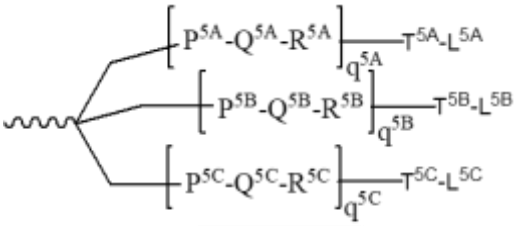
Z', Z", Z"' y Z"" son cada uno en forma independiente en cada aparición O o S.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de Fórmula (II), (III), (IV) o (V):



Fórmula (II)
,


Fórmula (III)
,


Fórmula (IV)
, o


Fórmula (V)
,

en donde:

q^{2A}, q^{2B}, q^{3A}, q^{3B}, $q4^{A}$, q^{4B}, q^{5A}, q^{5B} y q^{5C} representan en forma

independiente en cada aparición 0 a 20 y donde la unidad repetitiva puede ser la misma o diferente;

Q y Q' están ausentes en forma independiente en cada aparición, $–(P^{7}\text{-}Q^{7}\text{-}R^{7})_{p}\text{-}T^{7}\text{-}$ o $–T^{7}\text{-}Q^{7}\text{-}T^{7'}\text{-B-}T^{8'}\text{-}Q^{8}\text{-}T^{8}$;

P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, P^{7}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C}, T^{7}, $T^{7'}$, T^{8} y $T^{8'}$ están ausentes en forma independiente en cada aparición, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2, CH_2NH o CH_2O;

B es $–CH_2\text{-}N(B^{L})\text{-}CH_2\text{-}$;

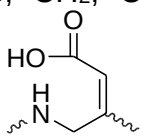
B^{L} es $–T^{B}\text{-}Q^{B}\text{-}T^{B'}\text{-}R^{x;}$

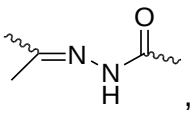
Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C}, Q^{7}, Q^{8} y Q^{B} están ausentes en forma independiente en cada aparición, alquileno, alquileno sustituido y donde uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados por uno o más de O, S, S(O), SO_2, $N(R^{N})$, C(R')=C(R'), C≡C o C(O);

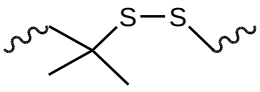
T^{B} y $T^{B'}$ están ausentes en forma independiente en cada aparición, CO, NH, O, S, OC(O), OC(O)O, NHC(O), NHC(O)NH, NHC(O)O, CH_2, CH_2NH o CH_2O;

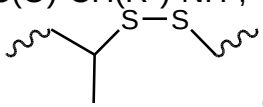
R^{x} es un lipófilo (por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo, o fenoxazina), una vitamina (por ejemplo, folato, vitamina A, vitamina E, biotina, piridoxal), un péptido, un hidrato de carbono (por ejemplo, monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido, polisacárido), un componente endosomolítico, un esteroide (por ejemplo, uvaol, hecigenina, diosgenina), un

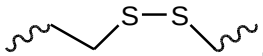
terpeno (por ejemplo, triterpeno, por ejemplo, sarsasapogenina, Friedelina, ácido litocólico derivatizado con epifriedelanol), o un lípido catiónico;

R^1, R^2, R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C}, R^7 están ausentes en forma independiente en cada aparición, NH, O, S, CH_2, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O, 

, 

, 

, 

, 

, o heterociclilo;

L^1, L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} son cada uno en forma independiente en cada aparición un hidrato de carbono, por ejemplo, monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido y polisacárido;

R' y R" son cada uno en forma independiente H, C^1-C_6 alquilo, OH, SH, o $N(R^N)_2$;

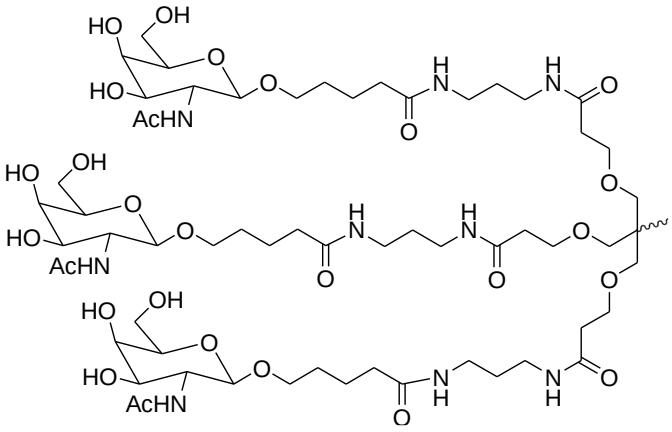
R^N es en forma independiente en cada aparición H, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o bencilo;

R^a es H o cadena lateral de aminoácido;

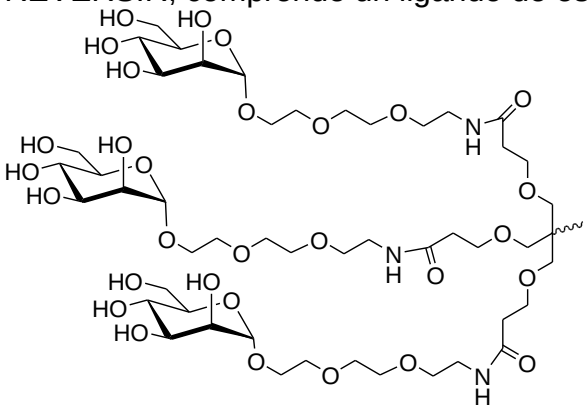
Z', Z", Z"' y Z"" son cada uno en forma independiente en cada aparición O o S;

p representa en forma independiente en cada aparición entre 0 y 20.

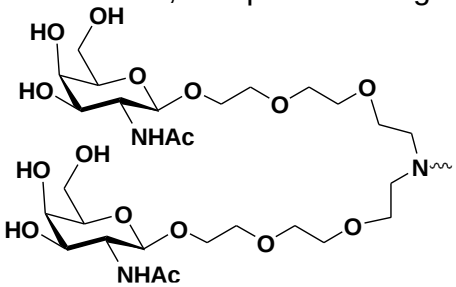
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:

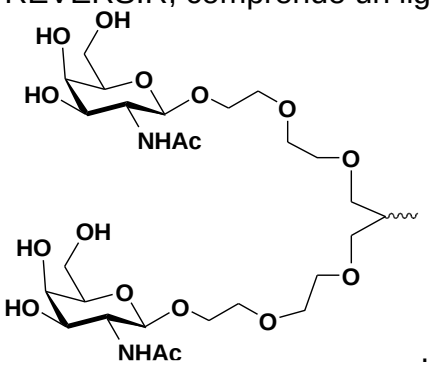


En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



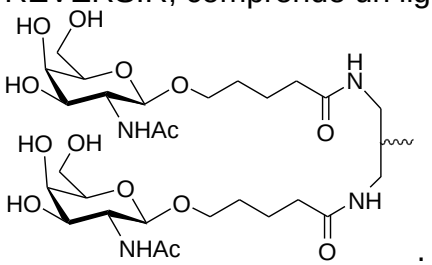
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos

REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



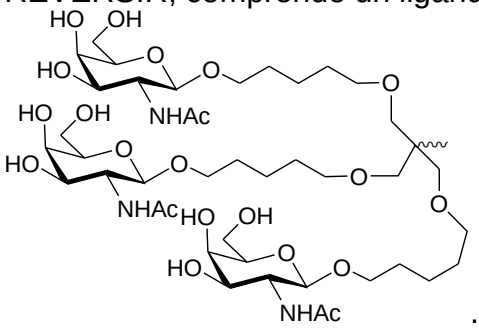
.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



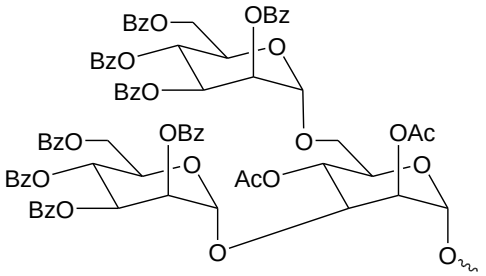
.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:

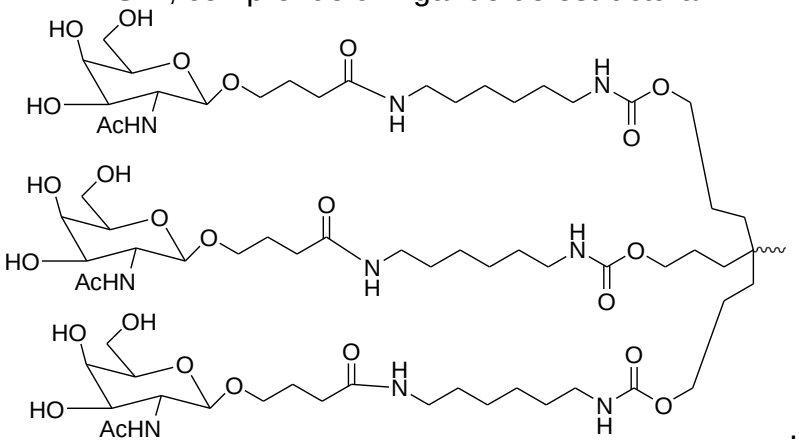


.

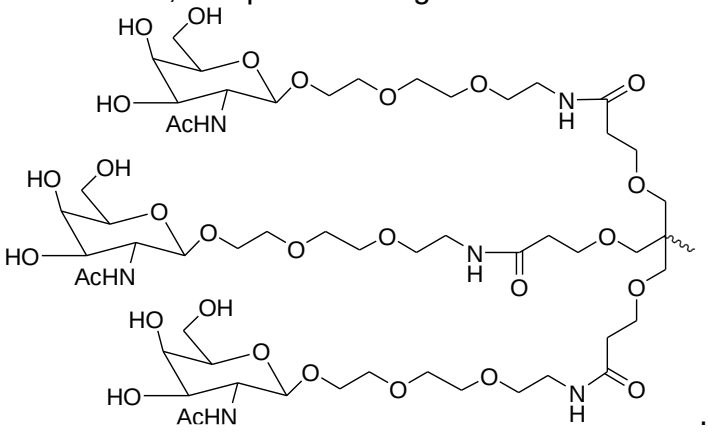
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:

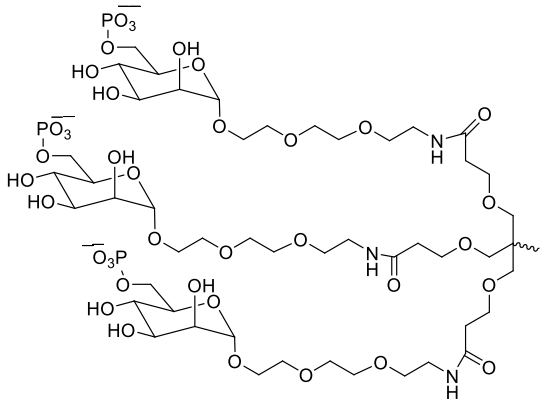


En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



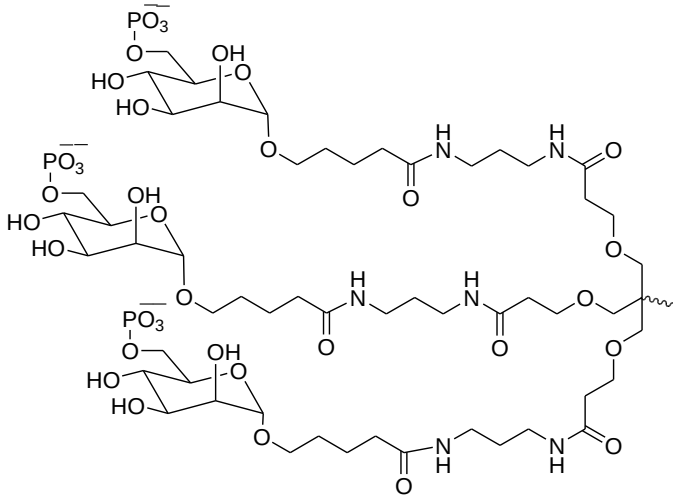
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos

REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



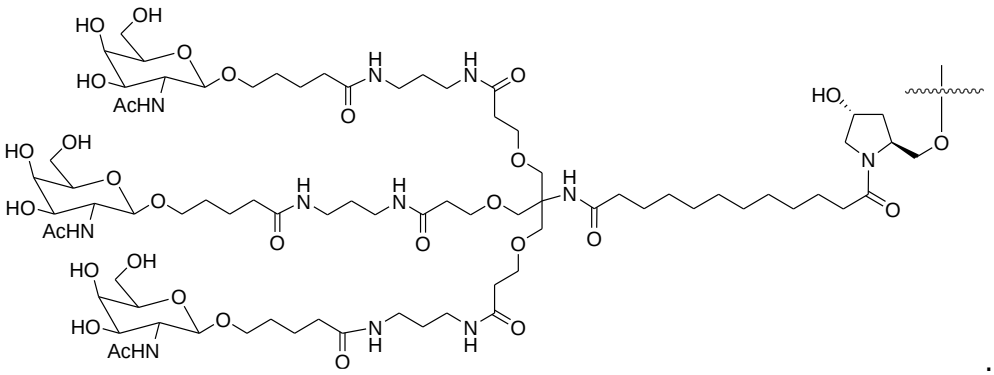
.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:

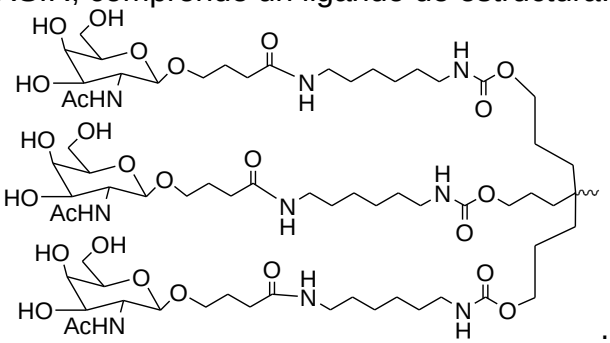


.

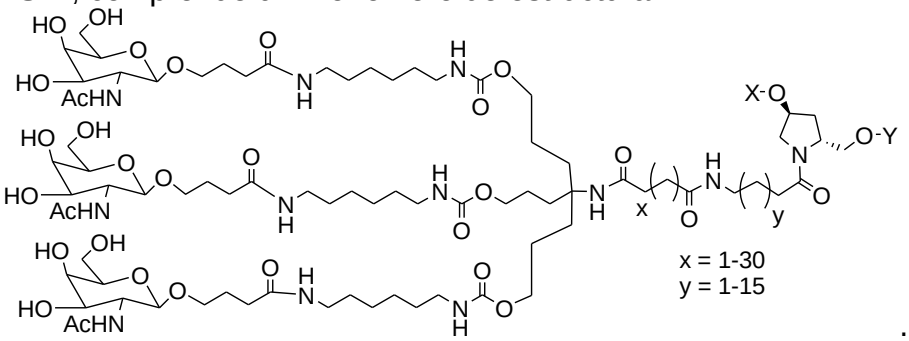
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



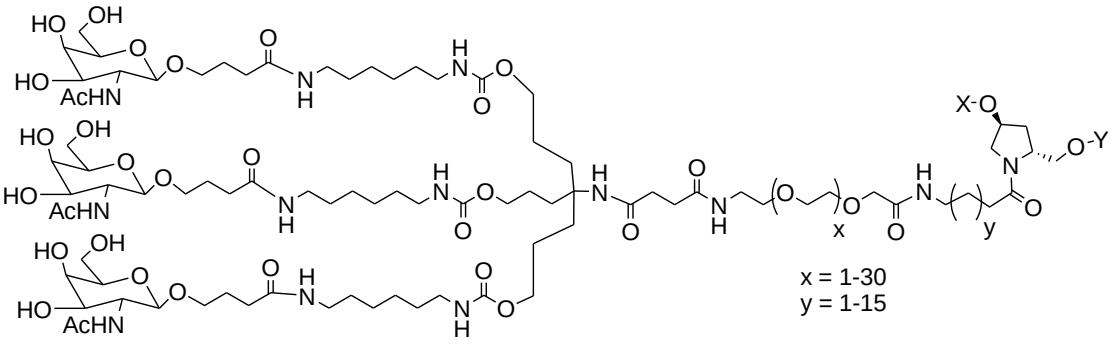
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



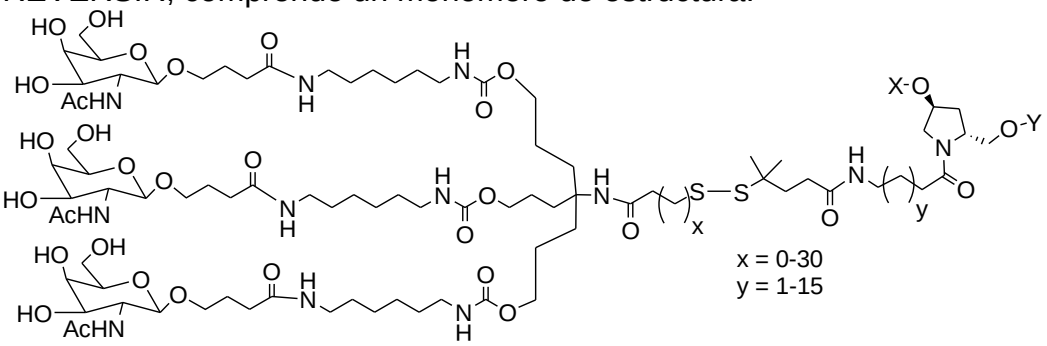
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



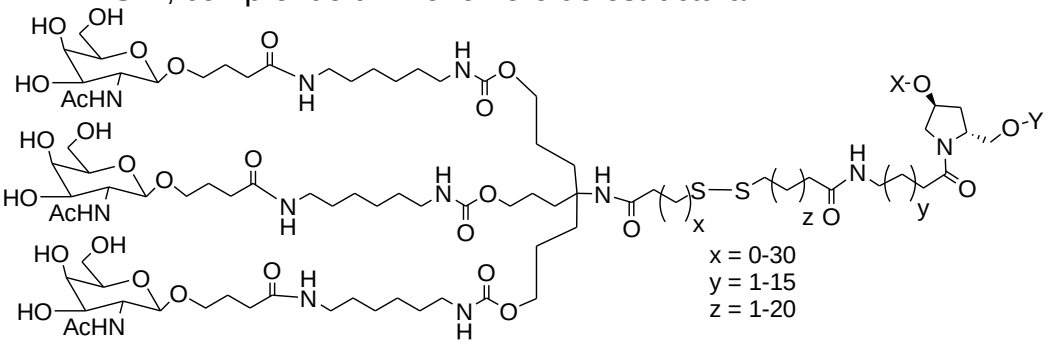
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



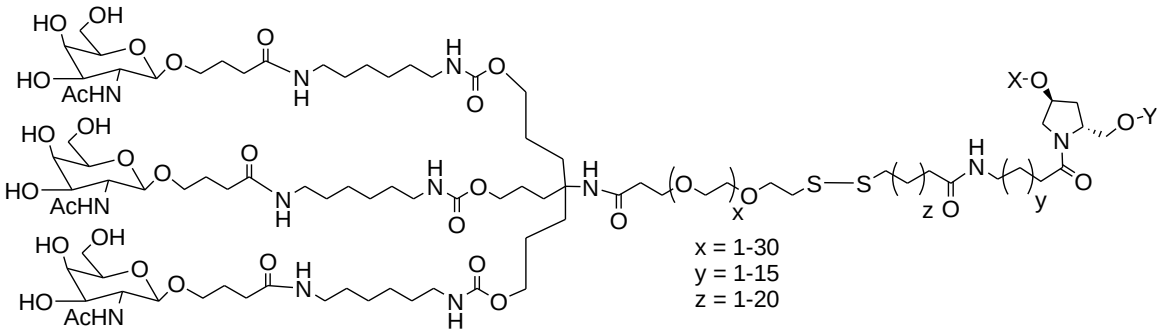
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



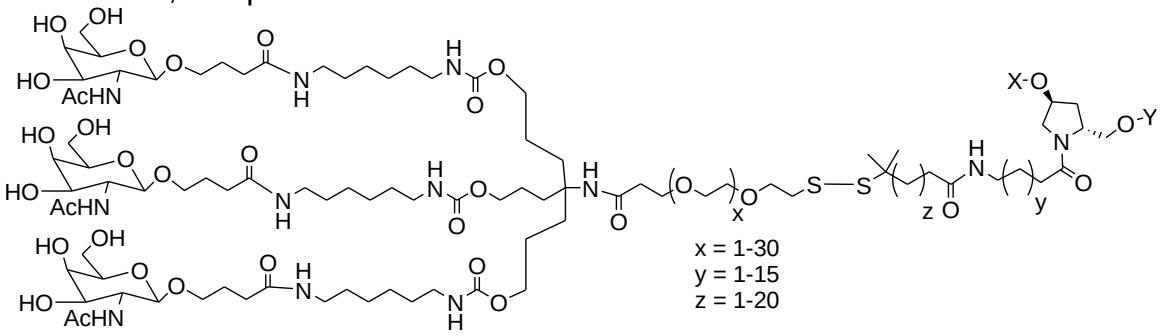
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



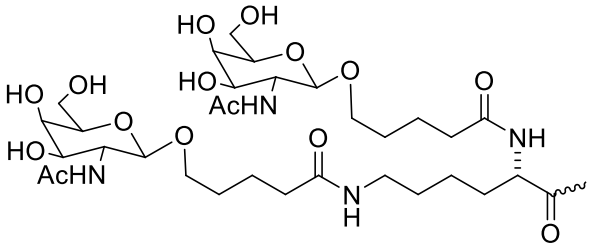
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



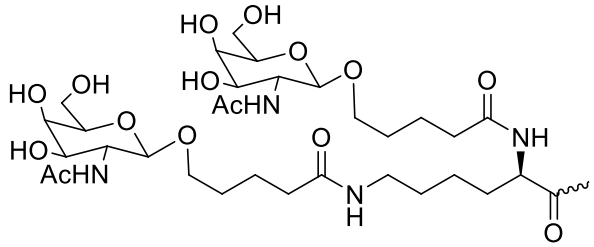
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



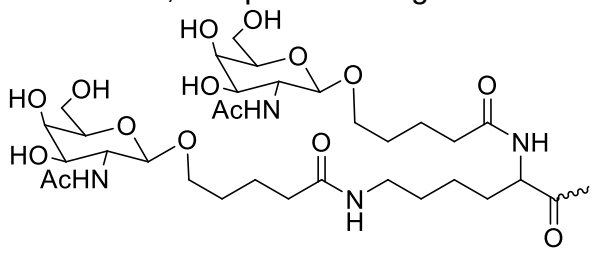
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



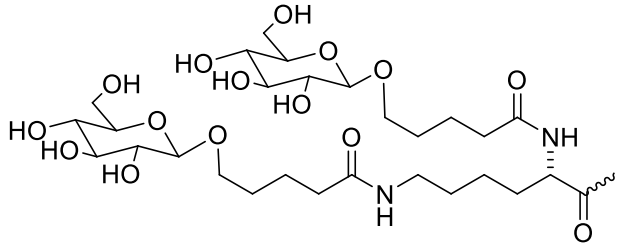
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



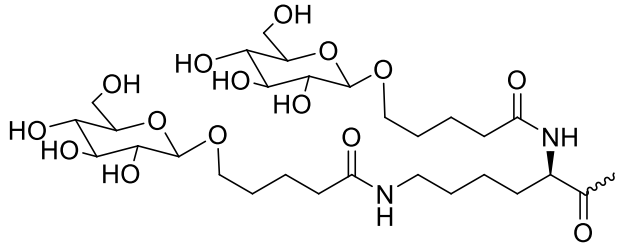
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:

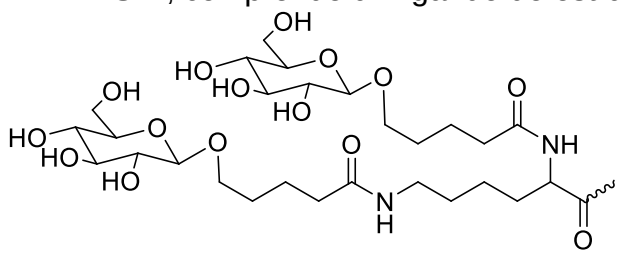


En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:

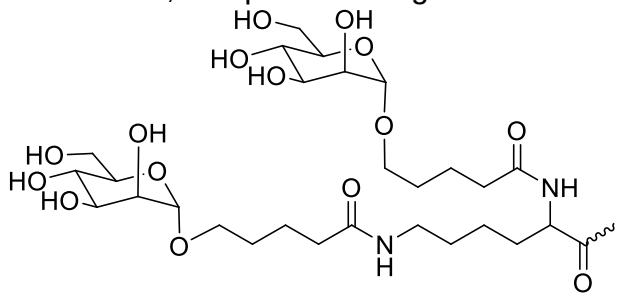


En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico

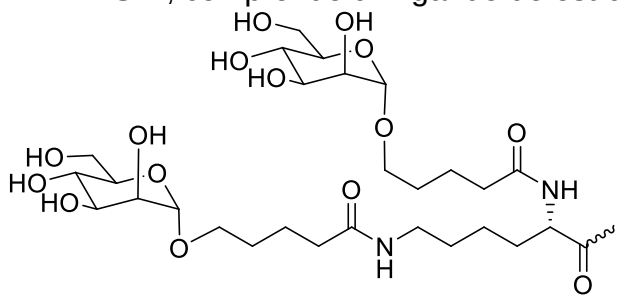
descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



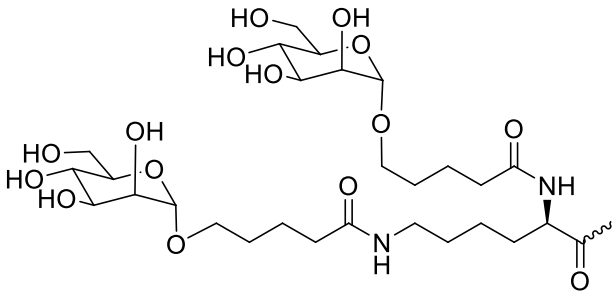
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



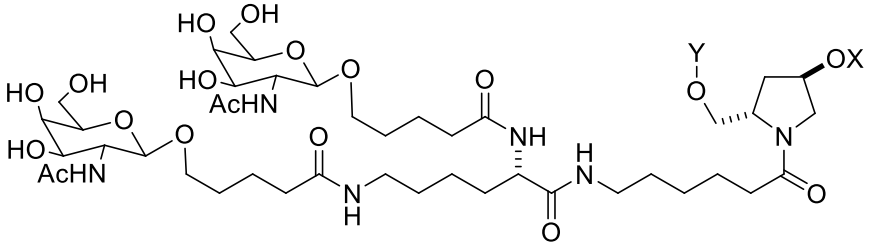
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



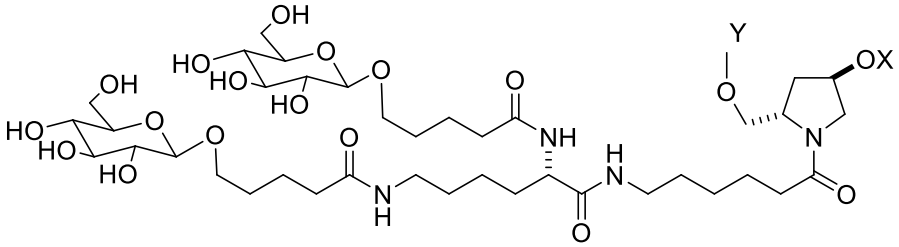
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



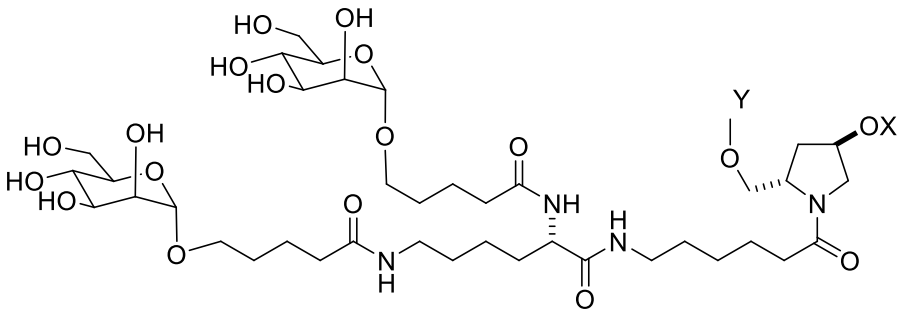
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



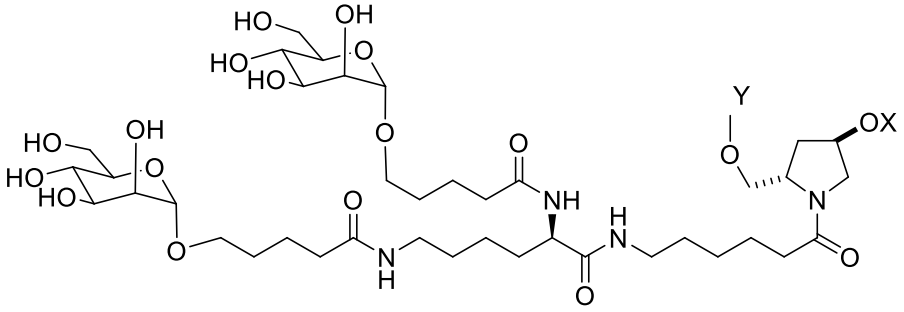
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



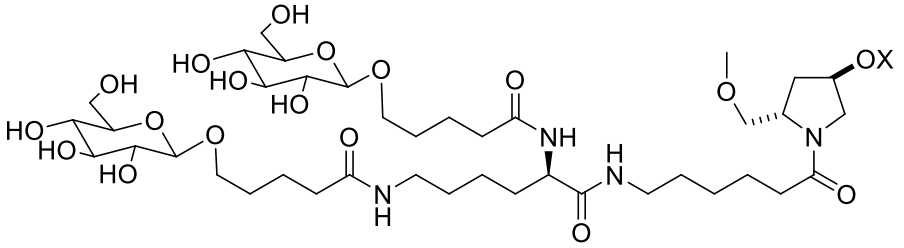
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



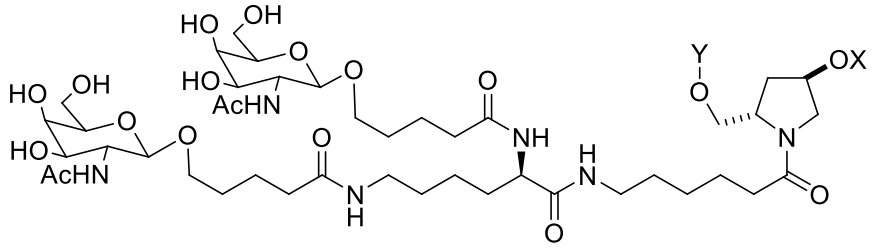
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



En algunas formas de realización L^{2A} y L^{2B} son diferentes.

En algunas formas de realización preferidas L^{3A} y L^{3B} son los mismos.

En algunas formas de realización L^{3A} y L^{3B} son diferentes.

En algunas formas de realización preferidas L^{4A} y L^{4B} son los mismos.

En algunas formas de realización L^{4A} y L^{4B} son diferentes.

En algunas formas de realización preferidas L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} son los mismos.

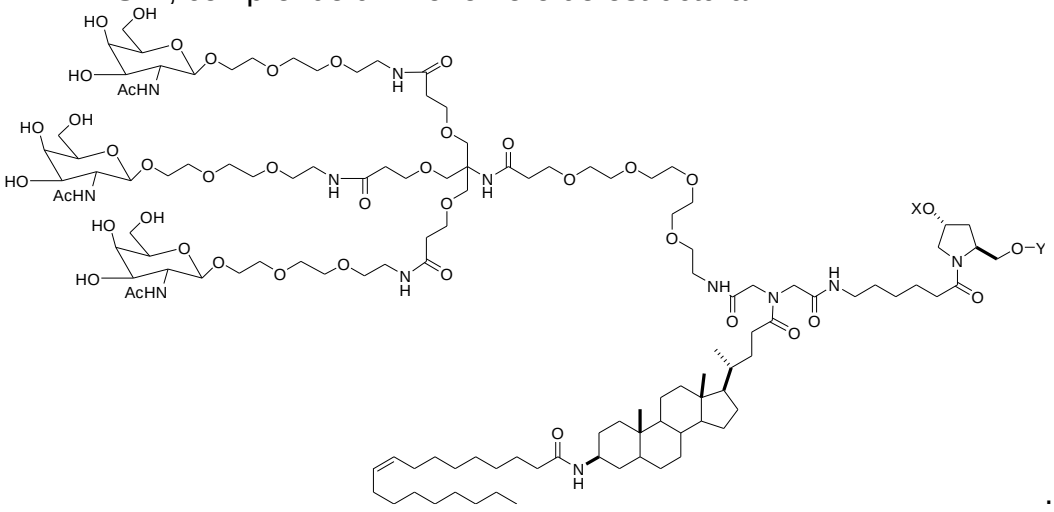
En algunas formas de realización dos de L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} son los mismos

En algunas formas de realización L^{5A} y L^{5B} son los mismos.

En algunas formas de realización L^{5A} y L^{5C} son los mismos.

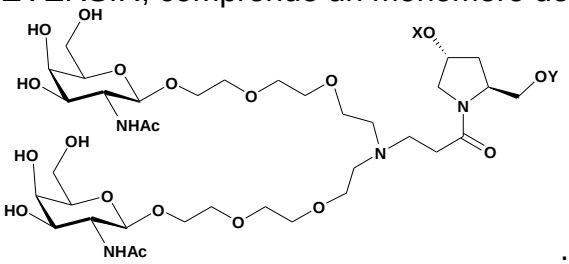
En algunas formas de realización L^{5B} y L^{5C} son los mismos.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



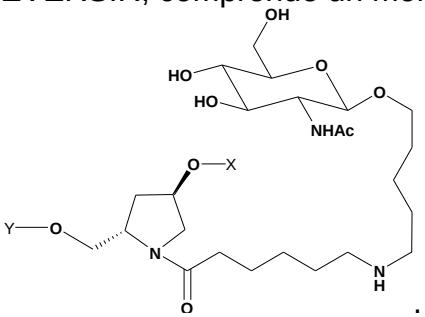
.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



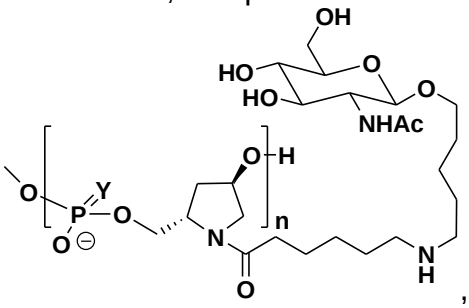
.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



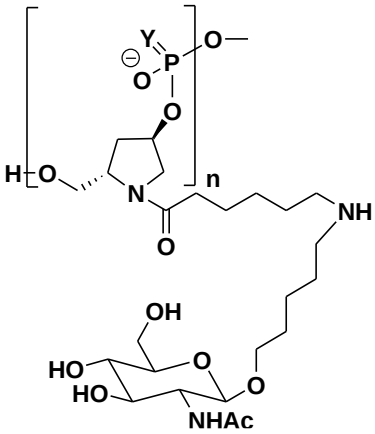
.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



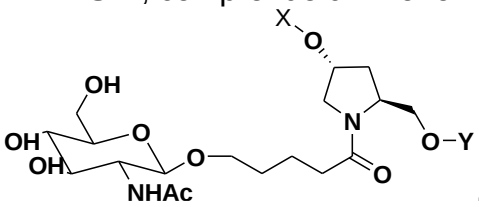
, donde Y es O o S y n es entre 3 y 6.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



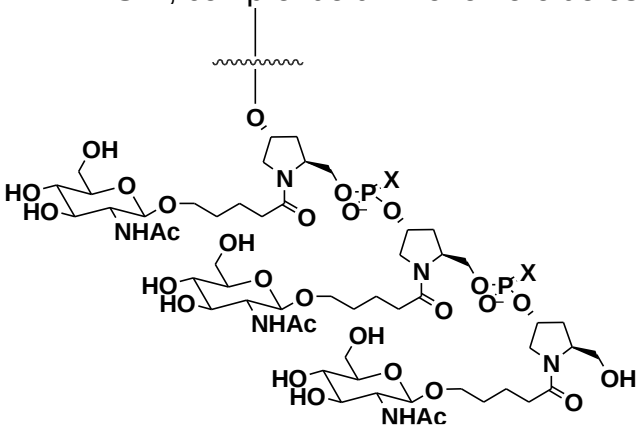
, donde Y es O o S y n es entre 3 y 6.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



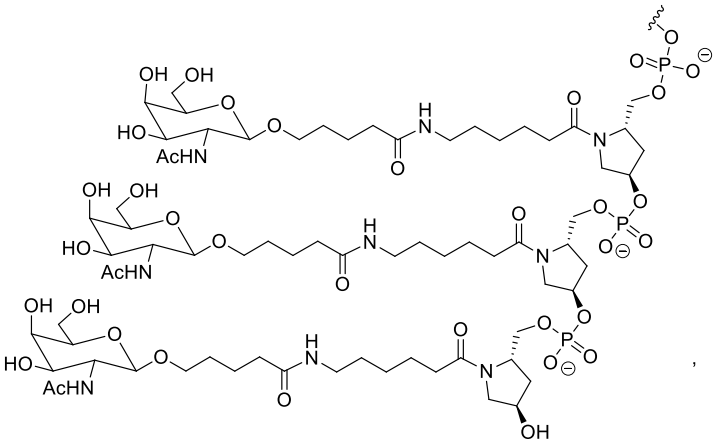
.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:

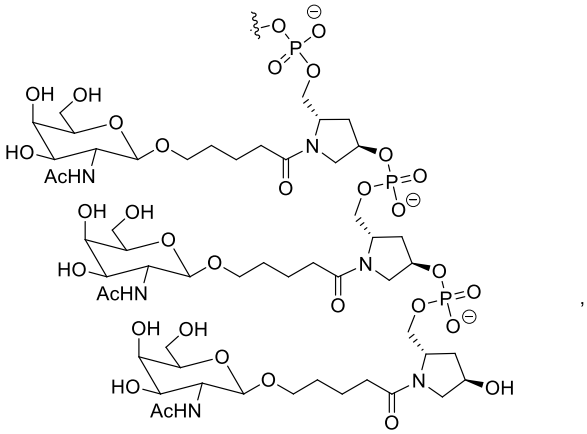


, donde X es O o S.

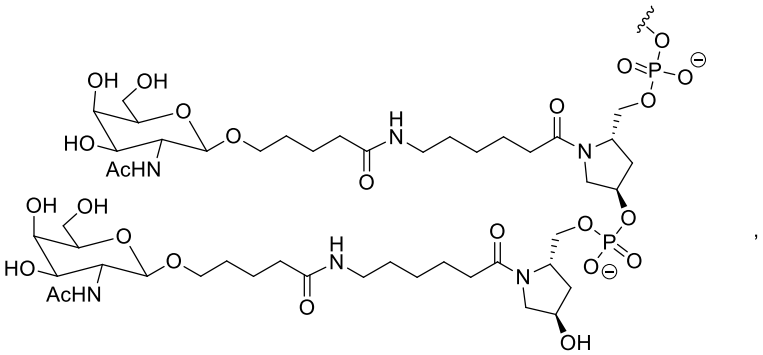
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero seleccionado del grupo que consiste en:



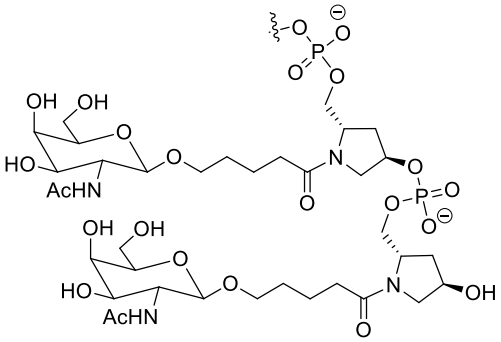
,



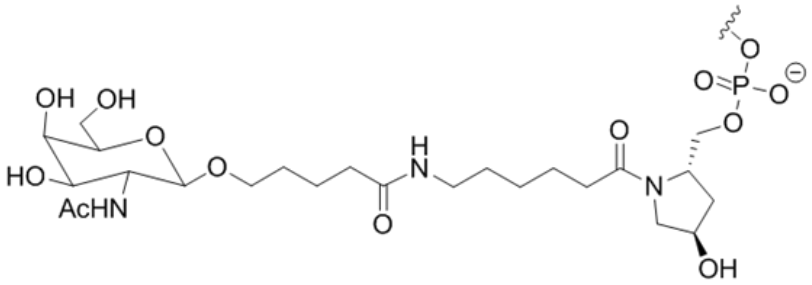
,



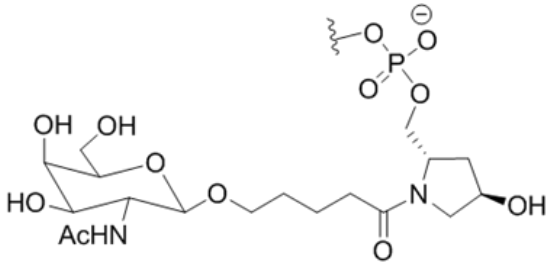
,



,

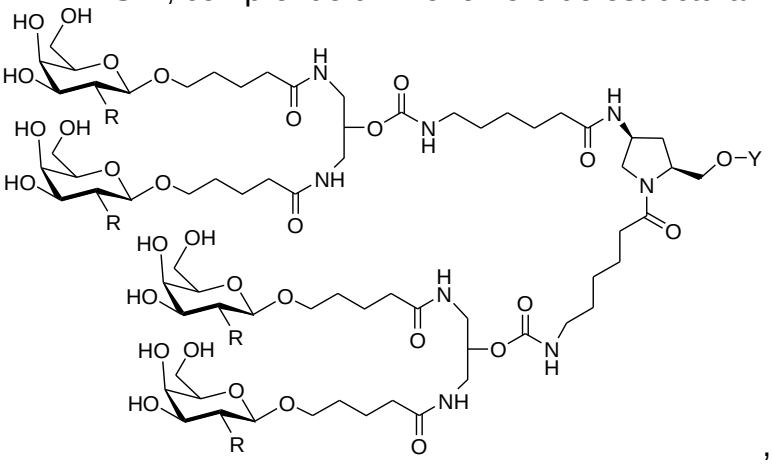


, y



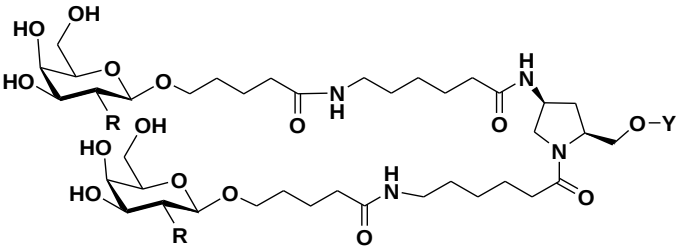
.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



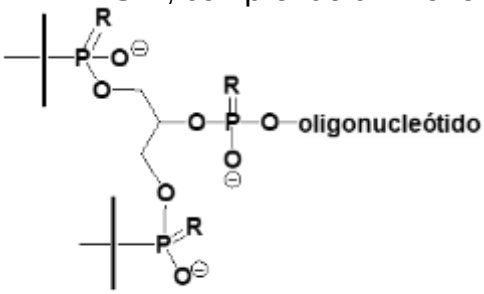
, donde R es OH o NHCOOH.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



, donde R es OH o NHCOOH.

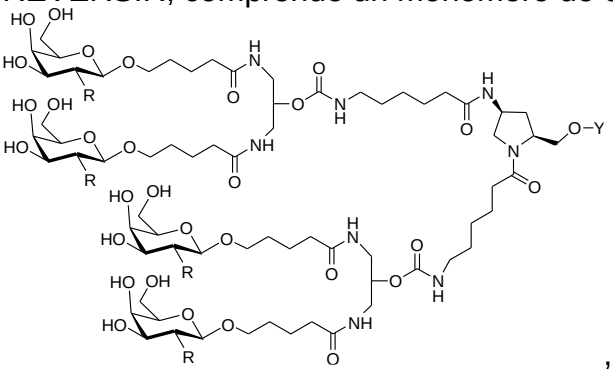
En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



Fórmula (VII)

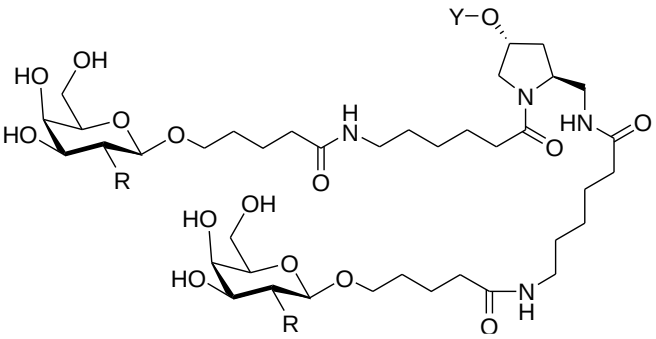
, donde R es O o S.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:

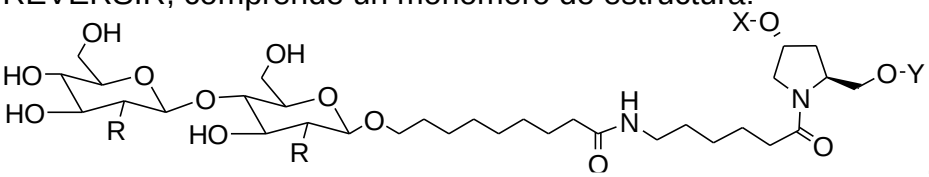


, donde R es OH o NHCOOH.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:

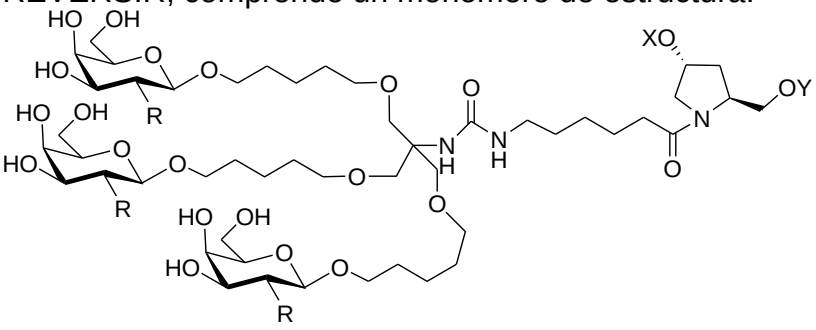


En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



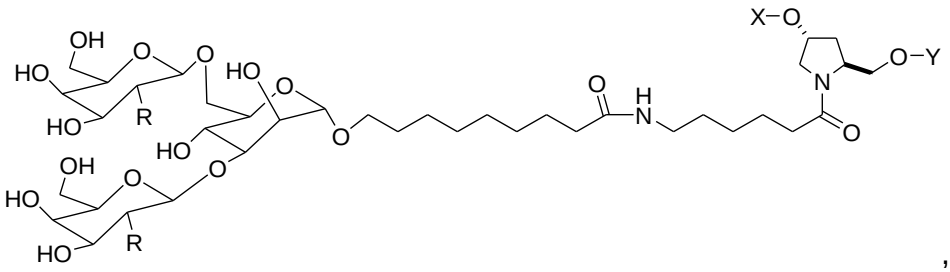
, donde R es OH o NHCOOH.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



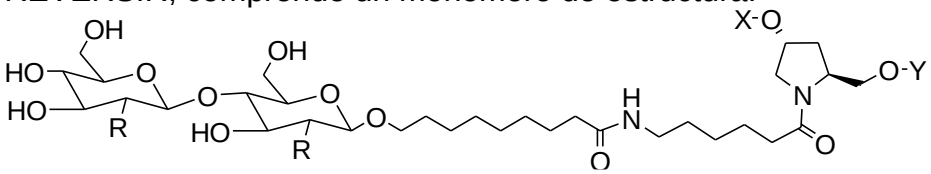
, donde R es OH o NHCOOH.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



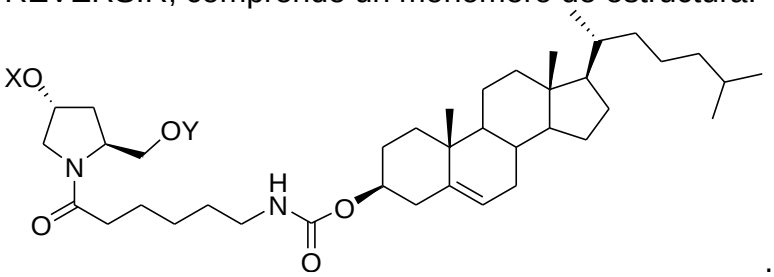
, donde R es OH o NHCOOH.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:



, donde R es OH o NHCOOH.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un monómero de estructura:

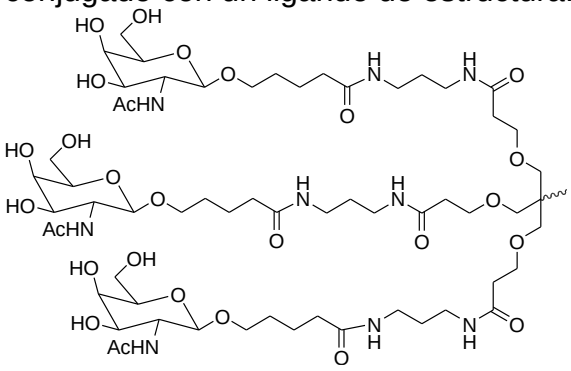


.

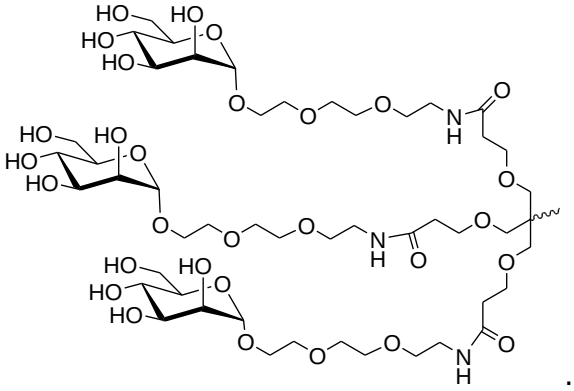
En los monómeros descritos precedentemente, X e Y son cada uno en forma independiente en cada aparición H, un grupo protector, un grupo fosfato, un grupo fosfodiéster, un grupo fosfato activado, un grupo fosfito activado, una fosforamidita, un soporte sólido, -P(Z')(Z")O-nucleósido, -P(Z')(Z")O-oligonucleótido, un lípido, un PEG, un esteroide, un polímero, un nucleótido, un nucleósido, o un oligonucleótido; y Z' y Z" son cada uno en forma

independiente en cada aparición O o S.

En determinadas formas de realización, el compuesto REVERSIR está conjugado con un ligando de estructura:

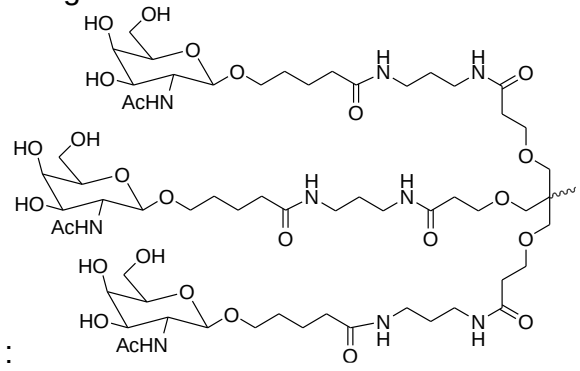


, o

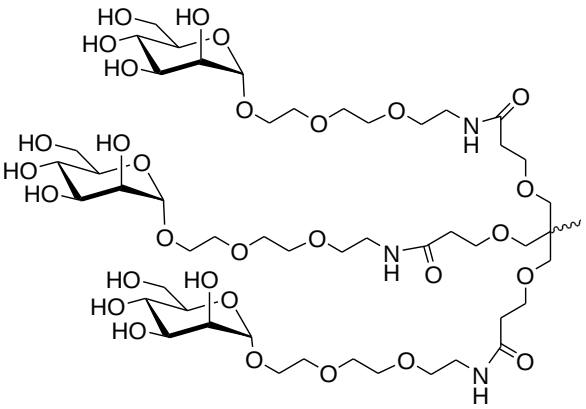


.

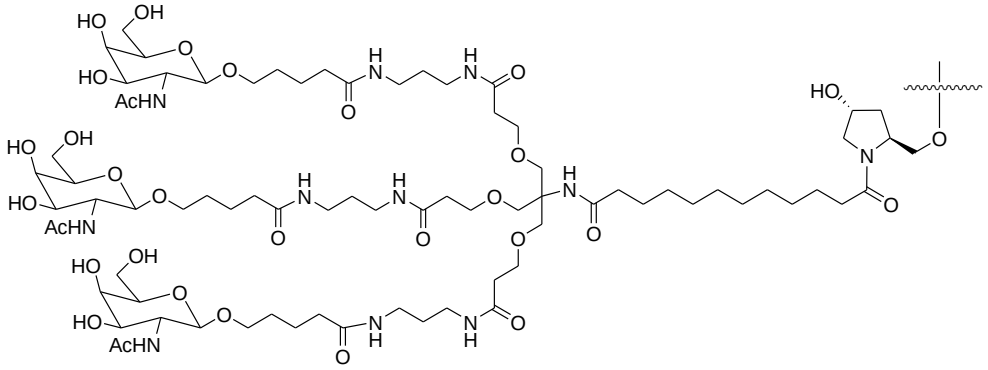
En determinadas formas de realización, el ARNhd conjugado comprende un ligando de estructura:



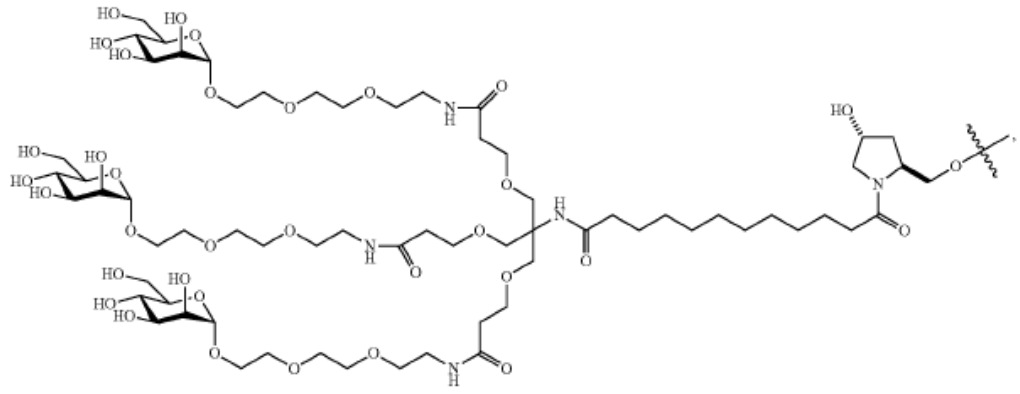
: o



En determinadas formas de realización, el compuesto REVERSIR comprende un monómero de estructura:



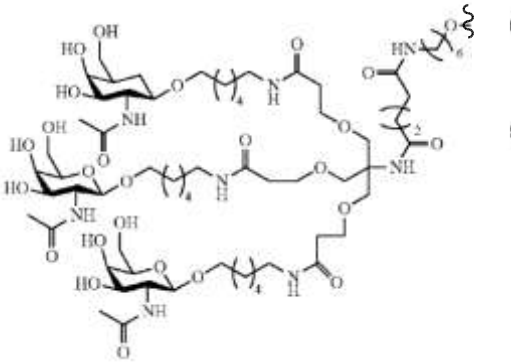
o



La síntesis de los ligandos y monómeros descritos precedentemente se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. No. 8.106.022, cuyo contenido se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos

REVERSIR, comprende un ligando de estructura:



.

En determinadas formas de realización, el compuesto oligomérico descrito en la presente, que incluye pero no se limita a compuestos REVERSIR, comprende un ligando de aquellos descritos en la Patente de los EE.UU. No. 9.181.549 de Prakash y col., cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Los grupos conectores o unidades de unión bifuncionales tales como aquellas conocidas en el arte son posibles para los compuestos provistos en la presente. Los grupos conectores son útiles para la unión de grupos funcionales químicos, grupos conjugados, grupos reporteros y otros grupos en sitios selectivos en un compuesto parental tal como por ejemplo un compuesto oligomérico. En general una unidad conectora bifuncional comprende una unidad hidrocarbilo que tiene dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona para unir a una molécula parental o compuesto de interés y el otro se seleccionar para unir esencialmente cualquier grupo seleccionado tal como un grupo funcional químico o grupo conjugado. En algunas formas de realización, el conector comprende una estructura de cadena o un oligómero de unidades repetitivas tal como unidades de

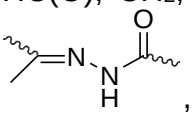
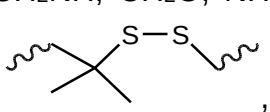
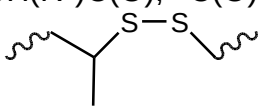
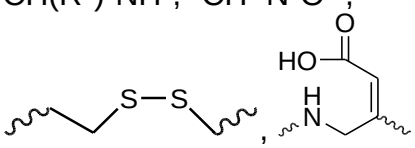
etilenglicol o de aminoácido. Los ejemplos de grupos funcionales que se usan de rutina en una unidad conectora bifuncional incluyen, a título enunciativo no taxativo, electrófilos para reaccionar con grupos nucleofílicos y nucleofílicos para reaccionar con grupos electrofílicos. En algunas formas de realización, las unidades de unión bifuncionales incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, enlaces dobles o triples), y similares. Algunos ejemplos no limitantes de unidades de unión bifuncionales incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), succinimidilo 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) y ácido 6-aminohexanoico (AHEX o AHA). Otros grupos conectores incluyen, a título enunciativo no taxativo, C1-C10 alquilo sustituido, C2-C10 alquenilo sustituido o no sustituido o C2-C10 alquinilo sustituido o no sustituido, donde una lista no limitante de grupos sustituyentes preferidos incluye hidroxilo, amino, alcoxilo, carboxilo, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxilo, halógeno, alquilo, arilo, alquenilo y alquinilo.

En determinadas formas de realización, el ligando está conjugado con el compuesto oligomérico mediante un conector.

Tal como se usa en la presente, el término "conector" se refiere a una unidad orgánica que conecta dos partes de un compuesto. Los conectores típicamente comprenden un enlace directo o un átomo tal como oxígeno o azufre, una unidad tal como NR^1, C(O), C(O)NH, SO, SO_2, SO_2NH o una cadena de átomos, tal como alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquinilo, heterocicliloalquilo, heterocicliloalquenilo,

heterociclliloalquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilarilalquilo, alquilarilalquenilo, alquilarilalquinilo, alqueniloarilalquilo, alqueniloarilalquenilo, alqueniloarilalquinilo, alquiniloarilalquilo, alquiniloarilalquenilo, alquiniloarilalquinilo, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalquenilo, alquilheteroarilalquinilo, alqueniloheteroarilalquilo, alqueniloheteroarilalquenilo, alqueniloheteroarilalquinilo, alquiniloheteroarilalquilo, alquiniloheteroarilalquenilo, alquiniloheteroarilalquinilo, alquilheterociclliloalquilo, alquilheterociclliloalquenilo, alquilheterociclliloalquinilo, alqueniloheterociclliloalquilo, alqueniloheterociclliloalquenilo, alqueniloheterociclliloalquinilo, alquiniloheterociclliloalquilo, alquiniloheterociclliloalquenilo, alquiniloheterociclliloalquinilo, alquilarilo, alqueniloarilo, alquiniloarilo, alquilheteroarilo, alqueniloheteroarilo, alquiniloheteroarilo, donde uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados con O, S, S(O), SO_2, $N(R^1)_2$, C(O), grupo conector escindible, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocíclico sustituido o no sustituido; donde R^1 es hidrógeno, acilo, alifático o alifático sustituido.

En una forma de realización, el conector es $–[(P\text{-}Q''\text{-}R)_q\text{-}X\text{-}(P'\text{-}Q'''\text{-}R')_{q'}]_{q''}$-T-, donde:

P, R, T, P', R' y T están ausentes en forma independiente en cada aparición, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2, CH_2NH, CH_2O; NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CH=N-O,  ,  ,  ,  o heterociclilo;

Q'' y Q''' están ausentes en forma independiente en cada aparición, $-(CH_2)_n$-, -

$C(R^1)(R^2)(CH_2)_n$-, -$(CH_2)_nC(R^1)(R^2)$-, -$(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2$-, o -$(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2NH$-;

X está ausente o es un grupo conector escindible;

R^a es H o una cadena lateral de aminoácido;

R^1 y R^2 son cada uno en forma independiente en cada aparición H, CH_3, OH, SH o $N(R^N)_2$;

R^N es en forma independiente en cada aparición H, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o bencilo;

q, q' y q" son cada uno en forma independiente en cada aparición entre 0 y 20 y donde la unidad repetitiva puede ser la misma o diferente;

n es en forma independiente en cada aparición entre 1 y 20; y

m es en forma independiente en cada aparición entre 0 y 50.

En algunas formas de realización, el conector comprende por lo menos un grupo conector escindible.

En algunas formas de realización, el conector es un conector ramificado. El punto de ramificación del conector ramificado puede ser un átomo por lo menos trivalente, pero puede tetravalente, pentavalente o hexavalente, o un grupo que presenta dichas múltiples valencias. En algunas formas de realización, el punto de ramificación es -N, -N(Q)-C, -O-C, -S-C, -SS-C, -C(O)N(Q)-C, -OC(O)N(Q)-C, -N(Q)C(O)-C o -N(Q)C(O)O-C; donde Q es en forma independiente en cada aparición H o alquilo opcionalmente sustituido. En algunas formas de realización, el punto de ramificación es glicerol o un derivado del mismo.

Un grupo conector escindible es uno que es suficientemente estable fuera de la célula, pero que cuando entra en la célula diana es escindido para

liberar las dos partes que el conector está manteniendo juntas. En una forma de realización preferida, el grupo conector escindible es escindido por lo menos 10 veces o más, preferiblemente por lo menos 100 veces más rápido en la célula diana o en una primera condición de referencia (que puede ser, por ejemplo, seleccionada para mimetizar o representar las condiciones intracelulares) que en la sangre o suero de un sujeto, o en una segunda condición de referencia (que puede ser, por ejemplo, seleccionada para mimetizar o representar condiciones encontradas en la sangre o suero).

Los grupos conectores escindibles son susceptibles de agentes de escisión, por ejemplo, pH, potencial redox o la presencia de moléculas degradadoras. En general, los agentes de escisión son más prevalentes o se encuentran en mayores niveles o actividades dentro de las células que en suero o sangre. Los ejemplos de dichos agentes degradadores incluyen: agentes redox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad de sustrato, que incluyen, por ejemplo, enzimas oxidativas o reductoras tales como mercaptanos, presentes en células, que pueden degradar un grupo conector escindible por reacción mediante reducción; esterasas; amidasas; endosomas o agentes que pueden crear un ambiente ácido, por ejemplo, aquellos que generan un pH de cinco o menor; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo conector escindible por ácido mediante la acción de un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas de sustrato) y proteasas, y fosfatasas.

Un conector puede incluir un grupo conector escindible que puede ser escindido por una enzima en particular. El tipo de grupo conector escindible incorporado a un conector puede depender de la célula a la cual está dirigido.

Por ejemplo, los ligandos de direccionamiento a hígado pueden unirse a lípidos catiónicos mediante un conector que incluye un grupo éster. Las células del hígado son ricas en esterasas, y por lo tanto el conector será escindido de manera más eficaz en las células del hígado que en tipos celulares que no son ricos en esterasas. Otros tipos de células ricos en esterasas incluyen células de los pulmones, de la corteza renal y de los testículos.

Los conectores que contienen enlaces peptídicos se pueden usar cuando se direccionan a tipos de células ricas en peptidasas, tales como las células del hígado y los sinoviocitos.

En algunas formas de realización, el grupo conector escindible es escindido por lo menos 1,25, 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para mimetizar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para mimetizar condiciones extracelulares). En algunas formas de realización, el grupo conector escindible es escindido en menos del 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% en la sangre (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para mimetizar condiciones extracelulares) en comparación con adentro de la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para mimetizar condiciones intracelulares).

Los grupos conectores escindibles ejemplificativos incluyen, a título enunciativo no taxativo, grupos conectores escindibles por reacción redox (por ejemplo, -S-S- y $–C(R)_2$-S-S-, donde R es H o C_1-C_6 alquilo y por lo menos un R es C_1-C_6 alquilo tal como CH_3 o CH_2CH_3); grupos conectores escindibles basados en fosfato (por ejemplo, -O-P(O)(OR)-O-, -O-P(S)(OR)-O-, -O-P(S)(SR)-O-, -S-P(O)(OR)-O-, -O-P(O)(OR)-S-, -S-P(O)(OR)-S-, -O-P(S)(ORk)-

S-, -S-P(S)(OR)-O-, -O-P(O)(R)-O-, -O-P(S)(R)-O-, -S-P(O)(R)-O-, -S-P(S)(R)-O-, -S-P(O)(R)-S-, -O-P(S)(R)-S-, . -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, y -O-P(S)(H)-S-, donde R es C_1-C_{10} alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido); grupos conectores escindibles por ácidos (por ejemplo, hidrazonas, ésteres, y ésteres de aminoácidos, -C=NN- y -OC(O)-); grupos conectores escindibles basados en ésteres (por ejemplo, -C(O)O-); grupos conectores escindibles basados en péptidos, (por ejemplo, grupos conectores que son escindidos por enzimas tales como peptidasas y proteasas en las células, por ejemplo, – $NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)$-, donde R^A y R^B son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes). Un grupo conector escindible basado en péptidos comprende dos o más aminoácidos. En algunas formas de realización, la unión de escisión basada en péptidos comprende la secuencia de aminoácidos que es el sustrato de una peptidasa o una proteasa encontrada en las células.

En algunas formas de realización, un grupo conector escindible por ácidos es escindible en un ambiente ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o menor (por ejemplo, aproximadamente 6,5, 5,5, 5,0, o menor), o mediante agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general.

En algunas formas de realización, el conector es un conector oligonucleotídico que incluye, a título enunciativo no taxativo, $(N)_n$; donde N es en forma independiente un nucleótido modificado o no modificado y n es entre 1 y 23. En algunas formas de realización, n es entre 1 y 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas formas de realización, el conector

oligonucleotídico se selecciona del grupo que consiste en GNRA, $(G)_4$, $(U)_4$, y $(dT)_4$, donde N es un nucleótido modificado o no modificado y R es un nucleótido purina modificado o no modificado. Algunos de los nucleótidos en el conector pueden estar involucrados en las interacciones de pares de bases con otros nucleótidos en el conector. Un experto en el arte apreciará que cualquiera de las modificaciones o variaciones químicas de oligonucleótidos descritas en la presente se pueden usar en el conector oligonucleotídico. En determinadas formas de realización, el conector es dA.

IV. Síntesis, purificación y análisis de los REVERSIR de la invención

La oligomerización de nucleósidos y nucleótidos modificados y no modificados se puede realizar de rutina de acuerdo con los procedimientos de la literatura para ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait y col., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo y col., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713).

Los compuestos oligoméricos provistos en la presente pueden ser elaborados de manera conveniente y de rutina mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipamiento para dicha síntesis es comercializado por varias empresas que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en el arte puede ser empleado de manera adicional o como alternativa. Se conoce el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. La invención no está limita por el método de síntesis del compuesto antisentido.

Los métodos de purificación y análisis de compuestos oligoméricos son

conocidos para los expertos en el arte. Los métodos de análisis incluyen electroforesis capilar (CE) y espectroscopía de masas por electroaspersión. Dichos métodos de síntesis y análisis se pueden realizar en placas de multipocillos. El método de la invención no está limitado por el método de purificación del oligómero.

Los compuestos oligoméricos de la invención se pueden preparar usando síntesis orgánica en fase de solución o en fase sólida, o de manera enzimática mediante métodos conocidos en el arte. La síntesis orgánica ofrece la ventaja de que las hebras oligoméricas que comprenden nucleótidos no naturales o modificados pueden ser preparadas de manera fácil. Cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en el arte se puede emplear de manera adicional o como alternativa. También se conoce el uso de técnicas similares para preparar otros compuestos oligoméricos, tales como aquellos que comprenden fosforotioatos, fosforoditioatos y derivados alquilados de uniones interazúcar. Los compuestos oligoméricos de hebra doble de la invención se puede elaborar usando un procedimiento en dos pasos. Primero, las hebras individuales de la molécula de hebra doble se preparan por separado. Luego, se aparean las hebras componentes.

Independientemente del método de síntesis, los compuestos oligoméricos pueden prepararse en una solución (por ejemplo, una solución acuosa y/u orgánica) que es apropiada para la formulación. Por ejemplo, la preparación oligomérica puede ser precipitada y redisuelta en agua bidestilada pura, y liofilizada. El compuesto oligomérico seco puede ser luego resuspendido en una solución apropiada para el proceso de formulación pretendido.

Las divulgaciones respecto a la síntesis de compuestos oligoméricos modificados particulares se puede encontrar en las siguientes Patentes de los EE.UU. o solicitudes de patente pendientes: Patentes de los EE.UU. Nos. 5.138.045 y 5.218.105, relacionadas con oligonucleótidos conjugados a poliaminas; Patente de los EE.UU. No. 5.212.295, relacionada con monómeros para la preparación de oligonucleótidos que tienen uniones de fósforo quirales; Patentes de los EE.UU. Nos. 5.378.825 y 5.541.307, relacionadas con oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados; Patente de los EE.UU. No. 5.386.023, relacionada con oligonucleótidos con esqueleto modificado y la preparación de los mismos mediante acoplamiento reductor; Patente de los EE.UU. No. 5.457.191, relacionada con nucleobases modificadas en base al sistema de anillo 3-deazapurina y sus métodos de síntesis; Patente de los EE.UU. No. 5.459.255, relacionada con nucleobases modificadas basadas en purinas sustituidas en N-2; Patente de los EE.UU. No. 5.521.302, relacionada con procesos para elaborar oligonucleótidos que tienen uniones de fósforo quirales; Patente de los EE.UU. No. 5.539.082, relacionada con ácidos nucleicos peptídicos; Patente de los EE.UU. No. 5.554.746, relacionada con oligonucleótidos que tienen esqueletos de beta-lactama; Patente de los EE.UU. No. 5.571.902, relacionada con métodos y materiales para la síntesis de oligonucleótidos; Patente de los EE.UU. No. 5.578.718, relacionada con nucleósidos que tienen grupos alquiltio, donde dichos grupos se pueden usar como conectores a otras unidades en cualquiera de una variedad de posiciones del nucleósido; Patentes de los EE.UU. Nos. 5.587.361 y 5.599.797, relacionada con oligonucleótidos que tienen uniones fosforotioato de alta pureza quiral; Patente de los EE.UU. No. 5.506.351, relacionada con procesos

para la preparación de 2'-O-alquilo guanosina y compuestos relacionados, que incluyen compuestos 2,6-diaminopurina; Patente de los EE.UU. No. 5.587.469, relacionada con oligonucleótidos que tienen purinas sustituidas en N-2; Patente de los EE.UU. No. 5.587.470, relacionada con oligonucleótidos que tienen 3-deazapurinas; Patente de los EE.UU. No. 5.223.168, y Patente de los EE.UU. No. 5.608.046, ambas relacionadas con análogos de nucleósido conjugado con 4'-desmetilo; Patentes de los EE.UU. Nos. 5.602.240, y 5.610.289, relacionadas con análogos de oligonucleótidos con esqueleto modificado; y Patentes de los EE.UU. Nos. 6.262.241 y 5.459.255, relacionadas, entre otras cosas, con métodos para la síntesis de 2'-fluoro-oligonucleótidos.

V. Composiciones farmacéuticas de la invención

Los compuestos oligoméricos se pueden mezclar con sustancias activas y/o inerte farmacéuticamente aceptable para la preparación de composiciones farmacéuticas o formulaciones. Las composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de diferentes criterios, que incluyen, a título enunciativo no taxativo, ruta de administración, extensión de la enfermedad, o dosis a administrar.

Los compuestos oligoméricos, que incluyen compuestos REVERSIR, se pueden utilizar en composiciones farmacéuticas por combinación de dichos compuestos oligoméricos con un diluyente o vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina amortiguada con fosfato (PBS). El PBS es un diluyente adecuado para usar en composiciones a administrar por vía parenteral. En consecuencia, en una forma de realización, en los métodos descritos en la presente se emplea una composición farmacéutica que comprende un

compuesto REVERSIR y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos oligoméricos abarcan cualquier sal, éster, o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables. En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos oligoméricos comprenden uno o más oligonucleótidos que, al administrarlos a un animal, incluyendo un humano, tiene la capacidad de proveer (directa o indirectamente) el metabolito o residuo del mismo biológicamente activo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación también se relaciona con sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, a título enunciativo no taxativo, sales de sodio y potasio.

Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto oligomérico que son escindidos por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto oligomérico activo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de diferentes maneras dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (por ejemplo, mediante un parche transdérmico), pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye nebulización; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La

administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; subdérmica, por ejemplo, mediante un dispositivo implantado; o intracraneal, por ejemplo, mediante administración intraparenquimal, intratecal o intraventricular.

Los compuestos oligoméricos se pueden administrar de un modo para dirigirlos a un tejido particular, tal como el hígado (por ejemplo, a los hepatocitos del hígado).

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes farmacéuticos convencionales y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en las cuales los ARNi descritos en la invención se encuentran en una mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas adecuados incluyen neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, distearolifosfatidilcolina), negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA). Los ARNi descritos en la invención pueden estar encapsulados en liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los ARNi pueden estar formando complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres

adecuados incluyen a título enunciativo no taxativo ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodeciloazaciclohéptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de C_{1-20} alquilo (por ejemplo, isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la Patente de los EE.UU. No. 6.747.014, que se incorpora a la presente a modo de referencia.

Existen muchas estructuras de tensioactivos organizadas además de las microemulsiones que han sido estudiadas y utilizadas para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, como los liposomas, han atraído un gran interés debido a su especificidad y la duración de la acción que ofrecen desde el punto de vista de la administración de fármacos. Como se usa en la presente invención, el término "liposoma" se refiere a una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada por un material lipofílico y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición a ser administrada. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de poder fusionarse con la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no pueden fusionarse de manera tan eficaz con la pared celular, son incorporados por los macrófagos *in vivo*.

Otras ventajas de los liposomas incluyen; los liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los

liposomas pueden incorporar una gama amplia de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger los fármacos encapsulados en sus compartimientos internos de la metabolización y degradación (Rosoff, en Pharmaceutic Dosificación Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245). Las consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga superficial de los lípidos, el tamaño de las vesículas y el volumen acuoso de los liposomas.

Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de ingredientes activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposomal es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican a un tejido, los liposomas comienzan a fusionarse con las membranas celulares y a medida que avanza la fusión del liposoma y la célula, los contenidos liposomales se vacían en la célula donde el agente activo puede actuar.

Las formulaciones liposomales han sido objeto de una extensa investigación como modo de administración de muchos fármacos. Existe evidencia creciente de que para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas respecto a otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen la reducción de los efectos secundarios relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, el aumento de la acumulación del fármaco administrado en la diana deseada, y la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, en la piel.

En varios informes se ha detallado la capacidad de los liposomas para

administrar agentes que incluyen ADN de alto peso molecular en la piel. Los compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADN de alto peso molecular han sido administrados en la piel. La mayoría de las aplicaciones resultaron en el direccionamiento a la epidermis superior.

Los liposomas se dividen en dos clases amplias. Los liposomas catiónicos son liposomas con carga positiva que interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. El complejo ADN/liposoma cargado positivamente se une a la superficie celular cargada negativamente y es internalizado en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen, liberando su contenido en el citoplasma de las células (Wang y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o tienen carga negativa, atrapan el ADN en lugar de formar complejos con el mismo. Dado que el ADN así como el lípido tienen cargas similares, se produce una repulsión en lugar de formación de complejos. Sin embargo, parte del ADN queda atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Se han utilizado liposomas sensibles al pH para administrar ADN que codifica para el gen de la timidina quinasa a monocapas de células en cultivo. Se detectó la expresión del gen exógeno en las células diana (Zhou y col., Journal de Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Un tipo principal de composición liposomal incluye fosfolípidos diferentes de fosfatidilcolina derivada de origen natural. Se pueden formar composiciones de liposomas neutros, por ejemplo, a partir de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos

en general se forman a partir de dimiristoilfosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición de liposomas se forma a partir de fosfatidilcolina (PC), como por ejemplo, PC de soja y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípidos y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

En varios estudios se ha evalua la administración tópica de formulaciones de fármacos liposomales a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferón en la piel de conejillos de Indias produjo una reducción de las lesiones cutáneas por herpes mientras que la administración de interferón a través de otros medios (por ejemplo, como una solución o como una emulsión) resultó ineficaz (Weiner y col., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410). Además, en un estudio adicional se ensayó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposomal contra la administración de interferón utilizando un sistema acuoso, y concluyó que la formulación liposomal fue superior a la administración acuosa (du Plessis y col., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265).

Los sistemas de liposomas no iónicos también han sido examinados para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones de liposomas no iónicos que comprenden Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/éter de estearilo de polioxietileno-10) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/éter de estearilo de polioxietileno-10) para administrar ciclosporina-A en la dermis de la piel de ratones. Los resultados indicaron que dichos sistemas de liposomas no iónicos

fueron eficaces para facilitar la deposición de ciclosporina-A en diferentes capas de la piel (Hu y col. S.T.P.Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466).

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, tal como se usa en la presente, se refiere a liposomas que comprende uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, resulta en tiempos de vida de circulación aumentados en relación a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los cuales parte de la porción lipídica que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, tal como monosialoganglióside G_{M1}, o (B) está derivatizado con uno o más polímeros hidrofílicos, tal como una unidad de polietilenglicol (PEG). Sin desear de estar limitado por ninguna teoría en particular, en el arte se cree que, por lo menos para los liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomielina, o lípidos derivatizados con PEG, la vida media de circulación aumentada de estos liposomas estéricamente estabilizados deriva de una captación reducida a las células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen y col., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu y col., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

En el arte se conocen diferentes liposomas que comprenden uno o más glicolípidos. Papahadjopoulos y col. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) informaron la capacidad de monosialoganglióside G_{M1}, sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las vidas medias en sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron presentados por Gabizon y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). La Patente de los EE.UU. No. 4.837.028 y WO 88/04924, ambas de Allen y col., describen liposomas que

comprenden (1) esfingomielina y (2) el ganglósido G_{M1} o un éster de sulfato de galactocerebrósido. En la Patente de los EE.UU. No. 5.543.152 (Webb y col.) se describen liposomas que comprenden esfingomielina. Los liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se describen en WO 97/13499 (Lim y col).

Muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrofílicos, y métodos de preparación de los mismos, son conocidos en el arte. En Sunamoto y col. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) se describen liposomas que comprenden un detergente no iónico, $2C_{1215G}$, que contiene una unidad PEG. En Illum y col. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) se indica que el recubrimiento hidrofílico de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos genera vidas medias en sangre significativamente aumentadas. Los fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) son descritos por Sears (Patentes de los EE.UU. Nos. 4.426.330 y 4.534.899). En Klibanov y col. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) se describen experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato de PEG tienen un aumento significativo de las vidas medias de circulación en sangre. En Blume y col. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) se extendieron dichas observaciones a otros fosfolípidos derivatizados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formados por la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen unidades PEG unidas de manera covalente en su superficie externa se describen en La Patente Europea No. EP 0 445 131 B1 y WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen entre 1 y 20 por ciento

de moles de PE derivatizada con PEG, y métodos de uso de los mismas, se describen en Woodle y col. (Patentes de los EE.UU. Nos. 5.013.556 y 5.356.633) y Martin y col. (Patente de los EE.UU. No. 5.213.804 y Patente Europea No. EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden un número de otros conjugados de lípido-polímero se describen en WO 91/05545 y en la Patente de los EE.UU. No. 5.225.212 (ambas de Martin y col.) y en WO 94/20073 (Zalipsky y col.). Los liposomas que comprenden lípidos ceramida modificados con PEG se describen en WO 96/10391 (Choi y col). La Patente de los EE.UU. No. 5.540.935 (Miyazaki y col.) y la Patente de los EE.UU. No. 5.556.948 (Tagawa y col.) se describen liposomas que contienen PEG que pueden ser derivatizados adicionalmente con unidades funcionales en sus superficies.

En el arte se conocen varios liposomas que comprenden ácidos nucleicos. En WO 96/40062 de Thierry y col. se describen métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. En la Patente de los EE.UU. No. 5.264.221 de Tagawa y col. se describen liposomas unidos a proteínas y afirma que los contenidos de dichos liposomas pueden incluir un ARNhd. En la Patente de los EE.UU. No. 5.665.710 de Rahman y col. se describen ciertos métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. En WO 97/04787 de Love y col. se describen liposomas que comprenden ARNhd dirigidos contra el gen raf.

Los transferosomas son otro tipo de liposomas, y son agregados lipídicos muy deformables que son candidatos atractivos para vehículos para la provisión de fármacos. Los transferosomas pueden describirse como gotas lipídicas que son tan altamente deformables que pueden penetrar fácilmente a

través de poros que son más pequeños que la gota. Los transferosomas son adaptables al ambiente en el que se utilizan, por ejemplo, son autooptimizantes (se adaptan a la forma de los poros en la piel), autorreparadores, con frecuencia alcanzan sus dianas sin fragmentarse, y con frecuencia se autocargan. Para elaborar transferosomas, es posible agregar activadores de borde de superficie, en general tensioactivos, a una composición de liposomas estándar. Se han utilizado transferosomas para administrar albúmina sérica a la piel. Se ha demostrado que la administración de albúmina sérica mediada por transferosomas es tan eficaz como la inyección subcutánea de una solución que contiene albúmina sérica.

Las composiciones de liposomas se pueden preparar mediante una variedad de métodos que son conocidos en el arte. Véanse por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.235.871; 4.737.323; 4.897.355 y 5.171.678; Solicitudes Internaciones Publicadas WO 96/14057 y WO 96/37194; Felgner, P. L. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA (1987) 8:7413-7417, Bangham, y col. *M. Mol. Biol.* (1965) 23:238, Olson, y col. *Biochim. Biophys. Acta* (1979) 557:9, Szoka, y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1978) 75: 4194, Mayhew, y col. *Biochim. Biophys. Acta* (1984) 775:169, Kim, y col. *Biochim. Biophys. Acta* (1983) 728:339, y Fukunaga, y col. *Endocrinol*. (1984) 115:757.

Los tensioactivos tienen una amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (que incluyen microemulsiones) y liposomas. La manera más habitual de clasificar y calificar las propiedades de los muchos diferentes tipos de tensioactivos, naturales y sintéticos, es mediante el uso del balance hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrofílico (también conocido como la "cabeza") provee los medios más útiles para categorizar los diferentes

tensioactivos usados en las formulaciones (Rieger, en Pharmaceutical Dosificación Forms, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, p. 285).

Si la molécula de tensioacivo no es ionizada, se clasifica como un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos tienen una amplia aplicación en los productos farmacéuticos y cosméticos y se pueden usar en un rango amplio de valores de pH. En general sus valores de HLB varían en un rango entre 2 y aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarosa, y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas y éteres no iónicos tales como los ácidos grasos etoxilados, alcoholes propoxilados, y polímeros en bloque etoxilados/propoxilados también se incluyen en esta clase. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo porta una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, lactilatos de acilo, amidas de acilo de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos tales como bencenosulfonatos de alquilo, isetionatos de acilo, tauratos de acilo y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los sulfatos de alquilo y los jabones.

Si la molécula de tensioactivo porta una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como catiónico. Los tensioactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas

etoxiladas. Las sales de amonio cuaternario son los miembros más usados de esta clase.

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad de portar una carga positiva o negativa, el tensioactivo se clasifica como anfotérico. Los tensioactivos anfotéricos incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.

El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones ha sido revisado (Rieger, en Pharmaceutical Formas de dosificación, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, p. 285).

A. Partículas de lípidos

En algunas formas de realización, el REVERSIR puede estar completamente encapsulado en una formulación de lípidos, por ejemplo, una LNP, u otra partícula de ácido nucleico-lípido. El REVERSIR encapsulado en la formulación lipídica puede estar sin conjugar o conjugado con un ligando (es decir, un REVERSIR conjugado).

Tal como se usa en la presente, el término "LNP" se refiere a una partícula estable de ácido nucleico-lípido. Las LNP contienen un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un lípido que previene la agregación de la partícula (por ejemplo, un conjugado de PEG-lípido). Las LNP son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que exhiben tiempos de vida en circulación prolongados luego de la inyección intravenosa (i.v.) y se acumulan en sitios distales (por ejemplo, sitios físicamente separados del sitio de administración). Las LNP incluyen "pSPLP," que incluyen un complejo de agente de condensación-ácido nucleico encapsulado como se describe en la Publicación PCT No. WO 00/03683. Las partículas de la presente invención

típicamente tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 150 nm, más típicamente entre aproximadamente 60 nm y aproximadamente 130 nm, más típicamente entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 110 nm, más típicamente entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 90 nm, y son sustancialmente no tóxicos. Además, los ácidos nucleicos cuando están presentes en las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se describen en, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; Publicación de los EE.UU. No. 2010/0324120 y Publicación PCT No. WO 96/40964.

En algunas formas de realización, la relación de lípido a fármaco (relación de masa/masa) (por ejemplo, relación lípido a REVERSIR) se encontrará en el rango de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 50:1, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 25:1, entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 15:1, entre aproximadamente 4:1 y aproximadamente 10:1, entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 9:1, o aproximadamente 6:1 y aproximadamente 9:1. Los rangos intermedios de los rangos indicados precedentemente también se contemplan como parte de la invención.

El lípido catiónico puede ser, por ejemplo, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(I-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(I-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-

dioleiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-DiLinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-Dilinoleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleioxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleioxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-Dilinoleiltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-Linoleoil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal cloruro de 1,2-Dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal cloruro de 1,2-Dilinoleoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), o 3-(N,N-Dilinoleilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-Dilinoleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) o análogos del mismo, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo 4-(dimetilamino)butanoato (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecilo)amino)etil)(2-hidroxidodecilo)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanediil)didodecan-2-ol, o una mezcla de los mismos. El lípido catiónico puede comprender entre aproximadamente 20 % en moles y aproximadamente 50 % en moles o aproximadamente 40 % en moles de los lípidos totales presentes en la partícula.

En algunas formas de realización, el compuesto 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano se puede usar para preparar nanopartículas de lípido-REVERSIR. La síntesis de 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano

se describe en la Solicitud Internacional no. PCT/US2009/061897, publicada como WO/2010/048536, que se incorpora a la presente a modo de referencia.

En algunas formas de realización, la partícula de lípido-REVERSIR incluye 40% de 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano: 10% de DSPC: 40% de Colesterol: 10% de PEG-C-DOMG (porcentaje en moles) con un tamaño de partícula de 63,0 ± 20 nm y una relación de REVERSIR/lípido de 0,027.

El lípido ionizable/no catiónico puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro que incluye, a título enunciativo no taxativo, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), dioleoil-fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1 -trans PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), colesterol, o una mezcla de los mismos. El lípido no catiónico puede ser entre aproximadamente 5 % en moles y aproximadamente 90 % en moles, aproximadamente 10 % en moles, o aproximadamente 58 % en moles si hay colesterol incluido, del total de lípido presente en la partícula.

El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede ser, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG)-lípido que incluye, sin limitación, un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquiloxipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer), o una mezcla de los mismos. El conjugado PEG-DAA

puede ser, por ejemplo, un PEG-dilauriloxipropilo (C_{12}), un PEG-dimiristiloxipropilo (C_{14}), un PEG-dipalmitiloxipropilo (C_{16}), o un PEG-diestearoiloxipropilo (C_{18}). El lípido conjugado que previene la agregación de partículas puede ser entre 0 % en moles y aproximadamente 20 % en moles o aproximadamente 2 % en moles del total de lípidos presentes en la partícula.

En algunas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido además incluye colesterol en, por ejemplo, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 60 % en moles o aproximadamente 48 % en moles del total de lípidos presentes en la partícula.

Las formulaciones de lípido-REVERSIR ejemplificativas adicionales se describen en la Tabla a continuación.

Formulaciones de REVERSIR lipídicas ejemplificativas

Formulación	Lípido Ionizable/Catiónico	Conjugado de lípido catiónico/lípido no catiónico/colesterol/PEG-lípido Relación lípido:REVERSIR
LNP_DLinDMA	1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) lípido:REVERSIR ~ 7:1
2-XTC	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 lípido:REVERSIR ~ 7:1
LNP05	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lípido:REVERSIR ~ 6:1

LNP06	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lípido:REVERSIR ~ 11:1
LNP07	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lípido:REVERSIR ~ 6:1
LNP08	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lípido:REVERSIR ~ 11:1
LNP09	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR 10:1
LNP11	4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3)	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecilo)amino)etil)(2-hidroxidodecilo)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanediil)didodecan-2-ol (C12-	Tech G1/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR 10:1

	200>	
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 40/15/40/5 Lípido:REVERSIR: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Lípido:REVERSIR: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/35/5 Lípido:REVERSIR: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5

		Lípido:REVERSIR: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR: 10:1
LNPX	(13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina	(13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonyldocosa-13,16-dien-1-amina /DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR: 10:1
LNPY	Lípido biodegradable	Lípido biodegradable/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:REVERSIR: 10:1

*El REVERSIR puede estar no conjugado o conjugado con un ligando (es decir, REVERSIR conjugado).

Las abreviaturas en la Tabla precedente incluyen las siguientes: DSPC: diestearoilfosfatidilcolina; DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina; PEG-DMG: PEG-dimiristoilglicerol (C14-PEG, o PEG-C14) (PEG con peso molecular promedio de 2000); PEG-DSG: PEG-diestirilglicerol (C18-PEG, o PEG-C18) (PEG con peso molecular promedio de 2000); PEG-cDMA: PEG-carbamoil-1,2-dimiristiloxipropilamina (PEG con peso molecular promedio de 2000).

Las formulaciones que comprenden DLinDMA (1,2-Dilinoleniloxi-N,N-

dimetilaminopropano) se describen en la Publicación Internacional No. WO2009/127060, presentada el 15 de abril de 2009, que se incorpora a la presente a modo de referencia.

Las formulaciones que comprenden XTC se describen, por ejemplo, en el Acta Provisional de los EE.UU. No. 61/148.366, presentada el 29 de enero de 2009; Acta Provisional de los EE.UU. No. 61/156.851, presentada el 2 de marzo de 2009; Acta Provisional de los EE.UU. No. presentada el 10 de junio de 2009; Acta Provisional de los EE.UU. No. 61/228.373, presentada el 24 de julio de 2009; Acta Provisional de los EE.UU. No. 61/239.686, presentada el 3 de septiembre de 2009, y la Solicitud Internacional No. PCT/US2010/022614, presentada el 29 de enero de 2010, que se incorpora a la presente a modo de referencia.

Las formulaciones que comprenden MC3 se describen, por ejemplo, en la Publicación de los EE.UU. No. 2010/0324120, presentada el 10 de junio de 2010, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

Las formulaciones que comprenden lípidos biodegradables se describen en, por ejemplo, las Publicaciones PCT No. WO2011/153493, presentada el 03 de junio de 2011 y WO/2013/086354, presentada el 7 de diciembre de 2012, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

Las formulaciones que comprenden (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina se describen, por ejemplo, en las Publicaciones PCT No. WO/2012/040184, presentada el 20 de septiembre de 2011, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de

referencia.

Los compuestos oligoméricos de la invención se pueden elaborar y formular como micelas. Tal como se usa en la presente, “micelas” son un tipo particular de ensamblaje molecular en el cual las moléculas anfipáticas se disponen en una estructura esférica de manera tal que todas porciones hidrofóbicas en las moléculas están dirigidas hacia adentro, dejando las porciones hidrofílicas en contacto con la fase acuosa circundante. La disposición invertida existe si el ambiente es hidrofóbico.

En algunas formas de realización, las formulaciones comprenden micelas formadas a partir de un oligonucleótido de la invención y por lo menos un vehículo anfifílico, en el cual las micelas tienen un diámetro promedio menor que aproximadamente 100 nm, preferiblemente. Las formas de realización más preferidas proveen micelas que tienen un diámetro promedio menor que aproximadamente 50 nm, e las formas de realización incluso más preferidas proveen micelas que tienen un diámetro promedio menor que aproximadamente 30 nm, o incluso menor que aproximadamente 20 nm.

Las formulaciones de micelas se pueden preparar por mezclado de una solución acuosa de la composición del oligonucleótido, un metal alcalino entre C_8 y C_{22} alquilsulfato, y un vehículo anfifílico. El vehículo anfifílico puede ser agregado al mismo tiempo o después del agregado del alquilsulfato de metal alcalino. Las micelas se formarán sustancialmente con cualquier tipo de mezclado de los ingredientes pero con mezclado vigoroso con el objetivo de proveer micelas de tamaño más pequeño.

Los compuestos oligoméricos de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Tal como se usa en la presente,

“emulsión” es un sistema heterogéneo de un líquido dispersado en otro en la forma de gotas.

Las emulsiones con frecuencia son sistemas bifásicos que comprenden dos fases de líquidos inmiscibles mezcladas de manera íntima y dispersadas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad de agua en aceite (w/o) o de aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa se divide finamente en y se dispersa como gotas diminutas en una fase oleosa completa, la composición resultante se denomina emulsión de agua en aceite (w/o). Como alternativa, cuando una fase oleosa se divide finamente en y se dispersa como gotas diminutas en una fase acuosa completa, la composición resultante se denomina emulsión de aceite en agua (o/w). las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en la fase acuosa, fase oleosa o el mismo como una fase separada. Los excipientes farmacéuticos tales como emulsificantes, estabilizantes, indicadores, y antioxidantes también pueden estar presentes en emulsiones según se requiera. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que están comprendidas por más de dos fases como, por ejemplo, en el caso de las emulsiones de aceite en agua en aceite (o/w/o) y agua en aceite en agua (w/o/w). Dichas formulaciones de complejos con frecuencia proveen ciertas ventajas que las emulsiones binarias simples no tienen. Las emulsiones múltiples en las cuales las gotas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran gotas de agua pequeñas constituye una emulsión w/o/w. De la misma manera un sistema de gotas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua oleosa provee una emulsión o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por una estabilidad termodinámica baja o ausente. Con frecuencia, la fase dispersada o discontinua de la emulsión está bien dispersada en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma debido a los emulsificantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser semisólida o sólida, como es el caso de las bases y cremas de ungüentos del tipo de emulsión. Otros medios para estabilizar las emulsiones abarca el uso de emulsificantes que pueden incorporarse en cualquiera de las fases de la emulsión. Los emulsificantes pueden clasificarse de manera amplia en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsificantes de origen natural, bases de absorción, y sólidos finamente dispersados (Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes tensioactivos, han encontrado una gran aplicabilidad en la formulación de emulsiones y han sido revisados en la literatura (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 285; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los tensioactivos típicamente son anfifílicos y comprenden una porción hidrofílicas y una hidrofóbica. La relación de la naturaleza hidrofílica a hidrofóbica del tensioactivo ha sido denominada el balance hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa para la categorización y selección de los tensioactivos en la preparación de las formulaciones. Los tensioactivos pueden clasificarse en diferentes clases en

base a la naturaleza del grupo hidrofílico: no iónico, aniónico, catiónico y anfotérico (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 285).

Los emulsificantes de origen natural usados en las formulaciones de emulsión incluyen lanolina, cera de abeja, fosfátidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrofílicas de manera tal que pueden absorber agua para formar emulsiones w/o a la vez que retienen sus consistencias semisólidas, tal como lanolina anhidra y vaselina hidrofílica. Los sólidos finamente divididos también se han usado como buenos emulsificantes especialmente combinados con tensioactivos y en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas no expansivas tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolina, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de magnesio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbono o triestearato de glicerilo.

En las formulaciones de emulsiones se incluye también una gran variedad de materiales no emulsificantes y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrofílicos, conservantes y antioxidantes (Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 335; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los coloides hidrofílicos o hidrocoloides incluyen gomas de origen

natural y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido algínico, carragenano, goma guar, goma karaya, y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa, y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o se hinchan en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando películas interfaciales fuertes alrededor de las gotas de la fase dispersada e incrementando la viscosidad de la fase externa.

Debido a que las emulsiones con frecuencia contienen varios ingredientes tales como hidratos de carbono, proteínas, esteroles y fosfátidos que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones con frecuencia incorporan conservantes. Los conservantes comúnmente usados que se incluyen en las formulaciones en emulsión incluyen metil parabeno, propil parabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, esteres de ácido p-hidroxibenzoico, y ácido bórico. También se agregan comúnmente antioxidantes a las formulaciones en emulsión para evitar el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser secuestradores de radicales libres tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, o agentes reductores como el ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y sinergistas antioxidantes como el ácido cítrico, el ácido tartárico y la lecitina.

En algunas formas de realización, las composiciones se formulan como microemulsiones. Tal como se usa en la presente, “microemulsión” se refiere a un sistema de agua, aceite y anfifilo que es una solución líquida ópticamente simple, isotrópica y termodinámicamente estable. Las microemulsiones también

incluyen dispersiones de dos líquidos inmiscibles termodinámicamente estables e isotrópicamente transparentes que se estabilizan mediante películas interfaciales de superficialmente tensioactivas.

Una microemulsión puede definirse como un sistema de agua, aceite y anfifilo que es una única solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245). Típicamente las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una solución tensioactiva acuosa y luego agregando una cantidad suficiente de un cuarto componente, en general un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas de tensioactivo (Leung y Shah, en: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones comúnmente se preparan mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, cotensioactivo y electrolito. El tipo de microemulsión de agua en aceite (w/o) o de aceite en agua (o/w) depende de las propiedades del aceite y tensioactivo utilizado así como de la estructura y empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y las colas de los hidrocarburos de las moléculas de tensioactivo (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fases ha sido

ampliamente estudiado y ha dado lugar a un conocimiento exhaustivo, para un experto en el arte, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245; Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 335). En comparación con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los tensioactivos utilizados en la preparación de las microemulsiones incluyen, a título enunciativo no taxativo, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, éteres de polioxietilenoleilo, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, tetraglicerol monolaurato (ML310), tetraglicerol monooleato (MO310), hexaglicerol monooleato (PO310), hexaglicerol pentaoleato (PO500), decaglicerol monocaprato (MCA750), decaglicerol monooleato (MO750), decaglicerol sequioleato (SO750), decaglicerol decaoleato (DAO750), solos o en combinación con cotensioactivos. El cotensioactivo, generalmente un alcohol de cadena corta como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial al penetrar en la película tensioactiva y, en consecuencia, crear una película alterada debido al espacio vacío que se genera entre las moléculas de tensioactivo. Las microemulsiones pueden, sin embargo, prepararse sin el uso de cotensioactivos y se conocen en el arte sistemas de microemulsiones autoemulsionantes sin alcohol. La fase acuosa puede ser, a título enunciativo no taxativo, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles y derivados

de etilenglicol. La fase oleosa puede incluir, a título enunciativo no taxativo, materiales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di, y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos poliglicolizados C8-C10 saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente de interés desde el punto de vista de la solubilización de fármacos y la mejora de la absorción de fármacos. Se han propuesto microemulsiones basadas en lípidos (tanto o/w como w/o) para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides y col., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones ofrecen ventajas de mejora de la solubilización del fármaco, protección del fármaco frente a la hidrólisis enzimática, posible mejora de la absorción del fármaco debido a alteraciones inducidas por tensioactivos en la fluidez y permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral por sobre las formas sólidas de dosificación, mejora de la potencia clínica, y disminución de la toxicidad (Constantinides y col., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho y col., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Muchas veces las microemulsiones pueden formarse espontáneamente cuando sus componentes se juntan a temperatura ambiente. Esto puede resultar especialmente ventajoso a la hora de formular fármacos termolábiles, péptidos o ARNhd. Las microemulsiones también han resultado eficaces en la administración transdérmica de componentes activos tanto en aplicaciones cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las

composiciones y las formulaciones en microemulsión de la presente invención faciliten la mayor absorción sistémica de los ARNhd y los ácidos nucleicos del tracto gastrointestinal y que mejoren la captación celular local de los ARNhd y los ácidos nucleicos.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitano (Grill 3), Labrasol, y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y mejorar la absorción de los ARNhd y los ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración utilizados en las microemulsiones de la presente invención se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco amplias categorías: tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Cada una de estas clases ha sido discutida anteriormente.

La aplicación de formulaciones en emulsión por rutas dermatológica, oral y parenteral y los métodos para su elaboración se han revisado en la literatura, por ejemplo véase Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245; y Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 335, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Los compuestos oligoméricos de la presente invención se pueden preparar y formular como partículas lipídicas, por ejemplo, partículas lipídicas

formuladas (FLiP) que comprenden (a) un oligonucleótido de la invención, donde dicho oligonucleótido se ha conjugado a un lipófilo y (b) por lo menos un componente lipídico, por ejemplo una emulsión, liposoma, lipoproteína aislada, lipoproteína reconstituida o fosfolípido, al que se ha agregado, mezclado o asociado el oligonucleótido conjugado. La estequiometría de oligonucleótido al componente lipídico puede ser 1:1. Como alternativa la estequiometría puede ser 1:mucho, mucho:1 o mucho: mucho, donde mucho es dos o más.

Las FLiP pueden comprender triacilgliceroles, fosfolípidos, glicerol y una o varias proteínas fijadoras de lípidos agregadas, mezcladas o asociadas mediante una molécula de conector lipofílico con un oligonucleótido. Sorprendentemente, se ha encontrado que debido a dicha una o varias proteínas fijadoras de lípidos en combinación con los lípidos mencionados anteriormente, las FLiP muestran afinidad con el hígado, intestino, riñón, órganos esteroidogénicos, corazón, pulmón y/o tejido muscular. Estas FLiP por lo tanto pueden servir como vehículo para los oligonucleótidos hacia estos tejidos. Por ejemplo, los oligonucleótidos conjugados con lípidos, por ejemplo, los oligonucleótidos conjugados con colesterol se unen a las partículas lipoproteicas de HDL y LDL que mediante la captación celular ante la unión a sus respectivos receptores dirigiendo así la administración del oligonucleótido al hígado, intestino, riñón y órganos esteroidogénicos, véase Wolfrum y col. Nature Biotech. (2007), 25:1145-1157.

La FLiP puede ser una partícula lipídica que comprende entre 15 y 25% de triacilglicerol, aproximadamente entre 0,5 y 2% de fosfolípidos y entre 1 y 3 % de glicerol, y una o varias proteínas de unión a lípidos. Las FLiP pueden ser una partícula lipídica que tiene entre aproximadamente 15 y 25% de

triacilglicerol, aproximadamente entre 1 y 2% de fosfolípidos, aproximadamente entre 2 y 3 % de glicerol, y una o varias proteínas de unión a lípidos. En algunas formas de realización, la partícula lipídica comprende aproximadamente 20% de triacilglicerol, aproximadamente 1,2% de fosfolípidos y aproximadamente 2,25% de glicerol, y una o varias proteínas de unión a lípidos.

Otro componente lipídico adecuado para las FLiP son las lipoproteínas, por ejemplo lipoproteínas aisladas o más preferiblemente lipoproteínas reconstituidas. Las lipoproteínas ejemplificativas incluyen quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), LDL (lipoproteínas de baja densidad) y HDL (lipoproteínas de alta densidad). Se conocen en el arte métodos de producción de lipoproteínas reconstituidas, por ejemplo véase A. Jones, Experimental Lung Res. 6, 255-270 (1984), Patentes de los EE.UU. Nos. 4.643.988 y 5128318, Publicación PCT WO87/02062, Pat. Canadiense No. 2.138.925. Otros métodos para producir lipoproteínas reconstituidas, especialmente para las apolipoproteínas A-I, A-II, A-IV, apoC y apoE se han descrito en A. Jonas, Methods in Enzymology 128, 553-582 (1986) y G. Franceschini y col. J. Biol. Chem., 260(30), 16321-25 (1985).

Un componente lipídico preferido para las FLiP es Intralipid. Intralipid® es la marca de la primera emulsión grasa segura para uso humano. Intralipid® 20% (una emulsión grasa intravenosa al 20%) está compuesta por 20% de aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,25% de glicerina y agua para inyección. Está además dentro de la presente invención que otros aceites adecuados, tales como el aceite de cártamo, puedan servir para

producir el componente lipídico de las FLiP.

La FLiP puede estar en el rango de tamaño entre aproximadamente 20 y 50 nm o entre aproximadamente 30 y 50 nm, por ejemplo, aproximadamente 35 nm o aproximadamente 40 nm. En algunas formas de realización, la FLiP tiene un tamaño de partícula entre por lo menos aproximadamente 100 nm. Las FLiP como alternativa pueden ser de entre aproximadamente 100 y 150 nm, por ejemplo, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 130 nm, o aproximadamente 140 nm, caracterizadas como en base a liposoma o a emulsión. Se pueden agregar y administrar juntas múltiples FLiP, por lo tanto el tamaño puede ser mayor a 100 nm.

El proceso para elaborar las partículas lipídicas comprende los pasos de: (a) mezclar un componente lipídico con uno o varios oligonucleótidos conjugados lipófilos (por ejemplo colesterol) que pueden modificarse químicamente; y (b) fraccionar esta mezcla. En algunas formas de realización, el proceso comprende el paso adicional de seleccionar la fracción con tamaño de partícula de entre 30 y 50 nm, preferiblemente de aproximadamente 40 nm de tamaño.

Algunos ejemplos de formulaciones de partículas lipídicas compatibles con la invención se describen en la Solicitud de Patente de los EE.UU. No.12/412.206, presentada el 26 de marzo de 2009, cuyo contenido se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

En algunas formas de realización, los compuestos oligoméricos se pueden formular en partículas de pared celular de levaduras (“YCWP”). Una partícula de pared celular de levaduras comprende un exterior de la pared celular de levaduras extraído y un núcleo, donde el núcleo comprende una

carga (por ejemplo, oligonucleótidos). El exterior de la partícula comprende glucanos de levaduras (por ejemplo betaglucanos, beta-1,3-glucanos, beta-1,6-glucanos), mananos de levaduras, o combinaciones de los mismos. Las partículas de la pared celular de levaduras típicamente son partículas esféricas de aproximadamente entre 1 y 4 µm de diámetro.

La preparación de las partículas de la pared celular de levaduras es conocida en el arte, y se describe, por ejemplo en las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.992.540; 5.082.936; 5.028.703; 5.032.401; 5.322.841; 5.401.727; 5.504.079; 5.607.677; 5.741.495; 5.830.463; 5.968.811; 6.444.448; y 6.476.003, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nos. 2003/0216346 y 2004/0014715, y en la Publicación de Patente Internacional No. WO 2002/12348, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad. Las aplicaciones de las partículas de la pared celular de levaduras para la administración de fármacos se describen, por ejemplo en las Patentes de los EE.UU. No. 5.032.401; 5.607.677; 5.741.495; y 5.830.463, y en las Publicaciones de Patente de los EE.UU. Nos. 2005/0281781 y 2008/0044438, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad. En la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 2009/0226528, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia, se describe la formulación de ácidos nucleicos con partículas de la pared celular de levaduras para la administración de oligonucleótidos a las células.

Las formulaciones ejemplificativas de compuestos oligoméricos se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.897.355; 4.394.448; 4.235.871; 4.231.877; 4.224.179; 4.753.788; 4.673.567; 4.247.411; 4.814.270; 5.567.434;

5.552.157; 5.565.213; 5.738.868; 5.795.587; 5.922.859; 6.077.663; 7.906.484 y 8.642.076; en la Publicación PCT No. WO2009/132131 y en las Publicaciones de Patente de los EE.UU. Nos. 2006/0240093, 2007/0135372, 2011/0117125, 2009/0291131, 2012/0316220, 2009/0163705 y 2013/0129785, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad. En Behr (1994) Bioconjugate Chem. 5:382-389, y Lewis y col. (1996) PNAS 93:3176-3181), también se describen formulaciones para oligonucleótidos que son posibles para la invención, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

VI. ARNhd dirigidos por REVERSIR

La presente invención provee REVERSIR™ que inhiben la actividad de agentes de ARNhd que comprenden una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido.

En formas de realización particulares, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante se selecciona del grupo que consiste en una modificación abásica; una falta de complementariedad con el nucleótido opuesto en el dúplex; una modificación de azúcar desestabilizante, una modificación con 2'-desoxilo, un nucleótido acíclico, un ácido nucleico no bloqueado (UNA), y un ácido nucleico glicólico (GNA).

En algunas formas de realización, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante es una modificación abásica. En algunas formas de realización, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante es una falta de complementariedad con el nucleótido opuesto en el dúplex. En algunas formas de realización, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante es una modificación de azúcar desestabilizante.

En algunas formas de realización, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante es una modificación con 2’-desoxilo. En algunas formas de realización, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante es un nucleótido acíclico. En algunas formas de realización, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante es un ácido nucleico no bloqueado (UNA). En algunas formas de realización, la modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante es un ácido nucleico glicólico (GNA).

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cinco, o por lo menos diez modificaciones nucleotídicas térmicamente desestabilizantes descritas en la presente.

Tal como se describe precedentemente, el término “ARNhd” se refiere a un agente que media la escisión dirigida de un transcripto de ARN. Estos agentes se asocian con un complejo multiproteico citoplasmático conocido como complejo de silenciamiento inducido por iARN (RISC). Los agentes que son eficaces para inducir la interferencia por ARN también se conocen como ARNip, agente de iARN, o agente de ARNi, o agentes de ARNhd en la presente.

Tal como se usan en la presente, los términos “la actividad de ARNhd”, “actividad de ARNip”, y “actividad de iARN” se refieren al silenciamiento génico o interferencia por ARNi mediante un agente de ARNhd.

Tal como se usa en la presente, "silenciamiento génico" mediante una molécula de interferencia de ARN se refiere a una disminución en el nivel de ARNm en una célula para un gen diana de por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente

20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 99% hasta, e incluyendo, 100%, y cualquier número entero entre intermedio del nivel de ARNm encontrado en la célula sin la presencia del miARN o molécula de interferencia de ARN. En una forma de realización preferida, los niveles de ARNm disminuyen en por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 99%, hasta, e incluyendo, 100% y cualquier entre 5% y 100%.

Tal como se usa en la presente el término “modular la expresión génica” se refiere a que la expresión del gen, o el nivel de la molécula de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican para una o más proteínas o subunidades de proteínas se encuentra aumentado o disminuido, de manera tal que la expresión, el nivel o la actividad es mayor o menor que lo observado en ausencia del modulador. Por ejemplo, el término “modular” puede referirse a “inhibir”, pero el uso de la palabra “modular” no se limita a esta definición.

Tal como se usa en la presente, la modulación de la expresión génica se produce cuando la expresión del gen, o nivel de la molécula de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican para una o más proteínas o subunidades de proteínas es por lo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más diferente de lo observado en ausencia del ARNhd, por ejemplo, agente de

ARNi. El % y/o la diferencia en veces se puede calcular en relación con el control o el no control, por ejemplo,

$$\% \text{ de diferencia} = \frac{[\text{expresión con ARNhd} - \text{expresión sin ARNhd}]}{\text{expresión sin ARNhd}}$$

Tal como se usa en la presente, el término “inhibir”, “disminuir la expresión”, o “reducir” en relación con la expresión génica, se refiere a que la expresión del gen, o nivel de las moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican para una o más proteínas o subunidades de proteínas, o actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, está reducida por debajo de lo observado en ausencia del modulador. La expresión génica está disminuida cuando la expresión del gen, o el nivel de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican para una o más proteínas o subunidades de proteínas, o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, está reducida por lo menos 10% menos en relación con un control no modulado correspondiente, y preferiblemente por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o más preferiblemente, 100% (es decir, sin expresión génica).

Tal como se usa en la presente, el término “aumentar” o “sobreexpresar” en relación con la expresión génica, se refiere a que la expresión del gen, o el nivel de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican para una o más proteínas o subunidades de proteínas, o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, está aumentada por encima de lo observado en ausencia del modulador. La expresión génica está sobreexpresada cuando la expresión del gen, o el nivel

de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican para una o más proteínas o subunidades de proteínas, o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, está aumentada por lo menos 10% en relación a un control no modulado correspondiente, y preferiblemente por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 100%, 1,1 veces, 1,25 veces, 1,5 veces, 1,75 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o más.

El término "aumentado" o "aumentar" tal como se usa en la presente en general se refiere a un aumento en una cantidad estadísticamente significativa; para evitar cualquier duda, "aumentado" se refiere a un aumento de por lo menos 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo un aumento de por lo menos aproximadamente 20%, o por lo menos aproximadamente 30%, o por lo menos aproximadamente 40%, o por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, o por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90% o hasta, e incluyendo, un 100% de aumento o cualquier aumento entre 10 y 100% en comparación con un nivel de referencia, o un aumento de por lo menos aproximadamente 2 veces, o por lo menos aproximadamente de 3 veces, o por lo menos aproximadamente de 4 veces, o por lo menos aproximadamente de 5 veces o por lo menos aproximadamente de 10 veces, o cualquier aumento entre 2 veces y 10 veces o mayor en comparación con un nivel de referencia.

El término "reducido" o "reducir" tal como se usa en la presente en general se refiere a una disminución en una cantidad estadísticamente significativa. Sin embargo, para evitar cualquier duda, "reducido" se refiere a

una disminución de por lo menos 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo una disminución de por lo menos aproximadamente 20%, o por lo menos aproximadamente 30%, o por lo menos aproximadamente 40%, o por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, o por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90% o hasta, e incluyendo, una disminución del 100% (es decir nivel ausente en comparación con una muestra de referencia), o cualquier disminución entre 10 y 100% en comparación con un nivel de referencia.

El agente de ARNhd dirigido mediante uno o más REVERSIR de la invención incluye dos hebras de ARN que son complementarias y que hibridizan para formar una estructura de dúplex en las condiciones en las cuales se usará el ARNhd. Una hebra de un ARNhd (la hebra antisentido) incluye una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y en general complementaria por completo, con una secuencia diana universal. La secuencia diana puede derivar de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión de una secuencia diana universal. La otra hebra (la hebra sentido) incluye una región que es complementaria a la hebra antisentido, de manera tal que las dos hebras hibridizan y forman una estructura de dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas.

En general, la estructura del dúplex tiene entre 15 y 30 pares de bases de longitud, por ejemplo, entre 15 y 29, entre 15 y 28, entre 15 y 27, entre 15 y 26, entre 15 y 25, entre 15 y 24, entre 15 y 23, entre 15 y 22, entre 15 y 21, entre 15 y 20, entre 15 y 19, entre 15 y 18, entre 15 y 17, entre 18 y 30, entre 18 y 29, entre 18 y 28, entre 18 y 27, entre 18 y 26, entre 18 y 25, entre 18 y

24, entre 18 y 23, entre 18 y 22, entre 18 y 21, entre 18 y 20, entre 19 y 30, entre 19 y 29, entre 19 y 28, entre 19 y 27, entre 19 y 26, entre 19 y 25, entre 19 y 24, entre 19 y 23, entre 19 y 22, entre 19 y 21, entre 19 y 20, entre 20 y 30, entre 20 y 29, entre 20 y 28, entre 20 y 27, entre 20 y 26, entre 20 y 25, entre 20 y 24,20 y 23, entre 20 y 22, entre 20 y 21, entre 21 y 30, entre 21 y 29, entre 21 y 28, entre 21 y 27, entre 21 y 26, entre 21 y 25, entre 21 y 24, entre 21 y 23, o entre 21 y 22 pares de bases de longitud. En determinadas formas de realización, la estructura del dúplex tiene entre 18 y 25 pares de bases de longitud, por ejemplo, entre 18 y 25, entre 18 y 24, entre 18 y 23, entre 18 y 22, entre 18 y 21, entre 18 y 20, entre 19 y 25, entre 19 y 24, entre 19 y 23, entre 19 y 22, entre 19 y 21, entre 19 y 20, entre 20 y 25, entre 20 y 24,20 y 23, entre 20 y 22, entre 20 y 21, entre 21 y 25, entre 21 y 24, entre 21 y 23, entre 21 y 22, entre 22 y 25, entre 22 y 24, entre 22 y 23, entre 23 y 25, entre 23 y 24 o entre 24 y 25 pares de bases de longitud, por ejemplo, entre 19 y 21 pares de bases de longitud. Los rangos y longitudes intermedias de los rangos y longitudes que se indicaron precedentemente también se contemplan como parte de la divulgación.

De manera similar, la región de complementariedad con la secuencia diana tiene entre 15 y 30 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 15 y 29, entre 15 y 28, entre 15 y 27, entre 15 y 26, entre 15 y 25, entre 15 y 24, entre 15 y 23, entre 15 y 22, entre 15 y 21, entre 15 y 20, entre 15 y 19, entre 15 y 18, entre 15 y 17, entre 18 y 30, entre 18 y 29, entre 18 y 28, entre 18 y 27, entre 18 y 26, entre 18 y 25, entre 18 y 24, entre 18 y 23, entre 18 y 22, entre 18 y 21, entre 18 y 20, entre 19 y 30, entre 19 y 29, entre 19 y 28, entre 19 y 27, entre 19 y 26, entre 19 y 25, entre 19 y 24, entre 19 y 23, entre 19 y 22,

entre 19 y 21, entre 19 y 20, entre 20 y 30, entre 20 y 29, entre 20 y 28, entre 20 y 27, entre 20 y 26, entre 20 y 25, entre 20 y 24,20 y 23, entre 20 y 22, entre 20 y 21, entre 21 y 30, entre 21 y 29, entre 21 y 28, entre 21 y 27, entre 21 y 26, entre 21 y 25, entre 21 y 24, entre 21 y 23, o entre 21 y 22 nucleótidos de longitud, por ejemplo entre 19 y 23 nucleótidos de longitud o entre 21 y 23 nucleótidos de longitud. Los rangos y longitudes intermedios de los rangos y longitudes que se indicaron precedentemente también se contemplan como parte de la divulgación.

En algunas formas de realización, la estructura del dúplex tiene entre 19 y 30 pares de bases de longitud. De manera similar, la región de complementariedad con la he secuencia diana tiene entre 19 y 30 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el ARNhd tiene aproximadamente entre 19 y aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En general, el ARNhd es suficientemente largo para servir como un sustrato para la enzima Dicer . Por ejemplo, en el arte se sabe que los ARNhd más largos que entre aproximadamente 21 y 23 nucleótidos pueden servir como sustratos para la Dicer. Tal como lo reconocerán los expertos en la materia, la región de un ARN objetivo de la escisión la mayoría de las veces será parte de una molécula de ARN más grande, con frecuencia una molécula de ARNm. Cuando tenga relevancia, una “parte” de un ARNm diana es una secuencia contigua de un ARNm diana de suficiente longitud para permitir que sea un sustrato para la escisión dirigida por ARNi (es decir, escisión a través de una vía de RISC).

Los expertos en la materia también reconocerán que la región dúplex es

una parte funcional primaria de un ARNhd, por ejemplo, una región dúplex de entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 pares de bases, por ejemplo, entre aproximadamente 19 y 30, entre 19 y 29, entre 19 y 28, entre 19 y 27, entre 19 y 26, entre 19 y 25, entre 19 y 24, entre 19 y 23, entre 19 y 22, entre 19 y 21, entre 19 y 20, entre 20 y 30, entre 20 y 29, entre 20 y 28, entre 20 y 27, entre 20 y 26, entre 20 y 25, entre 20 y 24,20 y 23, entre 20 y 22, entre 20 y 21, entre 21 y 30, entre 21 y 29, entre 21 y 28, entre 21 y 27, entre 21 y 26, entre 21 y 25, entre 21 y 24, entre 21 y 23, o entre 21 y 22 pares de bases. Por lo tanto, en una forma de realización, en la que medida en que sea procesado a un dúplex funcional, de por ejemplo, entre 15 y 30 pares de bases que se dirige a un ARN deseado para su escisión, una molécula de ARN o complejo de moléculas de ARN con una región dúplex mayor que 30 pares de bases es un ARNhd. Por lo tanto, los expertos en la materia reconocerán que en una forma de realización, un miARN es un ARNhd. En otra forma de realización, un ARNhd no es un miARN de origen natural. En otra forma de realización, no se genera un agente de ARNi útil contra la expresión de una secuencia diana universal en la célula diana mediante la escisión de un ARNhd más grande.

Un ARNhd, como se describe en la presente, además puede incluir una o más sobreextensiones de nucleótido de hebra simple, por ejemplo, de entre 1 y 4, entre 2 y 4, entre 1 y 3, entre 2 y 3, 1, 2, 3, o 4 nucleótidos. Los ARNhd que tienen una sobreextensión de por lo menos un nucleótido pueden tener propiedades inhibidoras superiores en relación con sus contrapartes de extremos romos. La sobreextensión de un nucleótido puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, incluyendo un

desoxinucleótido/nucleósido. La o las sobreextensiones pueden ser en la hebra sentido, la hebra antisentido, o cualquier combinación de los mismos. Además, el o los nucleótidos de una sobreextensión pueden estar presentes en el extremo 5' terminal, 3' terminal, o en ambos extremos de una hebra antisentido o sentido de un ARNhd.

Un ARNhd se puede sintetizar mediante métodos estándar conocidos en el arte. Los compuestos de ARNi de hebra doble de la invención se pueden preparar usando un procedimiento de dos pasos. Primero, se preparan las hebras individuales de la molécula de ARN de hebra doble por separado. Luego, se alinean las hebras componentes. Las hebras individuales del compuesto de ARNhd se pueden preparar usando síntesis orgánica en fase de solución, en fase sólida o ambas. La síntesis orgánica ofrece la ventaja de que las hebras de oligonucleótido que comprenden nucleótidos no naturales o modificados se pueden preparar fácilmente. De manera similar, los oligonucleótidos de hebra simple de la invención se pueden preparar usando síntesis orgánica en fase de solución, en fase sólida o ambas.

En un aspecto, un ARNhd de la invención incluye por lo menos dos secuencias nucleotídicas, una secuencia sentido y una secuencia antisentido. En este aspecto, una de las dos secuencias es complementaria a la otra de las dos secuencias, en donde una de las secuencias es sustancialmente complementaria a una secuencia de un ARNm generado por la expresión de una secuencia diana universal.

En determinadas formas de realización, las secuencias sustancialmente complementarias del ARNhd están contenidas en oligonucleótidos separados. En otras formas de realización, las secuencias sustancialmente

complementarias del ARNhd están contenidas en un oligonucleótido único.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd inhibe la expresión del angiotensinógeno (AGT), donde el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble.

En algunas formas de realización, la secuencia nucleotídica de la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende una secuencia nucleotídica que comprende por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 21, o por lo menos 22 nucleótidos consecutivos de la secuencia nucleotídica UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA de la SEQ ID NO: 9. En algunas formas de realización, la secuencia nucleotídica de la hebra sentido del agente de ARNhd comprende una secuencia nucleotídica que comprende por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 21, o por lo menos 22 nucleótidos consecutivos de la secuencia nucleotídica GUCAUCCACAAUGAGAGUACA de la SEQ ID NO: 10.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende la secuencia nucleotídica UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA de la SEQ ID NO: 9.

En algunas formas de realización, la hebra sentido del agente de ARNhd comprende la secuencia nucleotídica GUCAUCCACAAUGAGAGUACA de la SEQ ID NO: 10.

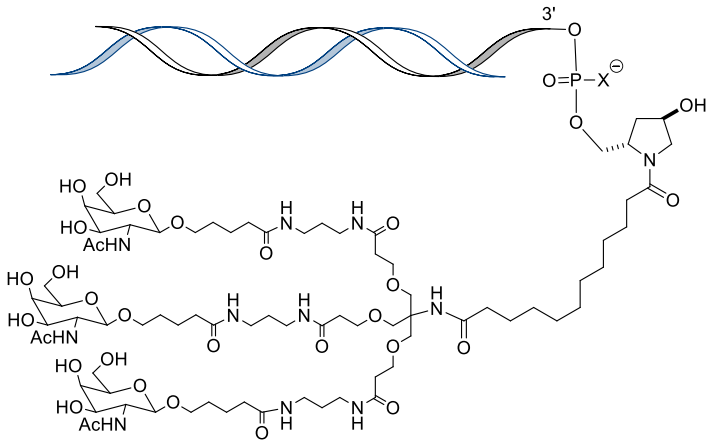
En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende la secuencia nucleotídica UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA de la SEQ ID NO: 9, y la hebra sentido del agente de ARNhd comprende la secuencia nucleotídica

GUCAUCCACAAUGAGAGUACA de la SEQ ID NO: 10.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd consiste en la secuencia nucleotídica UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA de la SEQ ID NO: 9, y la hebra sentido del agente de ARNhd consiste en la secuencia nucleotídica GUCAUCCACAAUGAGAGUACA de la SEQ ID NO: 10.

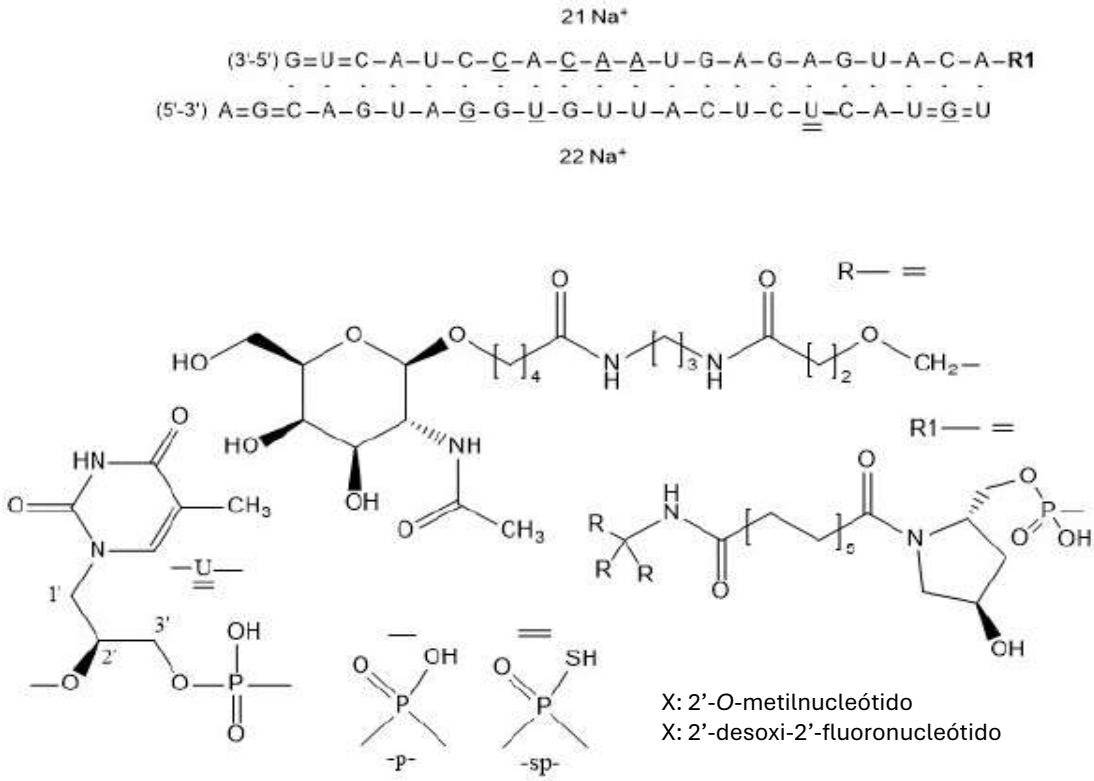
En algunas formas de realización, el agente de ARNhd es el AD-85481, también conocido como Zilebesiran®.

El AD-85481 comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra sentido comprende la secuencia nucleotídica 5'- gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca -3' y la hebra antisentido comprende la secuencia nucleotídica 5'- usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa -3', donde a, g, c, y u son 2′-O-metil (2′-OMe) A, G, C, y U, respectivamente; Af, Gf, Cf y Uf son 2′-fluoro A, G, C y U, respectivamente; s es una unión fosforotioato; y (Tgn) es un timidin-ácido nucleico glicólico (GNA), isómero S; y donde el extremo 3' terminal de la hebra sentido está conjugada a un ligando como se muestra en el siguiente esquema



donde X es O.

Además, una forma de sal farmacéuticamente aceptable del agente de ARNhd incluye cualquier sal que sea farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal de sodio del agente de ARNhd. En algunas formas de realización, la sal farmacéuticamente aceptable del ARNhd tiene la siguiente estructura:



Otros agentes de ARNhd alcanzados por el uno o más REVERSIR de la invención se describen en las Publicaciones Internacionales PCT Nos. WO 2015/179724 y WO 2019/222166, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

Los expertos en la materia son conscientes de que los ARNhd que tienen una estructura dúplex de entre aproximadamente 20 y 23 pares de bases, por ejemplo, 21, pares de bases han sido considerados como particularmente eficaces para inducir la interferencia por ARN (Elbashir y col.,

EMBO 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros autores han hallado que las estructuras de duples de ARN más cortas o más largas también pueden ser eficaces (Chu y Rana (2007) *ARN* 14:1714-1719; Kim y col. (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). En las formas de realización que se describieron anteriormente, los ARNhd que se describen en la presente pueden incluir por lo menos una hebra de una longitud de mínima de 21 nucleótidos. Razonablemente se puede esperar que duples más cortos menos unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos similarmente sean eficaces en comparación con los ARNhd que se describieron anteriormente. Por lo tanto, los ARNhd que tienen una secuencia de por lo menos 19, 20, o más nucleótidos consecutivos, y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión de una secuencia diana universal en no más de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, o 30 % de inhibición a partir de un ARNhd que comprende la secuencia completa, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Además, los ARN identifican uno o más sitios en un transcripto de secuencia diana universal que son susceptibles a la escisión mediada por RISC. Como tal, la presente invención además presenta ARNi que se dirigen contra uno de estos sitios. Tal como se usa en la presente, un ARNi se dirige que se dirige contra un sitio particular de un transcripto de ARN si el ARNi promueve la escisión del transcripto en algún lugar dentro de ese sitio particular. Dicho ARNi en general incluirá por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos consecutivos acoplados con secuencias nucleotídicas adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia seleccionada de la secuencia diana universal.

En determinadas formas de realización, el ARNi universal de la

invención por ejemplo, un ARNhd, no está modificado y no comprende, por ejemplo, modificaciones químicas ni conjugaciones conocidas en el arte y descritas en la presente. En otras formas de realización, el ARNi universal de la invención, por ejemplo, un ARNhd, está químicamente modificado para aumentar la estabilidad u otras características beneficiosas. En determinadas formas de realización de la invención, sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi universal de la invención están modificados, es decir, hay presentes no más de 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótidos no modificados en una hebra del ARNi. En otras formas de realización de la invención, todos los nucleótidos de un ARNi universal están modificados.

Los ácidos nucleicos que se presentan en la invención se pueden sintetizar o modificar mediante métodos bien establecidos en el arte, tales como los que se describen en “Current protocols in nucleic acid chemistry”, Beaucage, S.L. y col. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU., que se incorpora a la presente a modo de referencia. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de extremos, por ejemplo, modificaciones del extremo 5’ (fosforilación, conjugación, uniones invertidas) o modificaciones en el extremo 3’ terminal (conjugación, nucleótidos de ADN, uniones invertidas, *etc.*); modificaciones de bases, por ejemplo, reemplazo por bases estabilizantes, bases desestabilizantes, o bases que se aparean con un repertorio expandido de otras bases, eliminación bases (nucleótidos abásicos), o bases conjugadas; modificaciones del azúcar (por ejemplo, en la posición 2’ o la posición 4’) o reemplazo del azúcar; o modificaciones de esqueleto, que incluyen la modificación o el reemplazo de uniones fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de ARNi que son útiles en las formas de realización

que se describen en la presente incluyen, a título enunciativo no taxativo ARN que contienen esqueletos modificados o uniones internucleosídicas no naturales. Los ARN que tienen esqueletos modificados incluyen, entre otros, los que no tienen ningún átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de esta memoria descriptiva, y como a veces se denomina en el arte, los ARN modificados que no tienen ningún átomo de fósforo en su esqueleto internucleosídico también se consideran oligonucleósidos. En algunas formas de realización, un ARNi modificado tendrá un átomo de fósforo en su esqueleto internucleosídico.

Los esqueletos de ARN modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y de otros alquilos que incluyen 3'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos de estos unidos por enlaces 2'-5', y los que tienen polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades nucleosídicas tienen uniones 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. En algunas formas de realización de la invención, los agentes de ARNhd de la invención están en forma de ácido libre. En otras formas de realización de la invención, los agentes de ARNhd de la invención están en una forma de sal. En una forma de realización, los agentes de ARNhd de la invención están en forma de sal de sodio. En determinadas formas de realización, cuando los agentes de ARNhd de la invención están en forma de sal de sodio, los iones sodio están

presentes en el agente como contraiones para sustancialmente todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato presentes en el agente. Los agentes en que sustancialmente todas las uniones fosfodiéster y/o fosforotioato tienen un contraión de sodio incluyen no más de 5, 4, 3, 2, o 1 uniones fosfodiéster y/o fosforotioato sin ningún contraión de sodio. En algunas formas de realización, cuando los agentes de ARNhd de la invención están en forma de sal de sodio, los iones de sodio están presentes en el agente como contraiones para todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato presentes en el agente.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan sobre la preparación de las uniones anteriores que contienen fósforo incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; 6.028.188; 6.124.445; 6.160.109; 6.169.170; 6.172.209; 6. 239.265; 6.277.603; 6.326.199; 6.346.614; 6.444.423; 6.531.590; 6.534.639; 6.608.035; 6.683.167; 6.858.715; 6.867.294; 6.878.805; 7.015.315; 7.041.816; 7.273.933; 7.321.029; y la Pat de los EE.UU. RE39464, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

Los esqueletos de ARN modificados que no incluyen ningún átomo de fósforo presente tienen esqueletos que están formados por uniones internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y uniones internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones internucleosídicas heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estos incluyen los que tienen uniones morfolino (formadas en parte a partir de

la unidad de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilen formacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alquileno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimina y metilenhidrazina; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas con N, O, S, y CH_2.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan sobre la preparación de los anteriores oligonucleósidos incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

Se contempla el uso de miméticos de ARN adecuados para usar en los ARNi que se proveen en la presente, en donde tanto el azúcar como la unión internucleosídica, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se reemplazan por grupos nuevos. Las unidades de las bases se mantienen para la hibridización con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Uno de tales compuestos oligoméricos en donde un se usa un mimético de ARN que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridización se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos con PNA, el esqueleto de azúcar de un ARN se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se mantienen y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de

la unidad de amida del esqueleto. Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan sobre la preparación de compuestos de PNA incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia. Otros compuestos de PNA adecuados para usar en los ARNi de la invención se describen en, por ejemplo, Nielsen y col., *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas formas de realización que se presentan invención incluyen ARN con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos con heteroátomos, y en particular --CH_2--NH--CH_2-, --CH_2--N(CH_3)--O--CH_2-- [conocido como esqueleto de metilen (metilimino) o MMI], --CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--, --CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-- y --N(CH_3)--CH_2--CH_2-- de la anteriormente citada Patente de los EE.UU. No. 5.489.677, y los esqueletos de amida de la anteriormente citada Patente de los EE.UU. No. 5.602.240. En algunas formas de realización, los ARN que se presentan en la presente tienen las estructuras con esqueleto de morfolino de la anteriormente citada Patente de los EE.UU. No. 5.034.506. El esqueleto fosfodiéster nativo se puede representar como O-P(O)(OH)-OCH2-.

Los ARN modificados también pueden contener una o más unidades azúcar sustituidas. Los ARNi, por ejemplo, los ARNhd, que se proveen en la presente pueden incluir uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, el alquenilo y el alquinilo pueden ser C_1 a C_{10} alquilo o C_2 a C_{10} alquenilo y alquinilo sustituidos o no sustituidos. Los ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen O[(CH_2)$_n$O] $_m$$CH_3$, O($CH_2$).$_n$$OCH_3$,

$O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$, donde n y m son entre 1 y aproximadamente 10. En otras formas de realización, los ARNhd incluyen uno de los siguientes en la posición 2': C_1 a C_{10} alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalante, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNi, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNi, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunas formas de realización, la modificación incluye un 2'-metoxietoxilo (2'-O--$CH_2CH_2OCH_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) es decir, un grupo alcoxil-alcoxilo. Otro ejemplo de modificación es el 2'-dimetilaminooxietoxilo, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos de la presente más adelante, y el 2'-dimetilaminoetoxietoxilo (también conocido en el arte como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH_2--O--CH_2--$N(CH_3)_2$. Otros ejemplos de modificaciones incluyen: nucleótidos 5'-Me-2'-F, 5'-Me-2'-OMe, 5'-Me-2'-desoxinucleótidos, (tanto isómeros R como S en estas tres familias); 2'-alcoxiloalquilo; y 2'-NMA (N-metilacetamida).

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxilo (2'-OCH_3), 2'-aminopropoxilo (2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$) y 2'-flúor (2'-F). También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el ARN de un ARNi, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o la

unión 2'-5' de los ARNhd y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los ARNi también pueden tener miméticos de azúcar tales como unidades ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan sobre la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920, algunas de las cuales son de propiedad común con la presente solicitud. Los contenidos completos de cada una de las anteriores se incorporan a la presente a modo de referencia.

Un ARNi universal también puede incluir modificaciones o sustituciones de las nucleobases (con frecuencia llamadas en el arte simplemente “bases”). Tal como se usa en la presente, las nucleobases “no modificadas” o “naturales” incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C), y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como desoxitimidina (dT)**,** 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y de otros alquilos de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y de otros alquilos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-

deazaguanina y 7-daazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras nucleobases incluyen las que se divulgan en la Patente de los EE.UU. No. 3.687.808, las que se divulgan en Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; las que se divulgan en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, las divulgadas por Englisch y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y las divulgadas por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos que se proveen en la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 0-6 sustituidas, incluyendo a 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico entre 0,6 y 1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son ejemplos de sustituciones de base, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar.

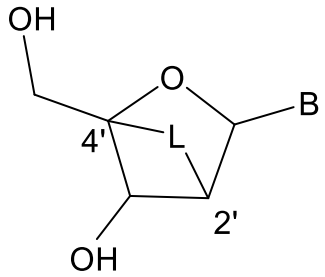
Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan sobre la preparación de algunas de las anteriormente mencionadas nucleobases modificadas así como otras nucleobases modificadas incluyen, a título enunciativo no taxativo, las anteriormente citadas Patentes de los EE.UU. Nos. 3.687.808. 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469;

5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; y 7.495.088, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

En algunas formas de realización, un agente de ARNi de la divulgación también se puede modificar para incluir una o más unidades de azúcar bicíclico. Un “azúcar bicíclico” es un anillo de furanosilo modificado con un anillo formado por un puente de dos carbonos, adyacentes o no adyacentes. Un “nucleósido bicíclico” (“BNA”) es un nucleósido que tiene una unidad de azúcar que comprende un anillo formado por un puente de dos carbonos, adyacentes o no adyacentes, a partir del anillo del azúcar, formando de esta manera un sistema de anillo bicíclico. En determinadas formas de realización, el puente conecta el carbono 4′ y el carbono 2′ del anillo de azúcar, opcionalmente, a través del átomo de oxígeno 2’-acíclico. Por lo tanto, en algunas formas de realización un agente de la invención puede incluir uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene una unidad de ribosa modificada en donde la unidad de ribosa comprende un puente extra que conecta los carbonos 2' y 4'. En otras palabras, un LNA es un nucleótido que comprende una unidad de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH_2-O-2'. Esta estructura "bloquea" eficazmente la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que el agregado de ácidos nucleicos bloqueados a los ARNhd aumenta la estabilidad del ARNhd en el suero, y reduce los efectos inespecíficos (Elmen, J. y col., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. y col., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. y col., (2003) *Nucleic Acids*

Research 31(12):3185-3193). Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos para usar en los polinucleótidos de la invención incluyen sin limitación los nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo de ribosilo 4′ y 2′. En determinadas formas de realización, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente 4′ a 2′.

Un nucleósido bloqueado puede representarse mediante la siguiente estructura (omitiendo la estereoquímica),



donde B es una nucleobase o nucleobase modificada y L es el grupo conector que une el carbono 2’ con el carbono 4’ del anillo de ribosa. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos con puentes 4′ a 2′, incluyen a título enunciativo no taxativo 4′-(CH_2)—O-2′ (LNA); 4′-(CH_2)—S-2′; 4′-$(CH_2)_2$—O-2′ (ENA); 4′-$CH(CH_3)$—O-2′ (también llamado “constreñido por etilo” o “cEt”) y 4′-$CH(CH_2OCH_3)$—O-2′ (y análogos del mismo; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 7.399.845); 4′-$C(CH_3)(CH_3)$—O-2′ (y análogos del mismo; véase por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.278.283); 4′-CH_2—$N(OCH_3)$-2′ (y análogos del mismo; véase por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.278.425); 4′-CH_2—O—$N(CH_3)$-2′ (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2004/0171570); 4′-CH_2—N(R)—O-2′, donde R es H, C1-C12 alquilo, o un grupo protector de nitrógeno (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 7.427.672); 4′-CH_2—$C(H)(CH_3)$-2′ (véase, por

ejemplo, Chattopadhyaya y col*., J. Org. Chem*., 2009, 74, 118-134); y 4′-CH_2—C(=CH_2)-2′ (y análogos del mismo; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.278.426). Los contenidos completos de cada una de las anteriores se incorporan a la presente a modo de referencia.

Otras Patentes de los EE.UU. y Publicaciones de Patente de los EE.UU. representativas que divulgan sobre la preparación de nucleótidos de ácido nucleico bloqueado incluyen, a título enunciativo no taxativo, las siguientes: Patentes de los EE.UU. Nos. 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.034.133;7.084.125; 7.399.845; 7.427.672; 7.569.686; 7.741.457; 8.022.193; 8.030.467; 8.278.425; 8.278.426; 8.278.283; US 2008/0039618; y US 2009/0012281, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

Cualquiera de los anteriores nucleósidos bicíclicos se puede preparar con una o más configuraciones estereoquímicas del azúcar que incluyen por ejemplo α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (véase WO 99/14226).

Un ARNi de la invención también se puede modificar para incluir uno o más nucleótidos constreñidos por etilo. Tal como se usa en la presente, un "nucleótido constreñido por etilo" o "cEt" es un ácido nucleico bloqueado que comprende una unidad de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-$CH(CH_3)$-O-2' (es decir, L en la anterior estructura). En una forma de realización, un nucleótido constreñido por etilo en la conformación S se denomina en la presente “S-cEt”.

Un ARNi de la invención también puede incluir uno o más “nucleótidos conformacionalmente restringidos” (“CRN”). Los CRN son análogos de nucleótido con un conector que conecta los carbonos C2’y C4’ de la ribosa o

los carbonos C3 y -C5′ de la ribosa. Los CRN bloquean el anillo de ribosa en una conformación estable y aumentan la afinidad de hibridización por el ARNm. El conector es de suficiente longitud para poner al oxígeno en una posición óptima con una estabilidad y afinidad que resultan en menos plegado del anillo de ribosa.

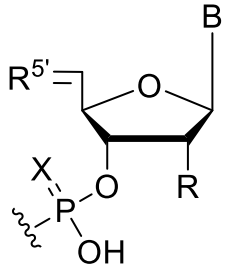
Las publicaciones representativas que divulgan sobre la preparación de algunos de los anteriormente citados CRN incluyen, a título enunciativo no taxativo, Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2013/0190383; y Publicación PCT WO 2013/036868, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

En algunas formas de realización, el ARNhd de la invención comprende una o más modificaciones que son nucleótidos UNA (ácidos nucleicos no bloqueados). Un UNA es un ácido nucleico acíclico no bloqueado, donde cualquiera de los enlaces del azúcar se ha eliminado, formando un residuo de "azúcar" no bloqueado. En un ejemplo, el UNA también abarca monómeros con enlaces entre C1'-C4' que se han eliminado (es decir el enlace covalente carbono-oxígeno-carbono entre los carbonos C1' y C4'). En otro ejemplo, el enlace C2'-C3' (es decir el enlace covalente carbono-carbono entre los carbonos C2' y C3') del azúcar se ha eliminado (véase *Nuc. Acids Symp. Series,* 52, 133-134 (2008) y Fluiter y col., *Mol. Biosyst.,* 2009, 10, 1039 incorporadas a la presente a modo de referencia).

Las Publicaciones de los EE.UU. representativas que divulgan sobre la preparación de UNA incluyen, a título enunciativo no taxativo, la Patente de los EE.UU. No. 8.314.227; y las Publicaciones de Patente de los EE.UU. Nos. 2013/0096289; 2013/0011922; y 2011/0313020, cuyos contenidos se

incorporan por completo a la presente a modo de referencia.

En determinadas formas de realización, las composiciones y los métodos de la divulgación incluyen una modificación de vinil fosfonato (VP) de un agente de ARNi como se describe en la presente. En formas de realización ejemplificativas, un nucleótido modificado con 5’ vinil fosfonato de la divulgación tiene la siguiente estructura:



donde X es O o S;

R es hidrógeno, hidroxilo, flúor, o C_{1-20}alcoxilo (por ejemplo, metoxilo o n-hexadeciloxilo);

$R^{5'}$ es =C(H)-P(O)$(OH)_2$ y el enlace doble entre el carbono C5’ y $R^{5'}$ está en la orientación *E* o *Z* (por ejemplo, orientación *E*); y

B es una nucleobase o una nucleobase modificada, opcionalmente donde B es adenina, guanina, citosina, timina, o uracilo.

Un vinil fosfonato de la presente divulgación se puede unir a la hebra antisentido o la hebra sentido de un ARNhd de la divulgación. En determinadas formas de realización, un vinil fosfonato de la presente divulgación se une a la hebra antisentido de un ARNhd, opcionalmente en el extremo 5’ de la hebra antisentido del ARNhd.

Las modificaciones de vinil fosfonato también están contempladas para las composiciones y los métodos de la presente divulgación. Un ejemplo de estructura de vinil fosfonato incluye la anterior estructura, donde R5’ es =C(H)-

OP(O)(OH)2 y el enlace doble entre el carbono C5’ y R5’ está en la orientación E o Z (por ejemplo, la orientación E).

Las modificaciones potencialmente estabilizantes en los extremos de las moléculas de ARN pueden incluir N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6), N-(acetil-4-hidroxiprolinol (Hyp-NHAc), timidina-2'-O-desoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3’-fosfato, ribonucleótido invertido modificado con 2’-desoxilo, tal como dT invertido (idT), dA invertido (idA), e 2’-desoxirribonucleótido abásico invertido (iAb) y otros. La divulgación de esta modificación se puede hallar en WO 2011/005861.

En un ejemplo, el extremo 3’ o 5’ terminal de un oligonucleótido se une a un ribonucleótido invertido modificado con 2’-desoxilo, tal como dT invertido (idT), dA invertido (idA), o un 2’-desoxirribonucleótido abásico invertido (iAb). En un ejemplo particular, el ribonucleótido invertido modificado con 2’-desoxilo se conecta al extremo 3’ terminal de un oligonucleótido, tal como el extremo 3’ terminal de una hebra sentido descrita en la presente, en donde la conexión es a través de una unión fosfodiéster 3’-3’ o una unión fosforotioato 3’-3’.

En otro ejemplo, el extremo 3’ terminal de una hebra sentido se conecta a través de una unión fosforotioato 3’-3’ a un ribonucleótido abásico invertido (iAb). En otro ejemplo, el extremo 3’ terminal de una hebra sentido se conecta a través de una unión fosforotioato 3’-3’ a un dA invertido (idA).

En un ejemplo particular, el ribonucleótido invertido modificado con 2’-desoxilo se conecta al extremo 3’ terminal de un oligonucleótido, tal como el extremo 3’ terminal de una hebra sentido descrita en la presente, en donde la conexión es a través de una unión fosfodiéster 3’-3’ o una unión fosforotioato

3’-3’.

En otro ejemplo, el nucleótido 3’-terminal de una hebra sentido es un dA invertido (idA) y se conecta al nucleótido precedente a través de una unión 3’-3’- (por ejemplo, unión fosforotioato 3’-3’).

Otras modificaciones de los nucleótidos de un ARNi de la invención incluyen un 5’ fosfato o mimético de 5’ fosfato, por ejemplo, un fosfato o mimético de fosfato 5’-terminal en la hebra antisentido de un ARNi. Los miméticos de fosfato adecuados se divulgan en, por ejemplo la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2012/0157511, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

VII. Métodos de administración de la invención

La administración de una molécula de ácido nucleico, es decir, un ARNhd y/o un compuesto REVERSIR como se describe en la presente a una célula por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto humano (por ejemplo, un sujeto que lo requiere) se puede lograr de varias maneras diferentes. Por ejemplo, la administración se puede llevar a cabo poniendo en contacto una célula con un agente de ARNhd, o un compuesto REVERSIR como se describe en la presente *in vitro* o bien *in vivo*. La administración *in vivo* también se puede llevar a cabo directamente mediante la administración de una composición que comprende un ARNhd y/o un compuesto REVERSIR como se describe en la presente a un sujeto. Como alternativa, la administración *in vivo* se puede llevar a cabo indirectamente mediante la administración de uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión de los agentes de ARNhd y/o el compuesto REVERSIR. Estas formas de realización se analizan en forma más detallada más adelante.

Para la administración de la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, REVERSIR y los agentes de ARNhd, en general, se puede adaptar cualquier método de administración de una molécula de ácido nucleico (*in vitro* o *in vivo*) para usar con la presente invención (véase por ejemplo, Akhtar S. y Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol*. 2(5):139-144 y WO94/02595, que se incorporan en la presente a modo de referencia en sus totalidades). Para la administración *in vivo*, los factores a considerar incluyen, por ejemplo, la estabilidad biológica de la molécula administrada, la prevención de los efectos no específicos, y la acumulación de la molécula administrada en el tejido diana. La interferencia de ARN también ha sido exitosa con la administración local al SNC por inyección directa (Dorn, G., y col. (2004) *Nucleic Acid* 32:e49; Tan, PH., y col (2005) *Gene Ther*. 12:59-66; Makimura, H., y col (2002) *BMC Neurosci*. 3:18; Shishkina, GT., y col (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., y col (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 101:17270-17275; Akaneya,Y., y col (2005) *J. Neurophysiol*. 93:594-602). La modificación del ARN del vehículo farmacéutico también puede permitir el direccionamiento del ARNi al tejido diana y evitar efectos inespecíficos indeseables. Las moléculas de ARNi se pueden modificar mediante conjugación química con grupos lipofílicos tales como colesterol para aumentar la captación celular y evitar la degradación. Por ejemplo, un ARNi dirigido contra ApoB conjugado a una unidad de colesterol lipofílico se inyectó sistémicamente en ratones y dio como resultado el silenciamiento del ARNm de apoB tanto en hígado como en yeyuno (Soutschek, J., y col (2004) *Nature* 432:173-178).

En una forma de realización alternativa, la administración puede incluir el uso de sistemas de administración de fármacos tales como un nanopartícula,

un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de administración catiónico. Los sistemas de administración catiónica con carga positiva facilitan la unión de una molécula de ácido nucleico (cargada negativamente) y también mejoran las interacciones en la membrana celular cargada negativamente para permitir una captación eficiente por parte de la célula. Los lípidos catiónicos, los dendrímeros, o los polímeros pueden estar unido a un ácido nucleico o pueden inducirse para formar una vesícula o micela (véase por ejemplo, Kim SH, y col (2008) J*ournal de Controlled Release* 129(2):107-116) que encasilla a un ARNi. La formación de vesículas o micelas previene aún más la degradación del ácido nucleico cuando se administra por vía sistémica. Los métodos para elaborar y administrar complejos catiónicos con ácidos nucleicos están dentro de las habilidades de los expertos en la materia (véase por ejemplo, Sorensen, DR, y col (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN, y col (2003) Clin. *Cancer Res*. 9:1291-1300; Arnold, AS y col (2007) *J. Hypertens*. 25:197-205, que se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad). Algunos ejemplos no limitantes de sistemas de administración de fármacos que son útiles para la administración sistémica de los ARNi incluyen DOTAP (Sorensen, DR., y col (2003), supra; Verma, UN, y col (2003), *supra*), "solid nucleic acid lipid particles" (Zimmermann, TS, y col (2006) *Nature* 441:111-114), cardiolipina (Chien, PY, y col (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, y col (2005) *Int J. Oncol*. 26:1087-1091), polietilenimina (Bonnet ME, y col (2008) *Pharm. Res*. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol*. 71659), péptidos Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm*. 3:472-487), y poliamidoaminas (Tomalia, DA, y col (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., y col (1999) *Pharm. Res*. 16:1799-1804). En algunas formas de

realización, un ácido nucleico forma un complejo con ciclodextrina para la administración sistémica. Los métodos de administración y las composiciones farmacéuticas de ácido nucleico y ciclodextrinas se pueden hallar en la Patente de los EE.UU. No. 7.427.605, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

VIII. Métodos de la invención

La presente invención también provee métodos para usar los compuestos REVERSIR de la invención.

Por ejemplo, en ciertos casos es deseable inhibir la actividad de interferencia por ARNi de un agente de ARNhd restituyendo así la expresión de un ARNm/proteína diana. En particular, ciertos agentes de ARNhd se han usado en forma terapéutica y son de acción prolongada. En ciertos casos, dichos agentes de ARNhd de acción prolongada son deseables por su conveniencia. En dichos casos, sin embargo, también puede ser deseable tener un medio para revertir la actividad de un agente de ARNhd. Por ejemplo, un paciente puede responder mal a un tratamiento o recibir una dosis demasiado alta. En dicho caso, se puede administrar un compuesto REVERSIR como, por ejemplo, antídoto, para reducir por lo menos parcialmente la actividad de ARNi del agente de ARNhd. En determinadas formas de realización, el efecto de acción prolongada del agente de ARNhd hace que esperar la lenta disminución de ese efecto por depuración natural una opción poco atractiva.

A modo de ejemplo, y sin limitar la presente invención, ciertos ARNhd son útiles para inhibir los factores de coagulación de la sangre (por ejemplo, el Factor II (protrombina), Factor VII, Factor IX, etc.). Dichos ARNhd tienen

potencial terapéutico como anticoagulantes. Las vidas medias largas hacen de dichos ARNhd particularmente atractivos, sin embargo, si un paciente recibe una dosis demasiado alta, tiene cirugía (en donde es indeseable la anticoagulación) o desea de alguna forma una disminución del efecto anticoagulante, se puede administrar un compuesto REVERSIR contra el ARNhd anticoagulante. Dicho compuesto REVERSIR restituirá la función de coagulación más rápidamente que la simple espera de la depuración natural del ARNhd. Este ejemplo se provee en forma ilustrativa. Se han diseñado muchos ARNhd contra un gran número de genes, incluyendo sin limitación, un gran número de dianas de ARN mensajeros (ARNm) y dianas de pre-ARNm, así como un gran número de dianas de ARN no codificantes. En la presente se proveen compuestos REVERSIR adecuados para cualquier ARNhd, independientemente de la diana o del mecanismo del compuesto de ARNhd.

En determinadas formas de realización, la invención provee compuestos REVERSIR contra un ARNhd dirigido a un ARNm. En ciertas de dichas formas de realización, el ARNm diana codifica para una proteína implicada en el metabolismo. En ciertas de dichas formas de realización, el ARNm diana codifica para una proteína implicada en la función cardíaca. En determinadas formas de realización, el ARNm diana codifica para una proteína implicada en la coagulación de la sangre. En el arte se conocen ejemplos de compuestos de ARNhd contra cualquiera de una variedad de proteínas diana. Además, los métodos para preparar ARNhd contra un gen diana son bien conocidos en el arte y están fácilmente disponibles para los expertos en la materia.

Sin limitaciones, los genes diana para los ARNhd incluyen, a título enunciativo no taxativo genes que promueven la proliferación celular no

deseada, gen del factor de crecimiento, gen del receptor del factor de crecimiento, genes que expresan quinasas, un gen de proteína adaptadora, un gen que codifica para una molécula de la super familia de proteínas G, un gen que codifica para un factor de transcripción, un gen que media la angiogénesis, un gen viral, un gen necesario para la replicación viral, un gen celular que media la función viral, un gen de un patógeno bacteriano, un gen de un patógeno amebiano, un gen de un patógeno parásito, un gen de un patógeno fúngico, un gen que media una respuesta inmunológica no deseada, un gen que media en el procesamiento del dolor, un gen que media en una enfermedad neurológica, un gen alegado encontrado en células caracterizadas por la pérdida de heterocigosidad, o un gen alegado de un gen polimórfico.

Ejemplos específicos de genes diana para los ARNhd incluyen, a título enunciativo no taxativo, AT3, AGT, ALAS1, TMPR, HAO1, AGT, C5, CCR-5, gen PDGF beta; gen Erb-B, gen Src; gen CRK; gen GRB2; gen RAS; gen MEKK; gen JNK; gen RAF; gen Erk1/2; gen PCNA(p21); gen MYB; gen c-MYC; gen JUN; gen FOS; gen BCL-2; gen de la ciclina D; gen VEGF; gen EGFR; gen de ciclina A; gen de la ciclina E; gen WNT-1; gen de beta-catenina; gen c-MET; gen PKC; gen NFKB; gen STAT3; gen de survivina; gen Her2/Neu; gen de la topoisomerasa I; gen de la topoisomerasa II alfa; gen p73; gen p21(WAF1/CIP1), gen p27(KIP1); gen PPM1D; gen caveolina I; gen MIB I; gen MTAI; gen M68; genes supresores de tumores; gen p53; gen DN-p63; gen supresor de tumores pRb; gen supresor de tumores APC1; gen supresor de tumores BRCA1; gen supresor de tumores PTEN; genes de fusión de MLL, por ejemplo, MLL-AF9, gen de fusión BCR/ABL; gen de fusión TEL/AML1; gen de fusión EWS/FLI1; gen de fusión TLS/FUS1; gen de fusión PAX3/FKHR; gen de

fusión AML1/ETO; gen alfa v-integrina; gen del receptor Flt-1; gen de tubulina; gen del virus del papiloma humano, un gen necesario para la replicación del virus del papiloma humano, gen del virus de la inmunodeficiencia humana, un gen necesario para la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana, gen del virus de la hepatitis A, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis A, gen del virus de la hepatitis B, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis B, gen del virus de la hepatitis C, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis C, gen del virus de la hepatitis D, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis D, gen del virus de la hepatitis E, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis E, gen del virus de la hepatitis F, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis F, gen del virus de la hepatitis G, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis G, gen del virus de la hepatitis H, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis H, gen del virus sincitial respiratorio, un gen necesario para la replicación del virus sincitial respiratorio, gen del virus del herpes simple, un gen necesario para la replicación del virus del herpes simple, gen de citomegalovirus del herpes, un gen necesario para la replicación del citomegalovirus del herpes, gen del virus del herpes Epstein Barr, un gen necesario para la replicación del virus del herpes Epstein Barr, gen del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, un gen necesario para la replicación del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, gen del virus JC, gen humano necesario para la replicación del virus JC, gen de mixovirus, un gen necesario para la replicación del gen de mixovirus, gen de rinovirus, un gen necesario para la replicación del rinovirus, gen del coronavirus, un gen necesario para la replicación del coronavirus, gen del virus del Nilo Occidental,

un gen necesario para la replicación del virus del Nilo Occidental, gen de la encefalitis de San Luis, un gen necesario para la replicación del rinovirus de la encefalitis de Louis, gen del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, un gen necesario para la replicación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, gen del virus de la encefalitis del Valle de Murray, un gen necesario para la replicación del virus de la encefalitis del Valle de Murray, gen del virus del dengue, un gen necesario para la replicación del virus del dengue, gen del virus 40 de los simios, un gen necesario para la replicación del virus 40 de los simios, gen del virus linfaotrópico de células T humanas, un gen necesario para la replicación del virus linfaotrópico de células T humanas, gen del virus de la leucemia de Moloney-Morina, un gen que necesario para la replicación del virus de la leucemia de Moloney-Morina, gen del virus de la encefalomiocarditis, un gen necesario para la replicación del virus de la encefalomiocarditis, gen del virus del sarampión, un gen necesario para la replicación del virus del sarampión, gen del virus Varicella Zóster, un gen necesario para la replicación del virus Varicella Zóster, gen del adenovirus, un gen que es necesario para la replicación del adenovirus, gen del virus de la fiebre amarilla, un gen necesario para la replicación del virus de la fiebre amarilla, gen del poliovirus, un gen necesario para la replicación del poliovirus, gen de poxvirus, un gen necesario para la replicación del poxvirus, gen de plasmodium, un gen necesario para la replicación del gen de plasmodium, gen de Mycobacterium ulcerans, un gen necesario para la replicación de Mycobacterium ulcerans, gen de Mycobacterium tuberculosis, un gen necesario para la replicación de Mycobacterium tuberculosis, gen de Mycobacterium leprae, un gen necesario para la replicación de Mycobacterium leprae, gen de Staphylococcus aureus,

un gen necesario para la replicación de Staphylococcus aureus, gen de Streptococcus pneumoniae, un gen necesario para la replicación de Streptococcus pneumoniae, gen de Streptococcus pyogenes, un gen necesario para la replicación de Streptococcus pyogenes, gen de Chlamydia pneumoniae, gen necesario para la replicación de Chlamydia pneumoniae, gen de Mycoplasma pneumoniae, un gen necesario para la replicación de Mycoplasma pneumoniae, un gen de integrina, un gen de selectina, un gen del sistema del complemento, un gen de quimioquina, un gen del receptor de quimioquina, un gen GCSF, un gen Gro1, un gen Gro2, un gen Gro3, un gen PF4, un gen MIG , gen de proteína básica proplaquetaria, gen MIP-1I, gen MIP-1J, gen RANTES, gen MCP-1, gen MCP-2, gen MCP-3, gen CMBKR1, gen CMBKR2, gen CMBKR3, CMBKR5v, AIF-1 gen, gen I-309, un gen de un componente de un canal iónico, un gen de un receptor de neurotransmisor, un gen de un ligando de neurotransmisor, gen de la familia amiloide, gen de presenilina, gen HD, gen DRPLA, gen SCA1, gen SCA2 , gen MJD1, gen CACNL1A4, gen SCA7, gen SCA8, alelo de gen que se halla en las células con pérdida de heterocigocidad (LOH), un alelo génico de un gen polimórfico y combinaciones de los mismos.

En un aspecto, la presente invención provee un método para inhibir la actividad inhibidora de ARNi de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. El método incluye poner en contacto el agente de ARNhd con el oligonucleótido de hebra simple de la invención o la composición farmacéutica de la invención, inhibiendo de esta manera la actividad inhibidora de ARNi de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido.

El paso de poner en contacto una célula se puede realizar *in vitro* o *in vivo*. El paso de poner en contacto una célula *in vivo* incluye poner en contacto una célula o grupo de células dentro de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. También son posibles combinaciones de métodos *in vitro* e *in vivo* de poner en contacto una célula. El paso de poner en contacto una célula puede ser directo o indirecto, tal como se analizó anteriormente. Además, el paso de poner en contacto una célula se puede realizar a través de un ligando de direccionamiento, que incluye cualquier ligando descrito en la presente o conocido en el arte. En algunas formas de realización, el ligando de direccionamiento es una unidad de hidrato de carbono, por ejemplo, un ligando $GalNAc_3$, o cualquier otro ligando que dirija el agente de ARNi y/o el compuesto REVERSIR a un sitio de interés.

La inhibición de la actividad de interferencia por ARNi de un agente de ARNhd se puede manifestar mediante una reducción de la cantidad de ARNm que es expresado por una primera célula o grupo de células en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células.

En otras formas de realización, la inhibición de la actividad de interferencia por ARNi de un agente de ARNhd se puede evaluar en términos de una reducción de un parámetro que esté funcionalmente relacionado con la expresión del ARNm diana, por ejemplo, el nivel de proteína en la sangre o el suero de un sujeto. La expresión se puede determinar en cualquier célula mediante cualquier ensayo conocido en el arte.

La inhibición de una proteína se puede manifestar por una reducción del nivel de la proteína que se expresa en una célula o grupo de células o en una

muestra de un sujeto (por ejemplo, el nivel de proteína en una muestra de sangre obtenida de un sujeto). Como se explicó antes, para la evaluación de la supresión del ARNm, la inhibición de los niveles de expresión de proteína en una célula o grupo de células tratadas se puede expresar de manera similar como un porcentaje del nivel de proteína en una célula o grupo de células control, o como el cambio del nivel de proteína en una muestra de un sujeto, por ejemplo, sangre o suero derivada del mismo.

El nivel de ARNm que se expresa en una célula o grupo de células se puede determinar usando cualquier método conocido en el arte para evaluar la expresión del ARNm. En una forma de realización, el nivel de la expresión en una muestra se determina mediante la detección de un polinucleótido transcripto, o una parte del mismo, por ejemplo, ARNm. El ARN se puede extraer de las células usando técnicas de extracción de ARN que incluyen, por ejemplo, el uso de extracción con fenol ácido/isotiocinato de guanidina (RNAzol B; Biogenesis), kits de preparación de ARN RNeasy™ (Qiagen®) o PAXgene™ (PreAnalytix™, Suiza). Los formatos de ensayo tipo que utilizan la hibridización de ácido ribonucleico ensayos de run-on nuclear, RT-PCR, ensayos de protección contra ARNasa, transferencia northern, hibridización *in situ*, y análisis por micromatrices.

En algunas formas de realización, el nivel de la expresión se determina usando una sonda de ácido nucleico. El término “sonda”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier molécula que sea capaz de unirse selectivamente a un transgén específico. Las sondas pueden ser sintetizadas mediante cualquier experto en la materia, u obtenerse de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas se pueden diseñar específicamente para ser

marcadas. Los ejemplos de moléculas que se pueden usar como sondas incluyen, a título enunciativo no taxativo, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

El ARNm aislado se puede usar en ensayos de hibridización o amplificación que incluyen, a título enunciativo no taxativo, análisis por Southern o northern, análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayos con sondas. Un método para la determinación de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridizar con el ARNm del transgén. En una forma de realización, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo separando el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En una forma de realización alternativa, la o las sondas se inmovilizan en una superficie sólida y se pone en contacto el ARNm con la o las sondas, por ejemplo, en un arreglo de chip de genes de Affymetrix®. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente los métodos de detección de ARNm conocidos para usarlos en la determinación del nivel de ARNm del transgén.

Un método alternativo para determinar el nivel de la expresión en una muestra implica el proceso de amplificación o transcripción reversa del ácido nucleico (para preparar ADNc) de por ejemplo el ARNm de la muestra, por ejemplo, mediante RT-PCR (la forma de realización experimental establecida por Mullis, 1987, Patente de los EE.UU. No. 4.683.202), reacción de cadena de la ligasa (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), replicación de secuencias auto sustentada (Guatelli y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh y col. (1989)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi y col. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), replicación por círculo rodante (Lizardi y col., Patente de los EE.UU. No. 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en cantidades muy bajas. En aspectos particular de la invención, el nivel de la expresión se determina por RT-PCR fluorogénica cuantitativa (es decir, el sistema TaqMan™).

Los niveles de expresión de ARNm se pueden monitorear usando una transferencia a membrana (tal como se usa en el análisis por hibridización tal como northern, Southern, dot, y similares), o micropocillos, tubos de muestra, geles, esferas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprenda ácidos nucleicos unidos). Véanse las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.770.722; 5.874.219; 5.744.305; 5.677.195 y 5.445.934, que se incorporan en la presente a modo de referencia. La determinación del nivel de expresión del transgén también puede comprender el uso de sondas de ácido nucleico en solución.

En algunas formas de realización, el nivel de ARNm expresión se evalúa usando ensayos de ADN ramificado (bDNA) o PCR en tiempo real (qPCR). El uso de estos métodos se describe y ejemplifica en los Ejemplos que se proveen en la presente.

El nivel de expresión proteica se puede determinar usando cualquier método conocido en el arte para la medida d ellos niveles de proteínas. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar,

cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, reacciones de precipitina en líquido o gel, espectroscopia de absorción, ensayos colorimétricos, ensayos espectrofotométricos, citometría de flujo, inmunodifusión (simple o doble), inmunoelectroforesis, transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de electroquimioluminiscencia, y similares.

En algunas formas de realización, la eficacia de los métodos de la invención se evalúa por una disminución del nivel de ARNm o proteína (por ejemplo, en una biopsia de hígado).

En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar a un sujeto que lo requiere. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del oligonucleótido de hebra simple de la invención o la composición farmacéutica de la invención, tratando de esta manera al sujeto.

En algunas formas de realización, el sujeto que lo requiere recibió previamente la administración de un agente de ARNi de hebra doble que inhibe la expresión de un gen diana y que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido.

El sujeto que lo requiere puede haber recibido la administración de una dosis demasiado alta del agente de ARNhd y/o estar experimentando efectos inespecíficos. La administración del REVERSIR al sujeto, por lo tanto, actuaría como un antídoto para revertir la inhibición del gen diana mediante el agente de ARNhd.

En una forma de realización, el gen diana es el angiotensinógeno (AGT). El sujeto que lo requiere puede haber recibido la administración de una dosis

demasiado alta del agente de ARNhd y estar padeciendo hipotensión, hiperpotasemia, y/o disfunción renal. En determinadas formas de realización, los métodos además pueden comprender administrar al sujeto una terapia adicional o agente terapéutico que se selecciona del grupo que consiste en fluidos/sal de la dieta aumentados, tratamiento con fludrocortisona/midodrina, fluidos intravenosos, medicamentos vasopresores, disminución de la dosis o interrupción de medicamentos antihipertensivos concomitantes, una dieta baja en potasio, medicamentos tiazida/diuréticos de asa, quelantes orales de potasio, calcio, glucosa, insulina, y hemodiálisis, o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para aliviar un efecto secundario de un agente de ARNhd en un sujeto que inhibe la expresión de un gen diana y que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido, tal como un efecto inespecífico y/o reacción alérgica y/o efecto inmunoestimulador de la administración del agente de ARNhd. El método incluye, administrar al sujeto una cantidad eficaz del oligonucleótido de hebra simple de la invención o la composición farmacéutica de la invención, aliviando de esta manera el efecto secundario del agente de ARNhd en el sujeto.

Los métodos *in vivo* de la invención pueden incluir administrar a un sujeto una composición por cualquier medio conocido en el arte incluyendo, a título enunciativo no taxativo la administración oral, intraperitoneal, o parenteral, incluyendo intracraneal (por ejemplo, intraventricular, intraparenquimatosa e intratecal), intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, aérea (aerosol), nasal, rectal, y tópica (incluyendo bucal y sublingual). En

determinadas formas de realización, las composiciones se administran por inyección o infusión intravenosa. En determinadas formas de realización, las composiciones se administran por inyección subcutánea. En determinadas formas de realización, las composiciones se administran por inyección intramuscular.

Una composición de la invención se puede administrar en forma de “ARNi libre” o como un “compuesto REVERSIR libre”. Un ARNi libre o compuesto REVERSIR libre se administra en ausencia de una composición farmacéutica. El ARNi desnudo o compuesto REVERSIR desnudo puede estar en una solución amortiguadora adecuada. La solución amortiguadora puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato, o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la solución amortiguadora es solución salina amortiguada con fosfato (PBS). El pH y la osmolaridad de la solución amortiguadora se pueden ajustar de manera tal que sea adecuada para administrar a un sujeto.

Como alternativa, una composición de la invención se puede administrar como una composición farmacéutica, tal como un formulación liposomal.

IX. Kits de la invención

En ciertos aspectos, la presente divulgación provee kits que incluyen un recipiente adecuado que contiene un oligonucleótido de hebra simple para inhibir la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido o una formulación farmacéutica de un oligonucleótido de hebra simple para inhibir la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido

térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido.

Dichos kits incluyen uno o más oligonucleótidos de hebra simple e instrucciones de uso, por ejemplo, instrucciones para administrar una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido de hebra simple para inhibir la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido o una formulación farmacéutica de un oligonucleótido de hebra simple para inhibir la actividad de iARN de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNihd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. El oligonucleótido de hebra simple o composición farmacéutica puede estar en un vial o una jeringa precargada. Los kits opcionalmente además pueden comprender un agente de ARNi de hebra doble que inhibe la expresión de un gen diana y que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido, una composición farmacéutica que comprende un agente de ARNi de hebra doble que inhibe la expresión de un gen diana y que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido, y/o medios para administrar el oligonucleótido de hebra simple, las composiciones farmacéuticas y/o el agente de ARNi de hebra doble (por ejemplo, un dispositivo para inyección, tal como una jeringa precargada), o medios para medir la inhibición de la actividad de iARN del agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNhd) que comprende un nucleótido térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido (por ejemplo, medios para medir la inhibición de gen diana ARNm, la proteína del gen diana, y/o la actividad del gen diana). Dichos medios para medir la inhibición de la actividad

de iARN pueden comprender medios para obtener una muestra de un sujeto, tal como, por ejemplo, una muestra de plasma. Los kits de la invención opcionalmente además pueden comprender medios para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz o la cantidad profilácticamente eficaz.

En determinadas formas de realización los componentes individuales de la formulación farmacéutica se pueden proveer en un recipiente, por ejemplo, un vial o una jeringa precargada. Como alternativa, puede ser deseable proveer los componentes de la formulación farmacéutica por separado en dos o más recipientes, por ejemplo, un recipiente para la preparación de un oligonucleótido de hebra simple y/o compuesto de ARNhd, y por lo menos otro para un compuesto vehículo. El kit se puede envasar en varias configuraciones diferentes tales como uno o más recipientes en una única caja. Los diferentes componentes se pueden combinar, por ejemplo, de acuerdo con las instrucciones provistas con el kit. Los componentes se pueden combinar de acuerdo con un método descrito en la presente, por ejemplo, para preparar y administrar una composición farmacéutica. El kit también puede incluir un dispositivo de administración.

Esta invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos que no deben considerarse limitantes. El contenido completo de todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas a lo largo de esta solicitud, así como el Listado de Secuencias informal y las Figuras, se incorporan a la presente a modo de referencia.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

En los siguientes Ejemplos se usaron los siguientes materiales y

métodos.

Cuando la fuente de un reactivo no se da específicamente en la presente, dicho reactivo se puede obtener de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular en una calidad/pureza estándar para su aplicación en biología molecular.

Ha de comprenderse que, a lo largo de la solicitud, un nombre de oligonucleótido sin ningún decimal es equivalente a un nombre de oligonucleótido con un decimal que simplemente hace referencia al número de lote del oligonucleótido. Por ejemplo, A-959917 es equivalente a A-959917.1.

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron, sintetizaron y prepararon mediante métodos conocidos en el arte.

En resumen, los oligonucleótidos se sintetizaron en escala de 1 µmol usando un sintetizador Mermade 192 (BioAutomation) con química de fosforamidita sobre soporte sólidos. El soporte sólido fue vidrio de poro controlado (500-1000 Å) cargado con un ligando GalNAc (conjugados de 3'-GalNAc) personalizado, soporte sólido universal (AM Chemicals), o el primer nucleótido de interés. Los reactivos auxiliares de síntesis y los monómeros estándar de 2-cianoetil fosforamidita (2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil, ARN, ADN, LNA) se obtuvieron de Thermo-Fisher (Milwaukee, WI), Hongene (China), o Chemgenes (Wilmington, MA, EE.UU.). Los monómeros adicionales de fosforamidita se obtuvieron de proveedores comerciales, se prepararon en forma casera o se obtuvieron usando síntesis personalizada a partir de varias CMO. Las fosforamiditas se prepararon a un concentración de 100 mM en acetonitrilo o 9:1 acetonitrilo:DMF y se acoplaron usando 5-etiltio-

1H-tetrazol (ETT, 0,25 M en acetonitrilo) con un tiempo de reacción de 400 s. Las uniones fosforotioato se generaron usando una solución 100 mM de 3-((dimetilamino-metiliden) amino)-3H-1,2,4-ditiazolo-3-tiona (DDTT, obtenida de Chemgenes (Wilmington, MA, EE.UU.)) en acetonitrilo anhidro/piridina (9:1 v/v). El tiempo de oxidación fue de 5 minutos. Todas las secuencias se sintetizaron con eliminación final del grupo DMT ("DMT-Off").

Al final de la síntesis en fase sólida, los oligorribonucleótidos en el soporte sólido se trataron con 300 µL de metilamina (40% acuosa) a temperatura ambiente en placas de 96 pocillos durante aproximadamente 2 horas para dar la escisión desde el soporte sólido y la subsiguiente eliminación de todos los grupos adicionales lábiles a las bases. Para las secuencias que contenían cualquier unión ribonucleotídica natural (2'-OH) protegida con un grupo ter-butil dimetil sililo (TBDMS), se realizó un segundo paso de desprotección usando TEA.3HF (trihidrofluoruro de trietilamina). A cada solución de oligonucleótido en metilamina acuosa se agregaron 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 300 µL de TEA.3HF y la solución se incubó durante aproximadamente 30 minutos a 60 °C. Después de la incubación, se dejó llegar la placa a temperatura ambiente y se precipitaron los oligonucleótidos crudos mediante agregado de 1 mL de 9:1 acetontrilo:etanol o 1:1 etanol:isopropanol. Luego se centrifugaron las placas a 4 °C durante 45 minutos y se decantó cuidadosamente el sobrenadante con la ayuda de una pipeta multicanal. Se resuspendió el pellet de oligonucleótido en NaOAc 20 mM y subsiguientemente se desaló usando una columna de exclusión por tamaño HiTrap (5 mL, GE Healthcare) en un sistema Agilent LC equipado con un automuestrador, detector UV, medidor de conductividad y recolector de fracciones. Se

recolectaron las muestras desaladas en placas de 96 pocillos y luego se analizaron por LC-MS y espectrometría UV para confirmar la identidad y cuantificar la cantidad de material, respectivamente.

Los oligonucleótidos a mayor escala se sintetizaron en un sintetizador MerMade-12 DNA/RNA a escalas de entre 50 y 200 µmol. Todos los solventes/reactivos de primera clase de Glen Research, los soportes sólidos de vidrio de poro controlado de 500-Å (CPG) de Prime Synthesis, las 2′-desoxi 3′-fosforamiditas de Thermo, y los 2′-OMe y 2′-F nucleósidos y las LNA 3′-fosforamiditas de Hongene se usaron en todos los casos tal como se recibieron. Se preparó el soporte de GalNAc CPG y se usó como se describió previamente (Nair y col, JACS 2014). Se adquirió acetonitrilo con bajo contenido de agua de EMD Chemicals. Se usó una solución de 0,6 M de 5-(S-etiltio)-1H-tetrazol en acetonitrilo como activador. Las soluciones de fosforamidita fueron 0,15 M en acetonitrilo anhidro con 15% de DMF como cosolvente para 2′-OMe uridina y citidina. El reactivo de oxidación fue I2 0,02 M en THF/piridina/agua. Se usó N,N-dimetil-N′-(3-tioxo-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)metanimidamida (DDTT), 0,09 M en piridina, como reactivo sulfurante. El reactivo de detritilación fue el ácido dicloroacético (DCA) al 3% en diclorometano (DCM).

Después de finalizar la síntesis en fase sólida, el soporte sólido de CPG se lavó con 5% (v/v) de piperidina en acetonitrilo anhidro tres veces con esperas de 5 minutos después de cada flujo. Luego se lavó el soporte con acetonitrilo anhidro y se secó con argón. Luego se incubaron los oligonucleótidos con entre 28 y 30% (p/v) de NH4OH, a 35 °C durante 20 h. Se recolectó el solvente por filtración, y se lavó el soporte con agua antes del

análisis. Se usaron soluciones de oligonucleótidos de aproximadamente 1 unidad de OD260/mL para el análisis de los productos crudos, y se inyectaron entre 30 y 50 µL de solución. La LC/ESI-MS se llevó a cabo en un sistema de LC/MS de cuadrupolo individual Agilent 6130 usando una columna XBridge C8 (2,1 × 50 mm, 2,5 µm) a 60 °C. La solución amortiguadora A consistió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol 200 mM y trietilamina 16,3 mM en agua, y la solución amortiguadora B fue de metanol al 100%. Se usó un gradiente de entre 0% y 40% de solución amortiguadora B en 10 min seguido por lavado y recalibración a una velocidad de flujo de 0,70 mL/min. La temperatura de la columna fue de 75 °C (Datos Suplementarios). Todos los oligonucleótidos se purificaron y se desalaron usando métodos previamente informados (Nair y col., JACS, 2014).

Selección in vitro en hepatocitos primarios de cinomolgo (PCH).

Transfección de ARNhd seguida de captación libre de REVERSIR.

Se transfectaron los PCH primero con ARNhd mediante el agregado de 4,9 µL de Opti-MEM plus 0,1 µL de Lipofectamine iRNAMAX (Invitrogen) a 5 µL de ARNhd 10 nM por pocillo en una placa de 384 pocillos Biocoat recubierta con colágeno I (Corning). Después de una incubación de 15 min a temperatura ambiente, se agregaron 40 µL de Medio E de William (Life Tech) con 5×10^3 células a la mezcla de ARNhd-Lipofectamina (concentración final de ARNhd 1 nM). Subsiguientemente se incubaron las células durante 4 horas, seguido por un lavado único con PBS, cambio de medio y agregado de 5 µL de moléculas de REVERSIR directamente a 45 µL de medio de William (a dosis finales en el rango entre 100 nM y 50 pM). Después de una incubación de 48 h, se lisaron

las células y se procesaron para aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y análisis por PCR cuantitativa.

Cotransfección de ARNhd y REVERSIR.

Se cotransfectaron los PCH con ARNhd y REVERSIR mediante la combinación de 4,8 µl de Opti-MEM, 0,2 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 5 µL de ARNhd y 5 µL de REVERSIR por pocillo en una placa de 384 pocillos Biocoat recubierta con colágeno I. Después de una incubación de 15 min a temperatura ambiente, se agregaron 35 µL de medio E de William (Life Tech) con 5×10^3 células a la mezcla de ARNhd-REVERSIR-Lipofectamina (concentraciones finales de ARNhd 1 nM y entre 100 y 0,4 pM de REVERSIR). Después de una incubación de 24 h, se lisaron las células y se procesaron para aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y análisis por PCR cuantitativa.

Transfecciones

La transfección se llevó a cabo mediante el agregado de 14,8 µl de Opti-MEM plus 0,2 µl de Lipofectamine iRNAMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA. # de catálogo 13778-150) sobre 5 µl de cada oligonucleótido a un pocillo individual en una placa de 96 pocillos. Luego se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se agregaron ochenta µl de medio de cultivo completo sin antibiótico con ~2 $x10^4$ células sobre la mezcla de ARNhd. Se incubaron las células durante 24 horas antes de la purificación del ARN.

Aislamiento de ARN total usando el kit de aislamiento de ARNm DYNABEADS (Invitrogen™, parte #: 610-12)

Se lisaron las células en 75 µl de solución amortiguadora de lisis/unión que contenía 3 µL de esferas por pocillo y se mezclaron durante 10 minutos en

un agitador electrostático. Los pasos de lavado se automatizaron en un Biotek EL406, usando un soporte magnético para placas. Se lavaron las esferas (en 90µL) una vez con solución amortiguadora A, una vez con solución amortiguadora B y dos veces con solución amortiguadora E, con pasos de aspiración intermedios. Después de la aspiración final, se agregaron 10 µL de mezcla completa para RT a cada pocillo, como se describe más adelante.

Síntesis de ADNc usando el kit de transcripción reversa de ADNc ABI High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, # de catálogo 4368813)

Se agregó una mezcla maestra de 1 µl de 10X solución amortiguadora, 0,4 µl de 25X dNTP, 1 µl de cebadores aleatorios, 0,5 µl de transcriptasa reversa, 0,5 µl de inhibidor de ARNasa y 6,6 µl de H_2O por reacción y por pocillo. Se sellaron las placas, se agitaron durante 10 minutos en un agitador electrostático y luego se incubaron a 37 grados C durante 2 horas. Después de esto, se agitaron las placas de 80 grados C durante 8 minutos.

PCR en tiempo real

Se agregaron dos microlitros (µl) de ADNc a una mezcla maestra que contenía 0,5 µl de sonda de TaqMan para GAPDH humano (4326317E), 0,5 µl de PNPLA3 humano, 2 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl de mezcla maestra para sondas Lightcycler 480 (Roche # de catálogo 04887301001) por pocillo en una placa de 384 pocillos (Roche # de catálogo 04887301001). La PCR en tiempo real se realizó en un sistema LightCycler480 Real Time PCR (Roche).

Estudio de AAV en ratones

Se transdujeron ratones con AAV serotipo 8 que expresaba AGT de humano (hAGT). 14 días después de la transducción en el Día 0 del estudio, se administró a los ratones solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o AD-

85481 a 3 mg/kg o 10 mg/kg por inyección subcutánea. En el Día 7 se administró a los ratones solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o A-762645.12 a 3 mg/kg, 10 mg/kg, o 30 mg/kg por inyección subcutánea. Se recolectaron muestras de suero en los Días 0, 7, 9,11, 14 y 21. La proteína AGT en suero se midió por ELISA.

Evaluación de compuestos REVERSIR en primates no humanos (NHP)

El objetivo del estudio fue determinar la farmacodinamia de los agentes reversos A-762645 y A-762722, después de la dosificación de AD-85481 a los monos.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos apropiados y sus modificaciones.

Los monos cinomolgos machos tenían, al inicio de la dosificación, entre 2,5 y 2,7 años de edad y pesaban entre 2,1 y 2,6 kg.

Las formulaciones de dosificación de AD-85481 se prepararon en cloruro de sodio al 0,9 % (solución salina normal) para alcanzar las concentraciones pretendidas. Las formulaciones se administraron a los animales apropiados por inyección subcutánea en el Día 1. Las formulaciones de dosificación de A-762645, A-762722, AF011-762645 y AF-011-762722 se prepararon en cloruro de sodio al 0,9 % (solución salina normal) para alcanzar las concentraciones pretendidas. Las formulaciones se administraron a los animales apropiados por inyección subcutánea o intravenosa en el Día 22.

Las soluciones de dosificación que contenían AD-85481, A-762645, y A-762722 estaban dentro del ± 15% de las concentraciones diana y confirmaron que las soluciones de dosificación contenían los Artículos de Prueba en el rango de concentración deseado. Los valores de osmolalidad para todas las

soluciones de dosificación estuvieron en el rango normal para su inyección.

Se recolectaron muestras de sangre entre el Día -1 hasta el Día 99 después de la dosis para evaluar las concentraciones de angiotensinógeno (AGT) en el suero. Todos los animales sobrevivieron hasta su liberación de la Colonia del Centro de Pruebas. No hubo variaciones relacionadas con los Artículos de Prueba en los signos clínicos, el peso corporal o la evaluación del consumo de alimento.

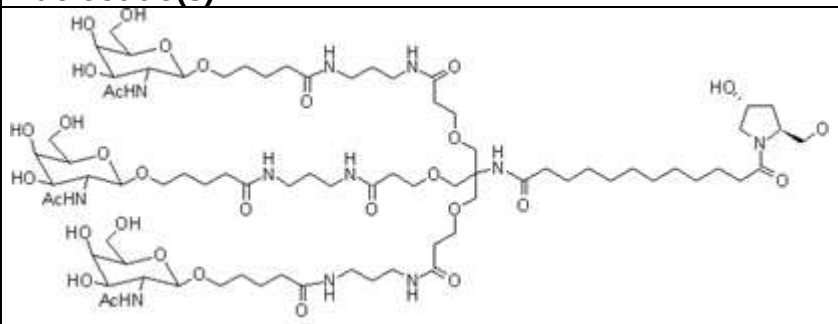
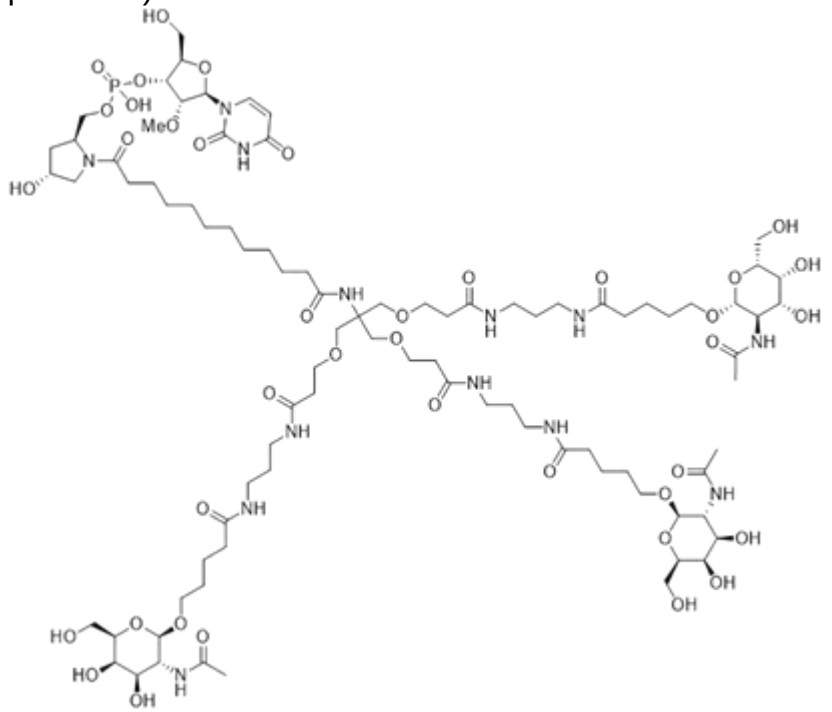
La administración única de AD-85481 en el Día 1 a 3 mg/kg por inyección subcutánea seguida por una dosis subcutánea de A-762645 o A-762722 a 1 o 3 mg o una dosis intravenosa de AF011-762645 o AF-011-762722 a 0,3 mg/kg en el Día 22 fue bien tolerada por los monos. El AD-85481 disminuyó los niveles circulantes de AGT y los agentes reversos (A 762645, A-762722, AF011-762645 y AF-011-762722) restituyeron los niveles de AGT en los monos.

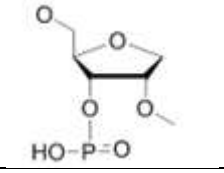
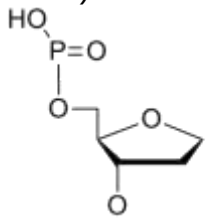
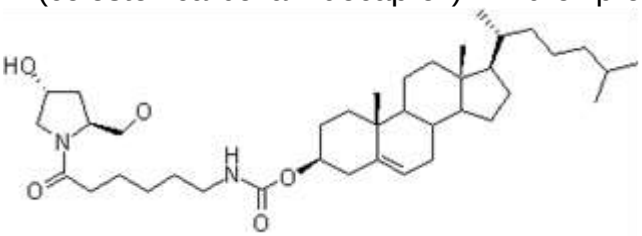
Tabla 1. Abreviaturas de monómeros nucleotídicos usados en la representación de las secuencias de ácidos nucleicos. Se comprenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están mutuamente unidos por enlaces 5'-3'-fosfodiéster; y se comprenderá que cuando el nucleótido contiene una modificación con 2'-flúor, entonces el flúor reemplaza al hidroxilo en esa posición en el nucleótido parental (es decir, es un 2'-desoxi-2'-fluoronucleótido). Además se comprenderá que las abreviaturas de nucleótidos en la tabla omiten el 3'-fosfato (es decir, son 3'-OH) cuando estos se colocan en la posición 3'-terminal de un oligonucleótido.

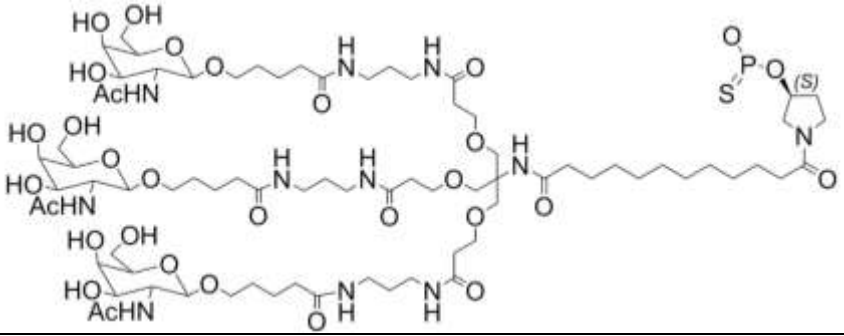
Abreviatura	**Nucleótido(s)**
A	Adenosin-3'-fosfato

Abreviatura	Nucleótido(s)
Ab	beta-L-adenosin-3`-fosfato
Abs	beta-L-adenosin-3`-fosforotioato
Af	2’-fluoroadenosin-3’-fosfato
Afs	2’-fluoroadenosin-3’-fosforotioato
As	adenosin-3’-fosforotioato
C	citidin-3’-fosfato
Cb	beta-L-citidin-3`-fosfato
Cbs	beta-L-citidin-3'-fosforotioato
Cf	2’-fluorocitidin-3’-fosfato
Cfs	2’-fluorocitidin-3’-fosforotioato
Cs	citidin-3’-fosforotioato
G	guanosin-3’-fosfato
Gb	beta-L-guanosin-3`-fosfato
Gbs	beta-L-guanosin-3`-fosforotioato
Gf	2’-fluoroguanosin-3’-fosfato
Gfs	2’-fluoroguanosin-3’-fosforotioato
Gs	guanosin-3’-fosforotioato
T	5’-metiluridin-3’-fosfato
Tf	2’-fluoro-5-metiluridin-3’-fosfato
Tfs	2’-fluoro-5-metiluridin-3’-fosforotioato
Ts	5-metiluridin-3’-fosforotioato
U	Uridin-3’-fosfato
Uf	2’-fluorouridin-3’-fosfato
Ufs	2’-fluorouridin-3’-fosforotioato

Abreviatura	Nucleótido(s)
Us	uridin-3’-fosforotioato
N	cualquier nucleótido, modificado o no modificado
a	2'-O-metiladenosin-3’-fosfato
as	2'-O-metiladenosin-3’- fosforotioato
c	2'-O-metilcitidin-3’-fosfato
cs	2'-O-metilcitidin-3’- fosforotioato
g	2'-O-metilguanosin-3’-fosfato
gs	2'-O-metilguanosin-3’- fosforotioato
t	2’-O-metil-5-metiluridin-3’-fosfato
ts	2’-O-metil-5-metiluridin-3’-fosforotioato
u	2'-O-metiluridin-3’-fosfato
us	2'-O-metiluridin-3’-fosforotioato
s	unión fosforotioato
L10	N-(colesterilcarboxamidocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-Col)
L96	N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol (Hyp-(GalNAc-alquil)3) (2S,4R)-1-[29-[[2-(acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosil]oxi]-14,14-bis[[3-[[3-[[5-[[2-(acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosil]oxi]-1-oxopentil]amino]propil]amino]-3-oxopropoxi]metil]-1,12,19,25-tetraoxo-16-oxa-13,20,24-triazanonacos-1-il]-4-hidroxi-2-hidroximetilpirrolidina

Abreviatura	Nucleótido(s)
	
uL96	2'-O-metiluridin-3'-fosfato ((2S,4R)-1-[29-[[2-(acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosil]oxi]-14,14-bis[[3-[[3-[[5-[[2-(acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosil]oxi]-1-oxopentil]amino]propil]amino]-3-oxopropoxi]metil]-1,12,19,25-tetraoxo-16-oxa-13,20,24-triazanonacos-1-il]-4-hidroxi-2-pirrolidinil)metil éster 
Y34	2-hidroximetil-tetrahidrofurano-4-metoxi-3-fosfato (2'-OMe furanosa abásica)

Abreviatura	**Nucleótido(s)**
	
Y44	ADN abásico invertido (2-hidroximetil-tetrahidrofurano-5-fosfato) 
L10	N-(colesterilcarboxamidocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-Col) 
(Agn)	Adenosin-ácido nucleico glicólico (GNA) Isómero S
(Cgn)	Citidin-ácido nucleico glicólico (GNA) Isómero S
(Ggn)	Guanosin-ácido nucleico glicólico (GNA) Isómero S
(Tgn)	Timidina-ácido nucleico glicólico (GNA) Isómero S
P	Fosfato
VP	Vinil-fosfonato
dA	2`-desoxiadenosin-3`-fosfato
dAs	2`-desoxiadenosin-3`-fosforotioato
dC	2`-desoxicitidin-3`-fosfato
dCs	2`-desoxicitidin-3`-fosforotioato
dG	2`-desoxiguanosin-3`-fosfato

Abreviatura	Nucleótido(s)
dGs	2`-desoxiguanosin-3`-fosforotioato
dT	2`-desoxitimidin-3`-fosfato
dTs	2`-desoxitimidin-3`-fosforotioato
dU	2`-desoxiuridina
dUs	2`-desoxiuridin-3`-fosforotioato
(C2p)	citidin-2`-fosfato
(G2p)	guanosin-2`-fosfato
(U2p)	uridin-2`-fosfato
(A2p)	adenosin-2`-fosfato
(Chd)	2'-O-hexadecil-citidin-3'-fosfato
(Ahd)	2'-O-hexadecil-adenosin-3'-fosfato
(Ghd)	2'-O-hexadecil-guanosin-3'-fosfato
(Uhd)	2'-O-hexadecil-uridin-3'-fosfato
Q191s	N-[tris(GalNAc-alquil)-amidododecanoil]-(S)-pirrolidin-3-ol-fosforotioato (p-C12-(GalNAc-alquil)3) 
(Aln)	2`-O,4’-C-metilen adenosin-3`-fosfato
(Alns)	2`-O,4’-C-metilen adenosin-3`-fosforotioato
(m5Cln)	2'-O,4'-C-metilen 5-metilcitidin-3'-fosfato
(m5Clns)	2'-O,4'-C-metilen 5-metilcitidin-3'-fosforotioato

Abreviatura	Nucleótido(s)
(Gln)	2`-O,4`-C-metilen guanosin-3`-fosfato
(Glns)	2`-O,4`-C-metilen guanosin-3`-fosforotioato
(Tln)	2`-O,4`-C-metilen timidina-3`-fosfato
(Tlns)	2`-O,4`-C-metilen timidina-3`-fosforotioato

Ejemplo 1. La inclusión de una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en un agente de ARNhd suprime la actividad inhibidora de los oligonucleótidos REVERSIR™

En los últimos años, los datos de seguridad y eficacia de varios estudios clínicos de investigación han demostrado el uso terapéutico de la interferencia por ARN (ARNi). Los agentes de ARN cortos de interferencia (ARNhd) que utilizan la vía endógena de ARNi y silencian potente y específicamente los ARNm, previniendo así la formación de proteínas implicadas en las vías de las enfermedades o causantes de enfermedades. La administración direccionada de terapéuticos de ARNi a los hepatocitos se consigue mediante la conjugación de ARNhd químicamente modificados a un ligando trivalente de N-acetilgalactosamina (GalNAc), que facilita su captación específica de tejido mediada por el receptor de asialoglicoproteínas (ASGPR). El desarrollo de agentes de ARNhd conjugados a un ligando GalNAc con una química de estabilización mejorada ha conducido a mejora sustanciales de eficacia y duración. En modelos animales preclínicos, así como en humanos, los agentes de ARNhd han demostrado una duración de acción impresionante después de una administración subcutánea única, con un potente silenciamiento sostenido durante varios meses. Con su duración de acción extendida, los terapéuticos de ARNi pueden beneficiarse de una tecnología que permite una rápida

reversión de la actividad de silenciamiento y que provee un control a medida sobre la farmacología basada en ARNi, un atributo deseado para los medicamentos de precisión personalizados.

Sin embargo, en algunos casos, un sujeto puede responder poco al tratamiento con un agente de ARNhd o recibir dosis demasiado altas. En dichos casos, podría administrarse un compuesto que revierta la actividad de silenciamiento por ARNi del agente de ARNhd para reducir por lo menos parcialmente la actividad de ARNi del agente de ARNhd. En otros casos, el efecto de larga duración de los ARNhd hace que el esperar la lenta disminución de ese efecto por depuración sea una opción poco atractiva.

La Publicación de Patente de los EE.UU. No. US 2017/0369872 y las Publicaciones PCT Nos. WO 2016/100716 y WO 2019/036612 (cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente a modo de referencia), describen los principios para el diseño de oligonucleótidos que revierten la actividad de silenciamiento por iARN de los agentes de ARNhd independientemente del ARNm diana. Estos oligonucleótidos, llamados REVERSIR, demostraron la reversión de la actividad de silenciamiento por iARN de los agentes de ARNhd conjugados a un ligando GalNAc *in vitro* e *in vivo* para así permitir el control y la regulación de la farmacología basada en ARNi.

Los GalNAc-REVERSIR se unen y se internalizan en una célula a través del receptor de asialoglicoproteínas (ASPGR) y se unen en forma irreversible a la hebra antisentido de un agente de ARNhd en un complejo RISC funcional. La unión del REVERSIR anula el reconocimiento de la diana de ARNm y la escisión por parte del agente de ARNhd.

Sin embargo, cuando se evaluaron estos REVERSIR, que demostraron inhibir el silenciamiento de los agentes de ARNhd conjugados a un ligando GalNAc, para estudiar su actividad con los agentes de ARNhd contra la misma región del ARNm y que comprenden de manera sustancial las mismas modificaciones nucleotídicas con la excepción de la inclusión de una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante [por ejemplo, un nucleótido abásico, un 2'-desoxi nucleótido, un nucleótido acíclico (por ejemplo, un ácido nucleico bloqueado (UNA), un ácido nucleico glicólico (GNA) o un (S)-ácido nucleico glicólico (S-GNA)), un nucleótido con unión 2'-5' (3'-ARN), un nucleótido de treosa (TNA), un 2' gem Me/F nucleótido o una falta de complementariedad con un nucleótido opuesto de la otra hebra, por ejemplo, opuesto a la región semilla de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-8 o 2-9 contando desde el extremo 5' terminal de la hebra antisentido) en la hebra antisentido], la actividad de los REVERSIR se vio anulada (Figuras 1A-1C). Solo cuando se alargaron los REVERSIR, por ejemplo, a aproximadamente 18 nucleótidos de longitud, y se administraron a una dosis de hasta 100 veces superior que la de los REVERSIR contra ARNhd no desestabilizados, los mismos fueron capaces de inhibir el silenciamiento de los agentes de ARNhd que comprenden una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante y que están conjugados a un ligando GalNAc (Figura 2). Sin embargo, incluso en el mejor de los casos, la inhibición de la actividad de silenciamiento de los REVERSIR fue aproximadamente entre 30 y 100 veces menos potente cuando había una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante presente en el agente de ARNhd en comparación con la inhibición de la actividad de silenciamiento de los

REVERSIR más óptimos sin ninguna modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante presente en el agente de ARNhd.

Teniendo en cuenta el requisito de una mayor dosis y de que los REVERSIR sean más largos así como de numerosas uniones fosforotioato y LNA para poder inhibir la actividad silenciadora de iARN de los agentes de ARNhd que comprenden una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido, se evaluaron, para el caso de los REVERSIR, los efectos inmunoestimulantes potenciales observados con los oligonucleótidos antisentido (ASO)), por ejemplo, la estimulación de citoquinas y quimoquinas (por ejemplo, IL-6, Il-8, MCP-1, niveles elevados de proteína C-reactiva (PCR), niveles elevados de IgM, e infiltración de células inmunológicas en los órganos.

Para disminuir la dosis de los REVERSIR, se formularon los oligonucleótidos en nanopartículas lipídicas, LNP, para su administración intravenosa a una dosis inferior o se rediseñaron para incluir menos LNA y/o uniones fosforotioato y se formularon en las LNP. Tal como se demuestra en la Figura 3A, la administración intravenosa de 0,3 mg/kg de un REVERSIR formulado en una LNP tiene de manera sustancial el mismo efecto inhibidor sobre la actividad silenciadora de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido, que la administración subcutánea de 3 mg/kg del mismo REVERSIR que comprende un ligando GalNAc. Tal como se demuestra en la Figura 3B, aunque los REVERSIR se formularon en LNP, la disminución de los LNA y/o de las uniones fosforotioato no brindó una estabilidad metabólica suficiente para que los REVERSIR inhiban eficazmente la actividad

silenciadora de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido.

Ejemplo 2. Identificación de oligonucleótidos que inhiben la actividad de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido

Como se describió anteriormente, se demostró que la inclusión de una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido de un agente de ARNhd anula la actividad inhibidora de los oligonucleótidos REVERSIR.

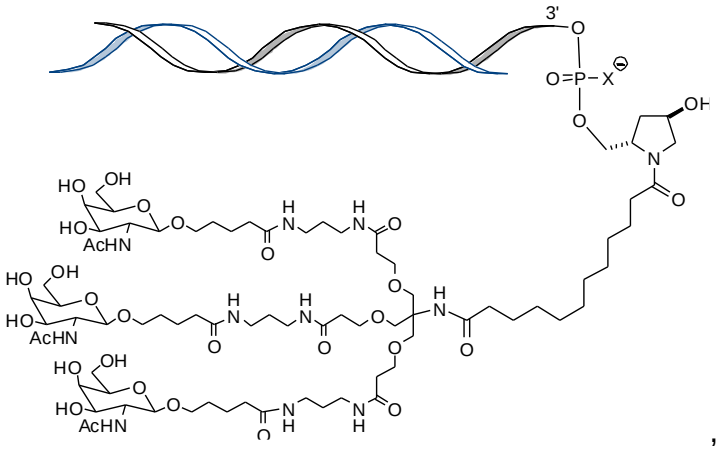
Actualmente se está investigando un agente de ARNhd que inhibe en forma potente y durable la expresión de angiotensinógeno (AGT), el AD-85481 (Zilebesiran; también llamado AGT-01) en un ensayo clínico de Fase II/III para el tratamiento de la hipertensión. El AD-85481 comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido. Las secuencias nucleotídicas de hebra sentido y antisentido modificadas y no modificadas del dúplex AD-85481 se muestran en la siguiente Tabla.

Secuencia nucleotídica no modificada y modificada del dúplex AD-85481

Hebra	**Sin modificar (5’ a 3’)**	**SEQ ID NO.**	**Modificado (5’ a 3’)**	**SEQ ID NO.**
Antisentido	UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA	9	usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa	11
Sentido	GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	10	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca	12

Las modificaciones químicas se definen de la siguiente manera: a es 2'-O-metiladenosin-3’-fosfato, c es 2'-O-metilcitidin-3’-fosfato, g es 2'-O-

metilguanosin-3’-fosfato, u es 2'-O-metiluridin-3’-fosfato, Af es 2’-fluoroadenosin-3’-fosfato, Cf es 2’-fluorocitidin-3’-fosfato, Gf es 2’-fluoroguanosin-3’-fosfato, Uf es 2’-fluorouridin-3’-fosfato, (Ggn) es guanosin-ácido nucleico glicólico (GNA), y s es unión fosforotioato. El extremo 3’ de la hebra sentido está conjugado a un ligando tal como se muestra en el siguiente esquema



, donde X es O.

Dada la potencia y la larga duración de la acción del AD-85481, es posible que algunos sujetos que se están tratando con el AD-85481 potencialmente puedan experimentar hipotensión recurrente, sintomática y persistente incluso con el uso de intervenciones convencionales para tratar la hipotensión, por ejemplo, fluidos/sal de la dieta aumentados, tratamiento con fludrocortisona/midodrina, fluidos intravenosos, medicamentos vasopresores y/o disminución de la dosis o interrupción de medicamentos antihipertensivos concomitantes. También es posible que algunos sujetos que se están tratando con el AD-85481 potencialmente puedan experimentar hiperpotasemia incluso con el uso de intervenciones convencionales para tratar la hiperpotasemia, por ejemplo, una dieta baja en potasio, medicamentos tiazida/diuréticos de asa, quelantes orales de potasio, calcio, glucosa, insulina y/o hemodiálisis. Además,

también es posible que algunos sujetos potencialmente puedan experimentar disfunción renal.

Teniendo en cuenta estos potenciales efectos de seguridad de la administración de AD-85481, sería beneficioso un tratamiento para revertir la inhibición de AGT por ARNi mediante AD-85481, tal como un REVERSIR de AD-85481.

En consecuencia, y usando el AD-85481 como sistema modelo de agentes de ARNhd que comprenden una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido, se diseñaron REVERSIR del AD-85481 y se evaluaron para ver su actividad *in vitro* mediante captación libre a una concentración final de 100 nM o 1000 nM y transfección a una concentración final de 1 nM o 10 nM en hepatocitos primarios de cinomolgo usando métodos estándar (descrito brevemente más adelante). En las Tablas 2-5 se proveen las secuencias nucleotídicas modificadas de los REVERSIR y los resultados del análisis *in vitro*.

Tal como se puede ver en las Tablas 2-5, numerosos REVERSIR de 22 miembros que comprenden 2 modificaciones de LNA inhibieron la actividad silenciadora de iARN de AD-85481 *in vitro*, aunque hubo una pérdida de potencia de los REVERSIR cuando se los evaluó mediante captación libre. Con respecto a los REVERSIR de 18 miembros que comprenden 2 modificaciones de LNA, hay inhibidores en general menos potentes en comparación con los REVERSIR de 22 miembros (Tabla 3) y los REVERSIR de 16 miembros fueron inhibidores menos potentes en comparación con los REVERSIR de 22 o de 18 miembros (Tabla 4).

Además, los datos demuestran que un LNA en la posición 2 (contando

desde el extremo 3’ terminal del REVERSIR) en combinación con un segundo LNA en la posición 6 o 14-16 (contando desde el extremo 3’ terminal del REVERSIR) en un REVERSIR de 22 miembros inhibió potentemente la actividad de AD-85481 (Tabla 2). Se observaron resultados similares con los REVERSIR de 18 miembros, aunque un LNA en la posición 2 (contando desde el extremo 3’ terminal del REVERSIR) en combinación con un segundo LNA en la posición 8 o 9 (contando desde el extremo 3’ terminal del REVERSIR) dieron los REVERSIR de 18 miembros más potentes (Tabla 3). Con respecto a los REVERSIR de 16 miembros, similarmente a los REVERSIR de 18 miembros, las modificaciones con LNA en la posición 2 (contando desde el extremo 3’ terminal del REVERSIR) en combinación con un segundo LNA en la posición 8, 9, 13, o 14 (contando desde el extremo 3’ terminal del REVERSIR) fueron las más potentes (Tabla 4). Con respecto a los REVERSIR que comprenden 5 modificaciones con LNA, tal como se ve en la Tabla 5, existe una dependencia clara con la longitud sobre la actividad inhibidora de los REVERSIR.

Los análisis demuestran que la inclusión de las modificaciones de LNA en las posiciones 2 y 6 (contando desde el extremo 3’ del oligonucleótido) tienen una buena actividad inhibidora de la actividad inhibidora de ARNi del AD-85481 en comparación con las posiciones 2 y 5, o 2 y 7 (contando desde el extremo 3’ del oligonucleótido). En algunos casos, por ejemplo, los REVERSIR de 18 miembros, las posiciones 2 y 8, y 2 y 9 muestran buena actividad inhibidora. Otras posiciones, 2 y 14, 2 y 15, o 2 y 16 también tienen buena actividad inhibidora.

Además, se mantuvo la actividad inhibidora de los REVERSIR para los oligonucleótidos de 22, 18 y 16 miembros, aunque los REVERSIR de 16 y 18

miembros no fueron tan potentes como los REVERSIR de 22 miembros. Además, los REVERSIR de 18 y de 16 miembros que comprenden 3 o 4 modificaciones de LNA tienen una actividad comparable a los REVERSIR de 18 y de 16 miembros que comprenden 5 modificaciones de LNA (Figuras 4A y 4B). Además, se demostró que los REVERSIR de 12 y de 9 miembros que comprenden cuatro o tres modificaciones de LNA no tuvieron actividad inhibidora.

Los 5 mejores REVERSIR inhibidores a partir de análisis *in vitro*, A-515518, A-515556, A-515559, A-515586, y A-515589, se seleccionaron y evaluaron para ver su actividad *in vivo* (Figura 5). En resumen, en al Día de predosis -21 se transdujeron ratones de tipo salvaje (C57BL/6) con 2 x 10^{11} partículas virales de un vector de virus adenoasociado 8 (AAV8) que codifica para AGT de humano mediante inyección intravenosa. Al día 0, se administró a los ratones por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481. Al Día 7, se administró a grupos de tres ratones por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg A-515518, A-515556, A-515559, A-515586, o A-515589, los dúplex con ligandos GalNAc, o se los administró por vía intravenosa con REVERSIR formulados en LNP A-515518, A-515556, A-515559, A-515586, o A-515589, o control de PBS.

En los Días 0, 7, 9, 11, y 14 se recolectaron muestras de suero. Al Día 14 se sacrificaron los animales, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizó mediante el método de RT-QPCR.

Se compararon los niveles de ARNm de AGT humano con un gen estándar interno, GAPDH y, tal como se muestra en las Figuras 6A y 6B, tanto

los REVERSIR conjugados con GalNAc como los REVERSIR formulados en LNP inhibieron en forma potente la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481, en donde el REVERSIR de 22 miembros (A-515518) tuvo la actividad más potente. Además, se observó que los REVERSIR formulados en LNP y los REVERSIR conjugados con GalNAc tuvieron un rápido inicio de acción, sin embargo, los REVERSIR formulados en LNP tuvieron menos durabilidad que los REVERSIR conjugados con GalNAc.

Tabla 2. REVERSIR para AGT con LNA de 22 miembros

		transfección de 24 horas de REVERSIR		transfección de 24 horas de REVERSIR		captación libre de 24 horas de REVERSIR		captación libre de 24 horas de REVERSIR			
		Dosis - Unidades		Dosis - Unidades		Dosis - Unidades		Dosis - Unidades			
		1 - nM		10 - nM		1000 - nM		100 - nM			
Conjuntos de REVERSIR	**REVERSIR**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**REVERSIR (5'-3')**	**Posición de LNA**
Conjunto de RVR de 22 miembros de un solo paso de LNA	A-515494.1	72,9	9,1	109,7	5,6	17,4	3,0	9,0	2,6	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	2
	A-515495.1	61,5	7,6	119,8	10,6	23,6	5,4	10,0	2,2	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgsasgsasgsus(Aln)(m5Cln)dAL96	3
	A-515496.1	55,8	4,3	100,4	8,4	27,2	8,0	10,7	1,6	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgsasgsasgs(Tln)as(m5Cln)dAL96	4
	A-515497.1	42,2	7,1	105,6	10,0	24,9	5,0	11,7	1,8	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgsasgsas(Gln)usas(m5Cln)dAL96	5
	A-515498.1	102,4	16,4	90,1	5,9	31,0	1,8	13,4	4,1	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgsasgs(Aln)gsusas(m5Cln)dAL96	6
	A-515499.1	21,2	3,6	74,6	11,5	20,3	4,7	11,9	2,4	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgsas(Gln)asgsusas(m5Cln)dAL96	7

	A-515500.1	16,2	0,9	79,2	17,0	25,3	2,3	10,8	3,3	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgs(Aln)gsasgsusas(m5Cln)dAL96	8
	A-515501.1	15,3	3,1	51,2	5,4	17,2	2,8	12,7	2,5	uscsgsuscsasuscscsascsasasus(Gln)asgsasgsusas(m5Cln)dAL96	9
	A-515502.1	14,3	1,8	63,7	26,3	15,6	1,9	11,8	6,2	uscsgsuscsasuscscsascsasas(Tln)gsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	10
	A-515503.1	12,2	2,1	50,8	10,8	14,2	3,1	11,7	3,3	uscsgsuscsasuscscsascsas(Aln)usgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	11
	A-515504.1	13,8	2,7	66,4	4,6	20,0	4,8	11,8	1,9	uscsgsuscsasuscscsascs(Aln)asusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	12
	A-515505.1	15,4	3,3	63,8	12,7	23,3	7,6	9,7	1,7	uscsgsuscsasuscscsas(m5Cln)asasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	13
	A-515506.1	86,1	9,6	115,3	8,9	32,9	3,0	10,2	2,5	uscsgsuscsasuscscs(Aln)csasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	14
	A-515507.1	74,8	9,1	119,9	3,7	32,3	2,9	13,1	1,4	uscsgsuscsasuscs(m5Cln)ascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	15
	A-515508.1	45,0	5,2	112,9	8,6	32,7	5,3	12,0	2,9	uscsgsuscsasus(m5Cln)csascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	16
	A-515509.1	24,2	2,6	86,0	10,2	25,2	4,7	10,3	1,3	uscsgsuscsas(Tln)cscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	17
	A-515510.1	21,6	3,8	70,5	8,0	23,8	4,0	10,7	3,3	uscsgsuscs(Aln)uscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	18
	A-515511.1	18,4	4,4	73,1	6,2	33,0	7,9	11,2	1,1	uscsgsus(m5Cln)asuscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	19

	A-515512.1	11,5	1,0	59,6	9,5	21,8	2,2	11,1	2,5	uscsgs(Tln)csasuscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	20
	A-515513.1	10,2	0,9	53,7	4,6	22,1	3,0	13,5	3,4	uscs(Gln)uscsasuscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	21
	A-515514.1	15,0	2,0	55,6	3,8	23,1	2,3	12,0	1,9	us(m5Cln)gsuscsasuscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	22
	A-515515.1	9,8	2,6	30,5	0,7	11,5	3,0	11,2	2,8	(Tln)csgsuscsasuscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	23
ARNhd contra AGT solo	AD-85481	5,4	1,1	6,1	0,3	6,2	0,9	5,8	0,8		

Tabla 3. REVERSIR para AGT con LNA de 18 miembros

		transfección de 24 horas de REVERSIR		**transfección de 24 horas de REVERSIR**		**captación libre de 24 horas de REVERSIR**		**captación libre de 24 horas de REVERSIR**			
		Dosis - Unidades		**Dosis - Unidades**		**Dosis - Unidades**		**Dosis - Unidades**			
		1 - nM		**10 - nM**		**1000 - nM**		**100 - nM**			
Conjunto de REVERSIR	**REVERSIR**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**REVERSIR (5'-3')**	**Posición de LNA**
Conjunto de RVR de 18	A-515536.1	7,1	1,4	17,5	2,8	10,6	2,6	8,3	1,6	csasuscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	2
	A-515537.1	7,4	0,9	29,4	5,4	15,5	3,0	10,8	3,6	csasuscscsascsasasusgsasgsasgsus(Aln)(m5Cln)dAL96	3

miembros de un solo paso de LNA	A-515538.1	9,0	1,1	29,2	4,2	13,7	1,6	9,4	2,9	csasuscscsascsasasusgsasgsasgs(Tln)as(m5Cln)dAL96	4
	A-515539.1	11,2	1,6	37,4	6,0	20,4	1,7	13,3	3,5	csasuscscsascsasasusgsasgsas(Gln)usas(m5Cln)dAL96	5
	A-515540.1	17,9	4,0	64,8	14,7	25,3	4,2	13,5	3,0	csasuscscsascsasasusgsasgs(Aln)gsusas(m5Cln)dAL96	6
	A-515541.1	14,0	1,8	52,9	4,7	12,8	3,9	15,3	3,5	csasuscscsascsasasusgsas(Gln)asgsusas(m5Cln)dAL96	7
	A-515542.1	77,4	2,7	109,3	9,0	33,5	7,1	18,5	4,7	csasuscscsascsasasusgs(Aln)gsasgsusas(m5Cln)dAL96	8
	A-515543.1	45,6	8,1	89,5	6,2	21,7	3,2	11,5	1,7	csasuscscsascsasasus(Gln)asgsasgsusas(m5Cln)dAL96	9
	A-515544.1	25,6	2,8	64,2	8,5	19,3	3,5	11,8	2,9	csasuscscsascsasas(Tln)gsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	10
	A-515545.1	17,2	3,6	45,9	7,3	21,5	4,0	10,9	1,9	csasuscscsascsas(Aln)usgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	11
	A-515546.1	17,3	4,6	47,2	7,0	22,5	4,9	12,6	2,3	csasuscscsascs(Aln)asusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	12
	A-515547.1	15,0	3,6	52,0	6,3	26,0	1,6	13,4	2,7	csasuscscsas(m5Cln)asasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	13
	A-515548.1	13,3	1,1	46,9	6,8	21,5	3,2	15,5	5,7	csasuscscs(Aln)csasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	14
	A-515549.1	14,7	1,2	54,6	9,5	22,7	0,8	14,2	2,6	csasuscs(m5Cln)ascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	15
	A-515550.1	11,8	1,6	45,0	6,4	19,4	3,1	13,2	4,8	csasus(m5Cln)csascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	16
	A-515551.1	11,9	0,5	39,4	5,7	22,8	5,0	13,2	1,6	csas(Tln)cscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	17
	A-515552.1	15,0	2,4	46,8	8,8	19,7	9,2	16,1	4,7	cs(Aln)uscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	18
	A-515553.1	15,3	1,3	40,3	8,6	13,2	2,9	12,1	2,3	(m5Cln)asuscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	19

Tabla 4. REVERSIR para AGT con LNA de 16 miembros

		transfección de 24 horas de REVERSIR	**transfección de 24 horas de REVERSIR**	**captación libre de 24 horas de REVERSI™**	**captación libre de 24 horas de REVERSIR**		
		Dosis -	**Dosis -**	**Dosis -**	**Dosis -**		

		Unidades		Unidades		Unidades		Unidades			
		1 - nM		10 - nM		1000 - nM		100 - nM			
Conjunto de REVERSIR	**REVERSIR**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**prom**	**SD**	**REVERSIR (5'-3')**	**Posición de LNA**
Conjunto de RVR de 16-meres de un solo paso de LNA	A-515565.1	6,5	1,0	12,9	2,1	4,1	1,2	10,3	2,3	uscscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	2
	A-515566.1	6,7	0,9	13,0	2,5	7,3	0,4	6,4	1,3	uscscsascsasasusgsasgsasgsus(Aln)(m5Cln)dAL96	3
	A-515567.1	5,8	0,8	12,8	1,9	5,7	1,3	7,6	2,8	uscscsascsasasusgsasgsasgs(Tln)as(m5Cln)dAL96	4
	A-515568.1	7,2	1,3	16,5	1,1	7,1	1,4	8,3	2,3	uscscsascsasasusgsasgsas(Gln)usas(m5Cln)dAL96	5
	A-515569.1	11,1	1,7	48,2	5,1	13,9	1,5	11,6	2,4	uscscsascsasasusgsasgs(Aln)gsusas(m5Cln)dAL96	6
	A-515570.1	7,2	0,9	20,9	5,8	7,6	2,1	12,2	0,9	uscscsascsasasusgsas(Gln)asgsusas(m5Cln)dAL96	7
	A-515571.1	8,7	0,4	30,4	1,5	8,1	1,4	9,5	1,6	uscscsascsasasusgs(Aln)gsasgsusas(m5Cln)dAL96	8
	A-515572.1	32,2	2,2	55,6	7,1	4,4	0,8	4,8	0,4	uscscsascsasasus(Gln)asgsasgsusas(m5Cln)dAL96	9
	A-515573.1	23,4	4,7	32,3	3,2	4,5	0,6	6,7	2,8	uscscsascsasas(Tln)gsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	10
	A-515574.1	16,3	2,0	22,7	2,7	6,3	0,6	6,7	4,2	uscscsascsas(Aln)usgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	11
	A-515575.1	14,4	2,3	25,5	2,0	8,2	0,7	7,4	1,9	uscscsascs(Aln)asusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	12
	A-515576.1	14,5	3,7	31,0	3,2	10,8	1,4	8,4	3,3	uscscsas(m5Cln)asasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	13
	A-515577.1	10,0	2,5	21,9	1,9	10,7	1,0	6,1	1,2	uscscs(Aln)csasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	14
	A-515578.1	11,3	0,6	29,3	2,8	13,5	2,0	6,3	2,9	uscs(m5Cln)ascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	15
	A-515579.1	7,9	0,8	22,9	0,9	10,3	1,1	9,5	3,8	us(m5Cln)csascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	16
	A-515580.1	7,0	0,5	16,9	4,3	6,6	0,4	9,8	3,3	(Tln)cscsascsasasusgsasgsasgsusas(m5Cln)dAL96	17

Tabla 5. REVERSIR para AGT con cinco LNA

		transfección de 24 horas de REVERSIR		transfección de 24 horas de REVERSIR		
		Dosis - Unidades		Dosis - Unidades		
		1 - nM		10 - nM		
Conjuntos de REVERSIR	REVERSIR	prom	SD	prom	SD	REVERSIR
Conjunto de RVR de 22 miembros - 5 LNA	A-515516.1	33,3	8,1	113,0	7,3	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515517.1	20,5	4,4	101,9	18,2	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)as(Gln)(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515518.1	107,9	7,2	126,7	8,0	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)(Aln)gsus(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515519.1	88,6	6,9	119,6	5,7	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)as(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515520.1	72,7	12,1	109,7	7,2	uscsgsuscsasuscscsascsasasusgsas(Gln)(Aln)(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515521.1	40,6	4,5	101,2	11,8	uscsgsuscsasuscs(m5Cln)(Aln)csasasusgsasgsas(Gln)(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515522.1	48,9	9,7	96,8	7,4	uscsgsuscsasuscs(m5Cln)(Aln)csasasusgsasgs(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515523.1	30,2	7,3	91,0	8,1	uscsgsuscsasuscs(m5Cln)(Aln)csasasusgsas(Gln)as(Gln)usas(m5Cln)dAL96
	A-515524.1	19,5	5,7	77,9	7,4	uscsgsuscsasus(m5Cln)cs(Aln)csasasusgsasgsas(Gln)(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515525.1	25,2	6,8	87,2	16,0	uscsgsuscsasus(m5Cln)cs(Aln)csasasusgsasgs(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515526.1	21,9	1,5	86,5	7,1	uscsgsuscsasus(m5Cln)cs(Aln)csasasusgsas(Gln)as(Gln)usas(m5Cln)dAL96
	A-515527.1	16,8	4,9	73,3	15,2	uscsgsuscsasuscs(m5Cln)as(m5Cln)asasusgsasgsas(Gln)(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515528.1	28,3	8,5	91,8	11,9	uscsgsuscsasuscs(m5Cln)as(m5Cln)asasusgsasgs(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515529.1	27,6	4,5	117,0	20,8	uscsgsuscsasuscs(m5Cln)as(m5Cln)asasusgsas(Gln)as(Gln)usas(m5Cln)dAL96

Conjunto de RVR de 18 miembros - 5 LNA	A-515554.1	88,3	4,0	108,2	7,0	csasuscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515555.1	69,1	5,5	102,7	12,0	csasuscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)as(Gln)(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515556.1	79,4	2,0	105,9	9,4	csasuscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)(Aln)gsus(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515557.1	50,8	6,3	97,2	6,9	csasuscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)as(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515558.1	41,8	4,2	84,7	7,1	csasuscscsascsasasusgsas(Gln)(Aln)(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
Conjunto de RVR de 16 miemmbros - 5 LNA	A-515581.1	24,3	2,5	63,4	8,1	uscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515582.1	11,4	2,6	31,2	4,1	uscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)as(Gln)(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515583.1	18,1	3,4	74,4	3,7	uscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)(Aln)gsus(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515584.1	63,6	3,2	94,3	10,6	uscscsascsasasusgs(Aln)(Gln)as(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515585.1	55,1	3,7	88,4	1,6	uscscsascsasasusgsas(Gln)(Aln)(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
Conjunto de RVR de 12 miembros - 5 LNA	A-515604.1	22,2	3,9	46,8	1,8	csasasusgs(Aln)(Gln)(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515605.1	11,0	2,0	12,9	1,2	csasasusgs(Aln)(Gln)as(Gln)(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515606.1	11,1	1,7	23,1	1,9	csasasusgs(Aln)(Gln)(Aln)gsus(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515607.1	8,6	2,3	13,0	1,5	csasasusgs(Aln)(Gln)as(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515608.1	7,1	1,1	16,5	1,0	csasasusgsas(Gln)(Aln)(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
Conjunto de RVR de 9 miembros - 5 LNA	A-515627.1	30,0	5,3	57,8	4,8	usgs(Aln)(Gln)(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515628.1	11,3	4,7	15,5	0,6	usgs(Aln)(Gln)as(Gln)(Tln)as(m5Cln)dAL96
	A-515629.1	12,7	2,0	38,0	3,6	usgs(Aln)(Gln)(Aln)gsus(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515630.1	8,0	2,1	20,2	2,7	usgs(Aln)(Gln)as(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96
	A-515631.1	7,9	1,5	15,8	1,3	usgsas(Gln)(Aln)(Gln)us(Aln)(m5Cln)dAL96

Ejemplo 3. REVERSIR adicionales que inhiben la actividad de iARN de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante de la hebra antisentido

Como se describió en el Ejemplo 2, se diseñaron REVERSIR que inhiben la actividad de interferencia por ARNi de un agente de ARNhd que comprende una modificación nucleotídica térmicamente desestabilizante en la hebra antisentido, es decir, AD-85481, se sintetizaron y se evaluaron para estudiar la actividad *in vitro* e *in vivo*. Notablemente, sin embargo, aunque los REVERSIR mostraron buena actividad mediante transfección, presentaron una baja actividad mediante captación libre.

En consecuencia, se diseñaron otros noventa y siete REVERSIR de 15, 16 y 18 miembros que comprenden 4 o 5 modificaciones de LNA, se sintetizaron y se evaluaron para estudiar la actividad *in vitro* para inhibir la actividad de interferencia por ARNi de AD-85481 mediante captación libre a una concentración final de 100 nM o 1000 nM y mediante transfección a una concentración final de 1 nM o 10 nM en hepatocitos primarios de cinomolgo usando métodos estándar.

Los resultados demostraron que una significativa mayoría de los REVERSIR tuvo actividad mediante transfección y mediante captación libre en comparación con los REVERSIR que se diseñaron, se sintetizaron y se ensayaron en el Ejemplo 2.

Los REVERSIR de mejor desempeño que se identificaron en los análisis *in vitro*, A-762636, A-762655, A-762680, A-762689, A-762722, y A-762645, se ensayaron para estudiar la actividad *in vivo* como se describe en el Ejemplo 3. En la Figura 7A y la Tabla 6 se proveen las secuencias nucleotídicas

modificadas de estos REVERSIR.

En resumen, al Día de predosis -21 se transdujeron ratones de tipo salvaje (C57BL/6) con 2 x 10^{10} partículas virales de un vector de virus adenoasociado 8 (AAV8) que codifica para AGT de humano mediante inyección intravenosa. Al día 0, se administró a los ratones por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481. Al Día 7 se administró a grupos de tres ratones por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg de A-762636, A-762655, A-762680, A-762689, A-762722, y A-762645 (dúplex conjugados con GalNAc), o control de PBS.

En los Días 0, 7, 9, 11, y 14, se recolectaron muestras de suero. Los animales se sacrificaron al Día 14 y se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizó mediante el método de RT-QPCR.

Se compararon los niveles de ARNm de AGT humano con un gen estándar interno, GAPDH y como se muestra en la Figura 7B los REVERSIR inhibieron en forma potente la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481.

En un grupo de experimentos *in vivo* por separado, al Día de predosis -21 se transdujeron ratones de tipo salvaje (C57BL/6) con 2 x 10^{10} partículas virales de un vector de virus adenoasociado 8 (AAV8) que codifica para AGT de humano mediante inyección intravenosa. Al día 0, se administró a los ratones por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481. Al Día 7 se administró a grupos de tres ratones por vía subcutánea una dosis individual de 1 mg/kg o 3 mg/kg de los REVERSIR A-762645, A-762689, o A-762722 (dúplex conjugados con GalNAc) (mostrado en la Figura 8A y la Tabla 6), o control de PBS.

Se recolectaron muestras de suero en los Días 0, 7, 9, 11, y 14. Al Día 14, se sacrificaron los animales, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizó mediante el método de RT-QPCR.

Se compararon los niveles de ARNm de AGT humano con un gen estándar interno, GAPDH y, tal como se muestra en las Figuras 8B, los REVERSIR de 15, 16 y 18 miembros inhibieron en forma potente la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481, en donde los REVERSIR de 15 y de 18 miembros, A-762722 y A-762645, tuvieron la actividad más potente.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se ensayaron A-762722 y A-762645 para estudiar la actividad en primates no humanos. El diseño del estudio se representa en la Figura 9. En resumen, se administró a los primates no humanos por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481 al Día 0. Al Día 22, se administró a grupos de 3 animales por vía subcutánea una dosis individual de 1 mg/kg o 3 mg/kg de A-762722 o A-762645 (dúplex conjugados con GalNAc), o se administró por vía intravenosa una dosis individual de 0,3 mg/kg de A-762722 o A-762645 formulados en LNP, o control de PBS. En los intervalos indicados, se recolectaron muestras de suero y se analizó el nivel de ARNm de AGT mediante el método de RT-QPCR.

Tal como se representa en las Figuras 10A y 10B, la molécula de 18 miembros, A-762645, revirtió en forma eficaz la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481. Tal como se observó en los ratones, tanto los REVERSIR formulados en LNP administrados por vía intravenosa como los REVERSIR conjugados con GalNAc administrados por vía subcutánea tuvieron un rápido inicio de acción, sin embargo, los REVERSIR formulados en LNP tuvieron

menos durabilidad que los REVERSIR conjugados con GalNAc administrados por vía subcutánea. Además, como también se observó en los ratones, el A-762645 fue eficaz con una dosis 1:1 de REVERSIR: AD-85481.

Se diseñaron y sintetizaron otros REVERSIR de 18 miembros con menos uniones fosforotioato que los REVERSIR más eficaces y durables, A-762645, para minimizar el riesgo de baja seguridad. Las secuencias nucleotídicas modificadas de un subgrupo de estos REVERSIR se proveen en la Figura 11A y se muestran en la Tabla 6.

Estos REVERSIR se ensayaron *in vivo* como se describió precedentemente.

Al Día de predosis -21 se transdujeron ratones de tipo salvaje (C57BL/6) con 2 x 10^{10} partículas virales de un vector de virus adenoasociado 8 (AAV8) que codifica para AGT de humano mediante inyección intravenosa. Al día 0, se administró a los ratones por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481. Al Día 7 se administró a grupos de tres ratones por vía subcutánea una dosis individual de 1 mg/kg o 3 mg/kg de los REVERSIR A-762645, A-809917, A809918, A-809919, A-809920, A-809921, A-809922, A-809923, A-809924, A809924, o A-809925 (dúplex conjugados con GalNAc), o control de PBS.

En los Días 0, 7, 9, 11, y 14 se recolectaron muestras de suero. Al Día 21 se sacrificaron los animales, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizaron los niveles de ARNm de AGT de humano mediante el método de RT-QPCR.

Se compararon los niveles de ARNm de AGT humano con un gen

estándar interno, GAPDH y se demostró que todos los REVERSIR fueron similarmente eficaces para inhibir la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481, dentro y entre todas las cohortes de ratones tratados (Figura 11B).

En conjuntos de experimentos separados, se transdujeron ratones con 2 x 10^{11} partículas virales de un vector de virus adenoasociado 8 (AAV8) que codifica para AGT de humano mediante inyección intravenosa. Al día 0, se administró a los ratones por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481. Al Día 7 se administró a grupos de tres ratones por vía subcutánea una dosis individual de 1 mg/kg o 3 mg/kg de los REVERSIR A-762645, A809918, A-809925, A2423818, o A2423819 (dúplex conjugados con GalNAc) (Figura 12A), o control de PBS.

En los Días 0, 7, 9, 11, 14, y 21 se recolectaron muestras de suero. Al Día 21 se sacrificaron los animales, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizó mediante el método de RT-QPCR.

Los resultados de un conjunto de experimentos se presentan en la Figura 12B y los resultados de otro conjunto de experimentos se presentan en la Figura 12C. Los datos demuestran que todos los REVERSIR ensayados consiguieron por lo menos algo de inhibición de la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481 con una reversión casi completa de la actividad inhibidora de AD-85481 para los REVERSIR de 18 miembros que comprenden 14 o 10 uniones fosforotioato, A-762645 y A-809918, y el REVERSIR de 22 miembros que comprende 8 uniones fosforotioato, A-2423818. El efecto de reversión, sin embargo, se pierde con una reducción de las uniones fosforotioato a través de los REVERSIR de 18 miembros (es decir, A-809925) pero se puede comenzar

con un incremento de la longitud, por ejemplo, hasta un REVERSIR de 22 miembros, tal como se ejemplifica para el REVERSIR de 22 miembros, A-2423818 que comprende 8 uniones fosforotioato. Los datos también demuestran una respuesta a la dosis para cada uno de los REVERSIR ensayados.

En resumen, se identificaron REVERSIR capaces de revertir en forma completa la actividad inhibidora de ARNi del AD-85481 en ratones y se demostró que son eficaces en primates no humanos. También se demostró que el número de uniones fosforotioato de estos REVERSIR se puede reducir sin afectar la eficacia y se observó la reversión más eficaz con los REVERSIR que comprenden 14, 10, y 6 uniones fosforotioato.

Ejemplo 4. Efecto de los REVERSIR en primates no humanos y análisis de seguridad y toxicidad de los REVERSIR

Los REVERSIR que se demostró que son capaces de inhibir la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481 que se describen en el Ejemplo 3, A-762645, A-809918, A-809925, y A-2423818, se ensayaron para estudiar su eficacia en primates no humanos. Al Día 0, se administró a primates no humanos hembra por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481. Al Día 21, se administró a los primates (n=3) por vía subcutánea una dosis individual de 3 mg/kg A-762645, A-809918, A-809925, o A-2423818 (dúplex conjugados con GalNAc). Se recolectaron muestras de suero en los Días -7, -14, 0, 3, 7, 14, 21, 22, 23, 24, 25, y 28. Se extrajo el ARNm de suero y se analizó mediante el método de RT-QPCR.

Tal como se representa en las Figuras 13A-13C todos los REVERSIR revirtieron la inhibición de AD-85481, donde A-762645 consiguió un 10% de

reversión de los niveles de AGT en suero 2 días después de la administración y a una proporción de AD-85481:REVERSIR de 1:1, una característica clínica deseable.

Se ensayó además a A-762645, A-809918, A-809925, y A-2423818 para estudiar la seguridad y toxicidad. En particular, en un ensayo de transfección en sangre entera humana diluida (24 horas de incubación), no hubo respuestas proinflamatorias (Figura 14A) para ninguno de los REVERSIR y no hubo respuestas proinflamatorias similares a los oligonucleótidos antisentido en un ensayo de sangre humana entera de 6 horas (Figura 14B) para ninguno de los REVERSIR. Además, en los primates no humanos los recuentos de plaquetas y los recuentos de células sanguíneas totales estuvieron dentro del rango normal a lo largo del estudio anterior para todos los REVERSIR (Figura 14C).

Además, en un modelo de toxicidad en rata, la administración de una dosis única de 30 mg/kg o 100 mg/kg de A-762645, A-809918, o A-809925 no resultó en ningún signo clínico, cambio en órganos o de peso corporal, hallazgo macroscópico o cambio de peso de órganos ni cambio patológico clínico. La histopatología de hígado, riñón, sitio de administración y glándulas adrenales estuvo dentro de los rangos normales.

Ejemplo 5. Efecto de los REVERSIR en primates no humanos y análisis farmacológico de los REVERSIR

Se ensayó el REVERSIR A-762645 para estudiar su eficacia en primates no humanos. Al Día 0, se administró por vía subcutánea a primates no humanos hembra (n=3) una dosis individual de 3 mg/kg de AD-85481. Al Día 22, se administró una dosis subcutánea de A-762645 a 1 mg/kg o 3 mg/kg o una dosis intravenosa de AF011-762645 (A-762645 en una formulación de

LNP) a 0,3 mg/kg. Se recolectaron muestras de suero en los Días -7, 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 y 98. Se extrajo el ARNm de suero y se analizó mediante el método de RT-QPCR.

Tal como se representa en la Figura 15A, el uso de una proporción incrementada de REVERSIR (RVR)/ARNhd o el uso de una formulación de LNP demostró una mejor cinética de reversión. El REVERSIR formulado en LNP consiguió una cinética más rápida pero la reversión del silenciamiento de AGT no fue durable tal como se observa para la forma con GalNAc del REVERSIR. Además, como se muestra en la Figura 13A, el A-762645 mostró el perfil farmacodinámico más favorable para revertir el silenciamiento mediado por AD-85481 (Zilebesiran) en el AGT.

En un estudio adicional, al Día 0, se administró a primates no humanos hembra por vía subcutánea una dosis individual de 10 mg/kg de AD-85481 (equivalente a una dosis de aproximadamente 600 mg en un sujeto humano). Al Día 22, se administró por vía subcutánea a los primates una dosis única de 10 mg/kg (n=2); una dosis única de 30 mg/kg; o una dosis dividida de 30 mg/kg (dividida en tres dosis de 10 mg/kg cada una a intervalos de 24 horas), del REVERSIR conjugado con GalNAc A-762645; o PBS como control. Se recolectaron muestras de suero en los Días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 y 98. Se extrajo el ARNm de suero y se analizó mediante el método de RT-QPCR.

Tal como se representa en la Figura 15B, el A-762645 resultó en una farmacología potente y durable después de la dosificación del AD-85481 (Zilebesiran) en primates no humanos. Además, la dosificación dividida (3 dosis de 10 mg/kg cada una a intervalos de 24 horas) al mayor nivel de dosis mejoró

la farmacodinamia del REVERSIR en comparación con una dosis única, mientras que una dosificación dividida de dosis inferiores no mejoró la farmacodinamia del REVERSIR en comparación con una dosis única (datos no mostrados), lo que sugiere que se alcanza un estado de saturación a dosis altas, probablemente debido a la disponibilidad de receptor en un momento dado.

En un estudio adicional, al Día 22, se administró a los primates una dosis única de 10 mg/kg, 20 mg/kg, o 30 mg/kg del REVERSIR A-762645 conjugado con GalNAc por vía subcutánea o A-762645 formulado con LNP por vía intravenosa. Se recolectaron muestras de suero en los Días 22, 23, 24, 25, 26, 29, y 36. Se extrajo el ARNm de suero y se analizó mediante el método de RT-QPCR. Tal como se representa en la Figura 15C, la administración subcutánea del REVERSIR demostró un mejor perfil farmacodinámico en relación con la administración intravenosa del REVERSIR para todos los niveles de dosis. En particular, la administración por vía subcutánea de REVERSIR en primates no humanos resultó en una reversión más rápida del silenciamiento de AGT en comparación con la infusión intravenosa del REVERSIR.

Ejemplo 6. Efecto del REVERSIR A-762645 en modelos de ratones humanizados

Se seleccionó al A-762645 y se evaluó para ver su actividad *in vivo* en diferentes modelos de ratones humanizados. En un primer estudio, se evaluó la eficacia de A-762645 en un modelo de ratón hAGT-AAV pretratado con AD-85481 (Zilebesiran). Se expresó el gen de AGT humano en los hepatocitos de los ratones mediante transducción con el virus AAV8 específico para hígado. Al

día 0, se administró a los ratones por vía subcutánea una dosis única de 3 mg/kg (Figura 16A) o de 10 mg/kg (Figura 16B) de AD-85481. Al Día 7, se administró a grupos de tres ratones por vía subcutánea una dosis única de 3 mg/kg, 10 mg/kg, o 30 mg/kg del REVERSIR A-762645 conjugado con GalNAc; o control de PBS.

En los Días 0, 7, 9, 11, 14, y 21 se recolectaron muestras de suero. Al Día 21 se sacrificaron los animales, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizó mediante el método de RT-QPCR. Se compararon los niveles de ARNm de AGT humano con un gen estándar interno, GAPDH y, tal como se muestra en las Figuras 16A y 16B, el REVERSIR inhibió en forma potente la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481.

En un segundo estudio, se evaluó la eficacia de A-762645 en un modelo de ratón transgénico para hAGT pretratado con AD-85481 (Zilebesiran). En resumen, se insertó aleatoriamente el gen de AGT humano en múltiples áreas en el genoma de los ratones (generado durante la etapa de células madre embrionarias). Al día 0, se administró a los ratones por vía subcutánea una dosis individual de 10 mg/kg de AD-85481. Al Día 7, se administró a grupos de tres ratones por vía subcutánea una dosis única de 1 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg o 30 mg/kg dosis de REVERSIR A-762645; o control de PBS.

En los Días 0, 7, 9, 11, 14, y 21 se recolectaron muestras de suero. Al Día 21 se sacrificaron los animales, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizó mediante el método de RT-QPCR. Se compararon los

niveles de ARNm de AGT humano con un gen estándar interno, GAPDH y, como se muestra en la Figura 17, el REVERSIR inhibió en forma potente la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481.

En un tercer estudio, se evaluó la eficacia del A-762645 en un modelo de ratón PXB pretratado con AD-85481 (Zilebesiran). En resumen, en ratones PXB, se repobló el hígado con hepatocitos humanos mientras que otras células vivas (células de Kupffer, células endoteliales, células estrelladas, *etc.*) siguieron siendo de origen murino. Al día 0, se administró a los ratones por vía subcutánea una dosis individual de 10 mg/kg de AD-85481. Al Día 14, se administró a grupos de tres ratones por vía subcutánea una dosis única de 3 mg/kg, o 10 mg/kg; o una dosis dividida de 3 mg/kg x 3 (12 horas) de REVERSIR A-762645, o control de PBS.

En los Días -5, 0, 7, 14, 16, 18, 21 y 28 se recolectaron muestras de suero. Al Día 28 se sacrificaron los animales, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizó mediante el método de RT-QPCR. Se compararon los niveles de ARNm de AGT humano con un gen estándar interno, GAPDH y, como se muestra en la Figura 18, el REVERSIR inhibió en forma potente la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481.

Ejemplo 7. Efecto del REVERSIR A-762645 en un modelo de rata

Se evaluó la eficacia de A-762645 en un modelo de rata pretratado con AD-85481 (Zilebesiran). En resumen, al día 0, se administró a ratas (n=3) por vía subcutánea una dosis única de 3 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de AD-85481. Al Día 7, se administró a grupos de tres ratas por vía subcutánea una dosis única de 3 mg/kg, 10 mg/kg, o 30 mg/kg del REVERSIR A-762645

conjugado con GalNAc, se administró por vía intravenosa una dosis individual de 10 mg/kg de A-762645 que comprende un ligando GalNAc, se administró por vía intravenosa una dosis única de 1 mg/kg de AF-105-516448 (REVERSIR en una formulación de LNP); o control de PBS. Además, se administró la dosis intravenosa en forma de bolo en la vena de la cola de las ratas.

En los Días 0, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 14, y 21 se recolectaron muestras de suero. Al Día 21 se sacrificaron los animales, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARNm del suero y del hígado y se analizó mediante el método de RT-QPCR. Los niveles de ARNm de AGT se compararon con un gen estándar interno, GAPDH.

Tal como se representa en la Figura 19A, una mayor proporción de REVERSIR a ARNhd aumentó la cinética de reversión del silenciamiento de AGT, similarmente a lo observado en los primates no humanos. Además, como se muestra en la Figura 19B, la carga de ARNhd AD-85481 no afectó la reversión del silenciamiento de AGT. Además, como se muestra en la Figura 19C, la reversión del silenciamiento de AGT con el REVERSIR en una formulación de LNP fue más rápida en relación a la reversión con el mismo REVERSIR que comprende un ligando GalNAc. Además, como se muestra en la Figura 19D, la dosificación intravenosa en bolo no resultó en una cinética más rápida por sobre la administración subcutánea del REVERSIR.

Ejemplo 8. Efecto de los REVERSIR en un modelo de ratón humanizado

Se evaluó la eficacia de los REVERSIR A-3903617, A-3903618, A-3903619, A-3903620, A-3903621, A-3903622, A-3903623, A-3903624, A-3903625, A-3903626, A-3903627, A-3903628, A-3903629, A-3903630, y A-

3903631 (Figura 20) en un modelo de AAV en ratón pretratado con AD-85481 (Zilebesiran). En resumen, se transdujeron los ratones con el AAV serotipo 8 que expresa el AGT humano (hAGT). 14 días después de la transducción en el Día 0 del estudio, se administró a los ratones solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o AD-85481 a 3 mg/kg por inyección subcutánea. En el Día 7 se administró a los ratones solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o el REVERSIR a 3 mg/kg por inyección subcutánea. Se recolectaron muestras de suero en el Día 0, 7, 9, 11, 14 y 21. Se midió la proteína AGT en suero por ELISA. Tal como se representa en las Figuras 21-23, los REVERSIR inhibieron en forma potente la actividad inhibidora de ARNi de AD-85481.

Tabla 6. Ejemplos de REVERSIR de la invención

Oligo ID	Secuencia oligonucleotídica modificada en dirección 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia oligonucleotídica no modificada en dirección 5' a 3'	SEQ ID NO:
A-516448	gscsusasuscscsusgsgsgscsasas(Aln)(Aln)(Aln)(Tln)cs(Aln)dAL96		GCUAUCCUGGGCAAAAATCAA	
A-762635	csasuscscsas(m5Cln)asasusgs(Aln)gs(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGTACA	
A-762636	csasuscscs(Aln)csasasusgs(Aln)gs(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGTACA	
A-762637	csasuscs(m5Cln)ascsasasusgs(Aln)gs(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGTACA	
A-762638	csasus(m5Cln)csascsasasusgs(Aln)gs(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGTACA	
A-762645	csasuscscs(Aln)csasasusgs(Aln)gs(Aln)gsusas(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-762655	csasuscscs(Aln)csasas(Tln)gs(Aln)gsasgsusas(m5Cln)dAL96		CAUCCACAATGAGAGUACA	
A-762680	uscscs(Aln)csasasusgs(Aln)gs(Aln)gs(Tln)as(m5Cln)dAL96		UCCACAAUGAGAGTACA	
A-762689	uscscs(Aln)csasasusgs(Aln)gs(Aln)gsusas(m5Cln)dAL96		UCCACAAUGAGAGUACA	
A-762701	uscscs(Aln)cs(Aln)asusgs(Aln)gsasgsusas(m5Cln)dAL96		UCCACAAUGAGAGUACA	
A-762722	cscs(Aln)csasasusgs(Aln)gs(Aln)gsusas(m5Cln)dAL96		CCACAAUGAGAGUACA	
A-809917	csasuscc(Aln)csasasusg(Aln)g(Aln)gsusas(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-809918	csasuscsc(Aln)casasusg(Aln)g(Aln)gsusas(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	

A-809919	csasuscc(Aln)csasasusg(Aln)gs(Aln)gsusa(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-809920	csasuscc(Aln)csaasusg(Aln)g(Aln)gsusa(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-809921	csasuscsc(Aln)caasusg(Aln)g(Aln)gsusa(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-809922	csasusccs(Aln)casausg(Aln)g(Aln)gsusa(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-809923	csasuscc(Aln)csaasugs(Aln)g(Aln)gsuas(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-809924	csasuscc(Aln)casaugs(Aln)g(Aln)gsua(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-809925	csasuscc(Aln)caasug(Aln)g(Aln)gsusa(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-809925	csasuscc(Aln)caasug(Aln)g(Aln)gsusa(m5Cln)dAL96		CAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-2423818	uscsgucsasuscc(Aln)caasug(Aln)g(Aln)gsusa(m5Cln)dAL96		UCGUCAUCCACAAUGAGAGUACA	
A-2423819	uscscs(Aln)caasug(Aln)g(Aln)gsusa(m5Cln)dAL96		UCCACAAUGAGAGUACA	

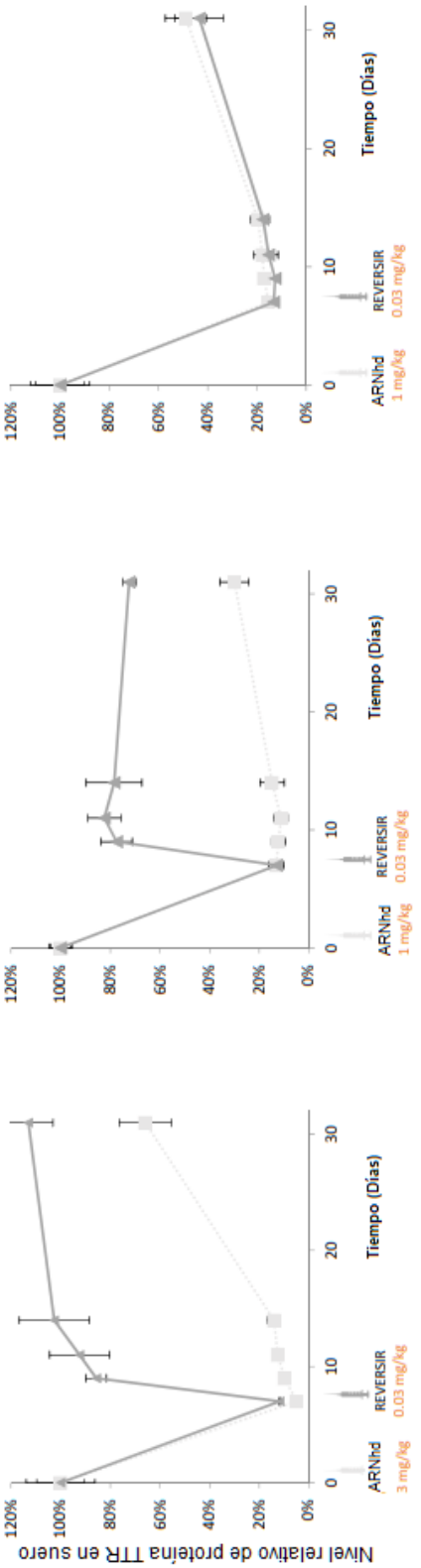


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

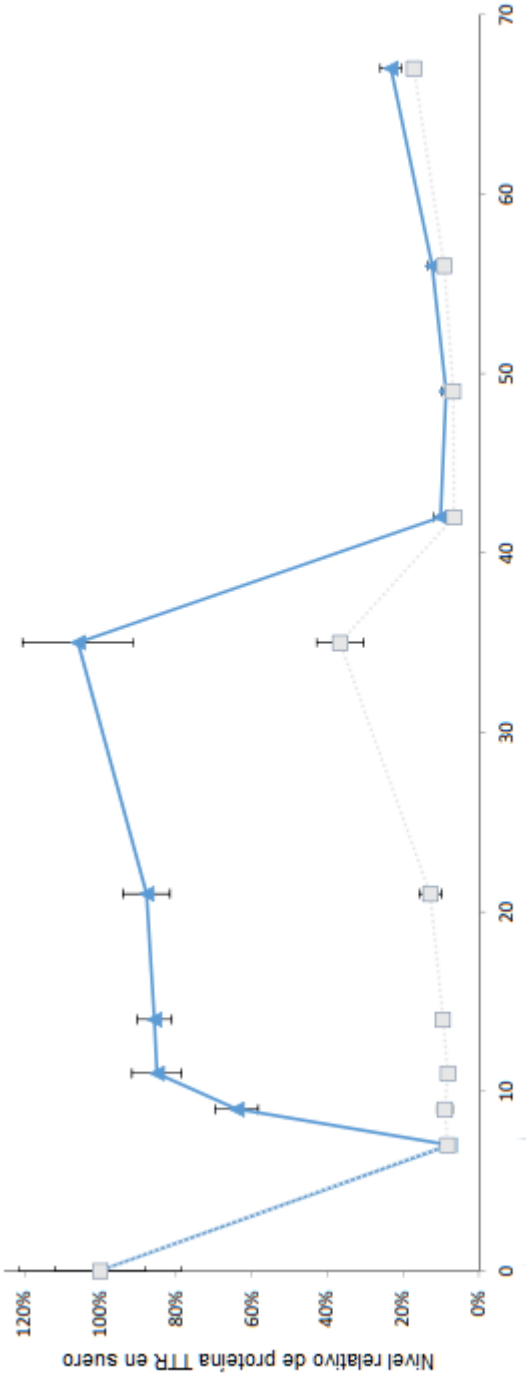

Nivel relativo de proteína TTR en suero
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo (Dias)
ARNhd
1 mg/kg
REVERSIR
3 mg/kg

FIG. 2

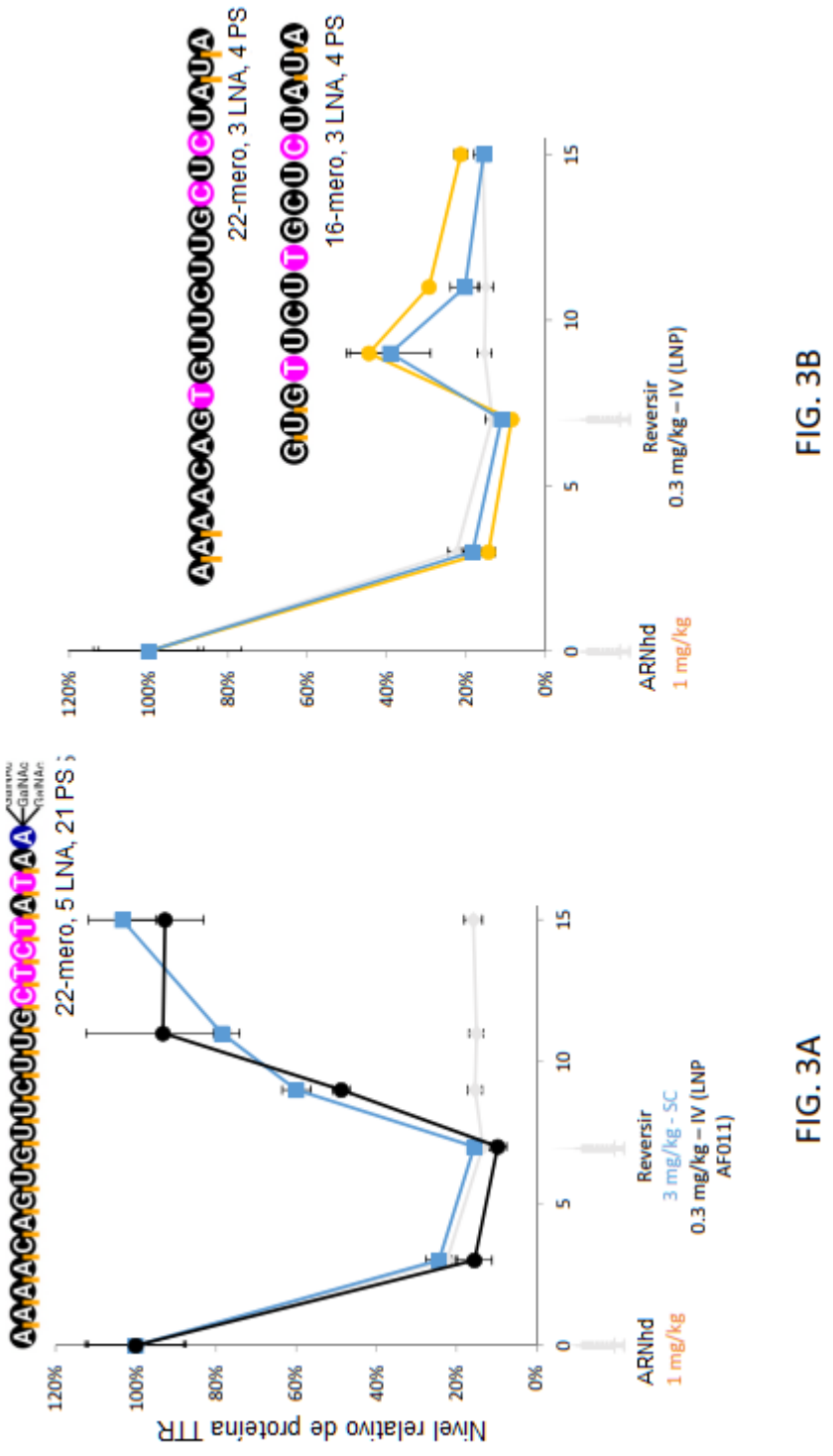

22-mero, 5 LNA, 21 PS
Nivel relativo de proteína TTR
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
5
10
15
ARNhd
1 mg/kg
Reversir
3 mg/kg - SC
0.3 mg/kg – IV (LNP
AF011)
22-mero, 3 LNA, 4 PS
16-mero, 3 LNA, 4 PS
Reversir
0.3 mg/kg – IV (LNP)

FIG. 3A

FIG. 3B

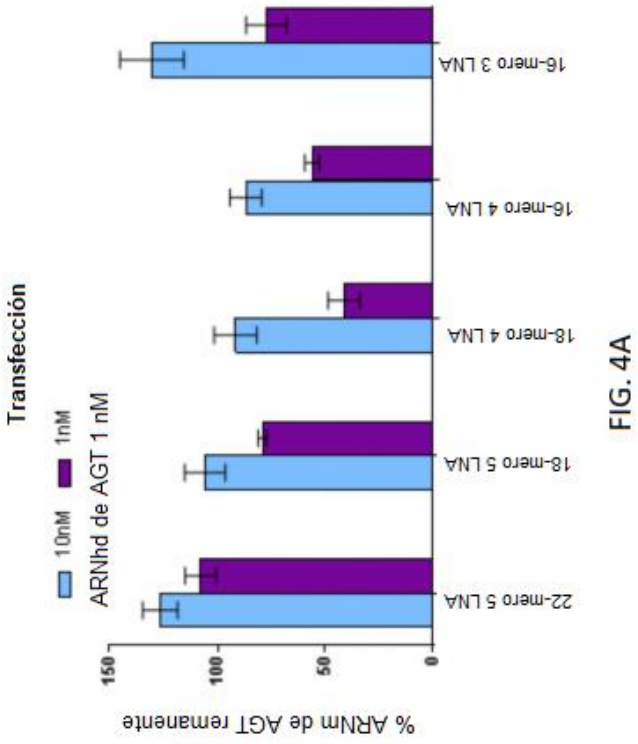

Transfección
10nM
1nM
ARNhd de AGT 1 nM
% ARNm de AGT remanente
150
100
50
0
22-mero 5 LNA
18-mero 5 LNA
18-mero 4 LNA
16-mero 4 LNA
16-mero 3 LNA

FIG. 4A

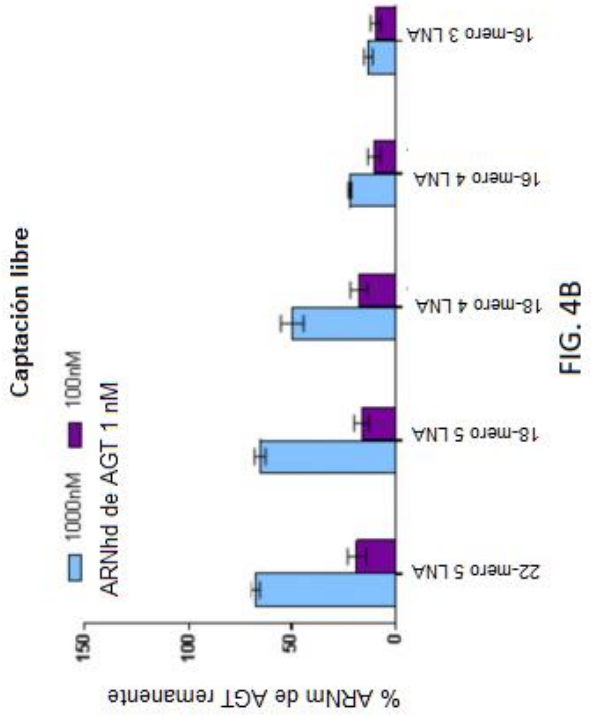

Captación libre
1000nM
100nM
ARNhd de AGT 1 nM
% ARNm de AGT remanente
150
100
50
0
22-mero 5 LNA
18-mero 5 LNA
18-mero 4 LNA
16-mero 4 LNA
16-mero 3 LNA

FIG. 4B

		24h transfección de REVERSIR		24h transfección de REVERSIR		24h captación libre de REVERSIR		24h captación libre de REVERSIR			
		Dosis - Unidad		Dosis - Unidad		Dosis - Unidad		Dosis - Unidad			
		1 - nM		10 - nM		1000 - nM		100 - nM			
Conjuntos de REVERSIR	REVERSIR	avg	SD	avg	SD	avg	SD	avg	SD	REVERSIR	LNA
22-mero - 5 LNA	A-515518.1	107.9	7.2	126.7	8.0	67.4	2.3	18.7	4.5		2,3,6,7,8
18-mero - 5 LNA	A-515556.1	79.4	2.0	105.9	9.4	65.0	2.7	16.5	3.6		2,3,6,7,8
18-mero - 4 LNA	A-515559.1	40.8	7.3	91.9	9.8	49.6	5.4	17.7	4.0		2,6,10,14
16-mero - 4 LNA	A-515586.1	55.6	3.4	87.1	7.5	22.1	0.9	10.4	3.2		2,6,10,14
16-mero - 3 LNA	A-515589.1	77.2	9.8	130.5	14.8	13.2	2.2	9.7	2.5		2,4,6

FIG. 5

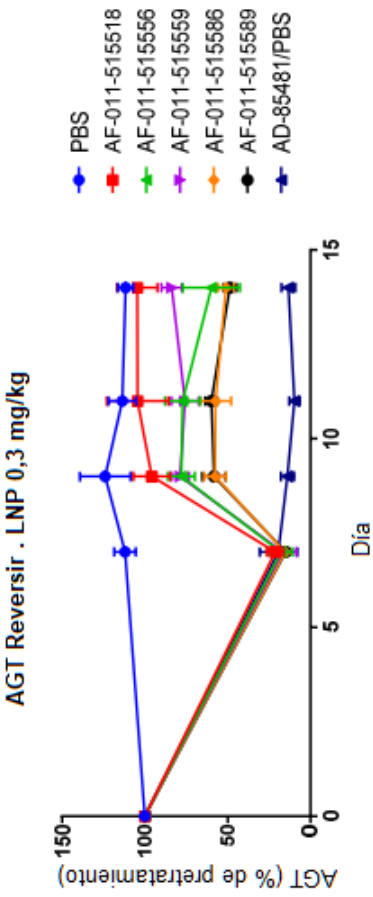

AGT Reversir . LNP 0,3 mg/kg
PBS
AF-011-515518
AF-011-515556
AF-011-515559
AF-011-515586
AF-011-515589
AD-85481/PBS
AGT (% de pretratamiento)
150
100
50
0
0
5
10
15
Día

FIG. 6A

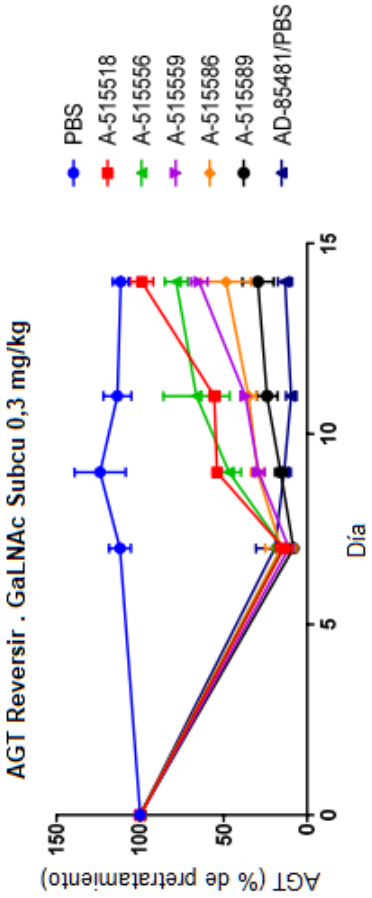

AGT Reversir . GaLNAc Subcu 0,3 mg/kg
PBS
A-515518
A-515556
A-515559
A-515586
A-515589
AD-85481/PBS
AGT (% de pretratamiento)
150
100
50
0
0
5
10
15
Día

FIG. 6B

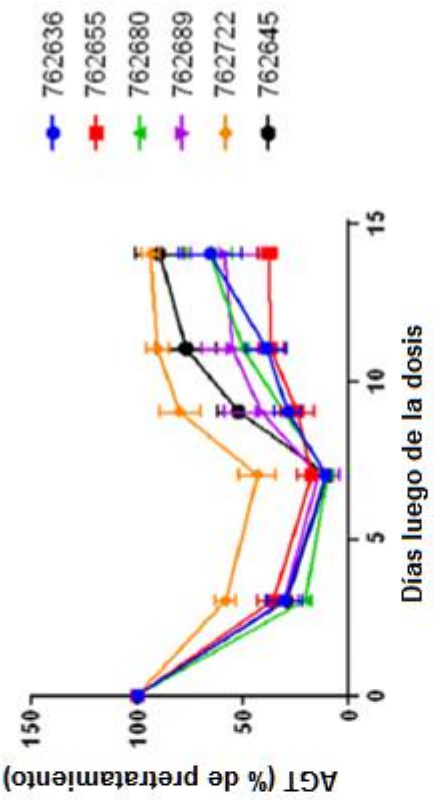

762636
762655
762680
762689
762722
762645
Ronda 2 de Reversir
AGT (% de pretratamiento)
Días luego de la dosis
150
100
50
0
0
5
10
15

FIG. 7B

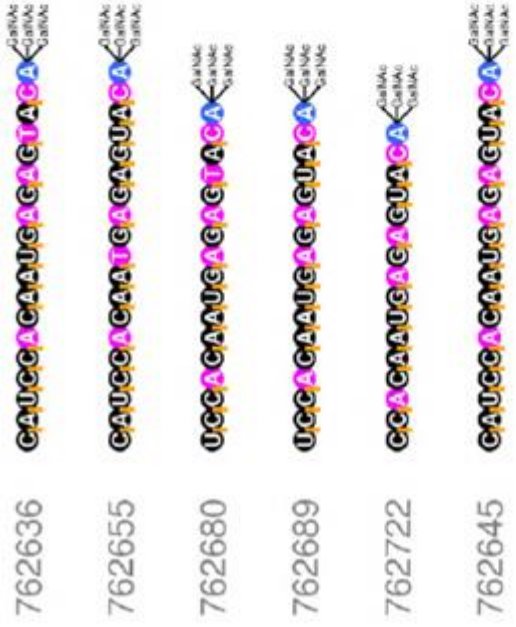

762636
762655
762680
762689
762722
762645

FIG. 7A

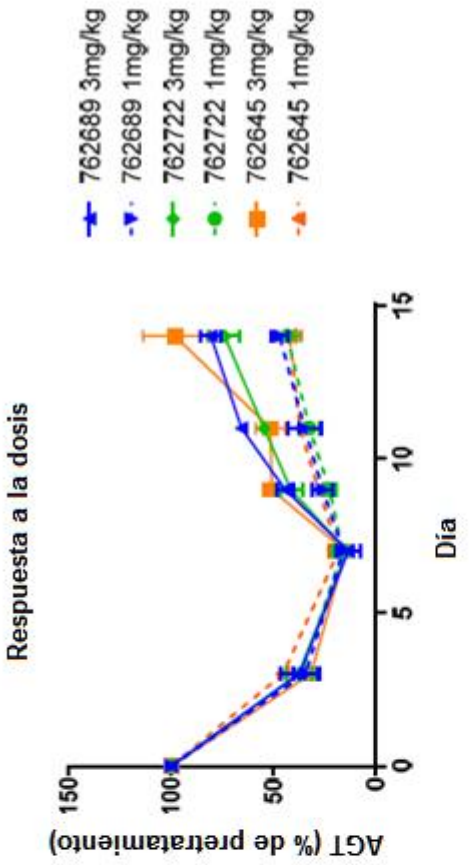

762689 3mg/kg
762689 1mg/kg
762722 3mg/kg
762722 1mg/kg
762645 3mg/kg
762645 1mg/kg
Respuesta a la dosis
AGT (% de pretratamiento)
150
100
50
0
0
5
10
15
Día

FIG. 8B


ADN
LNA
OMe
PS
A-762645
A-762689
A-762722

FIG. 8A

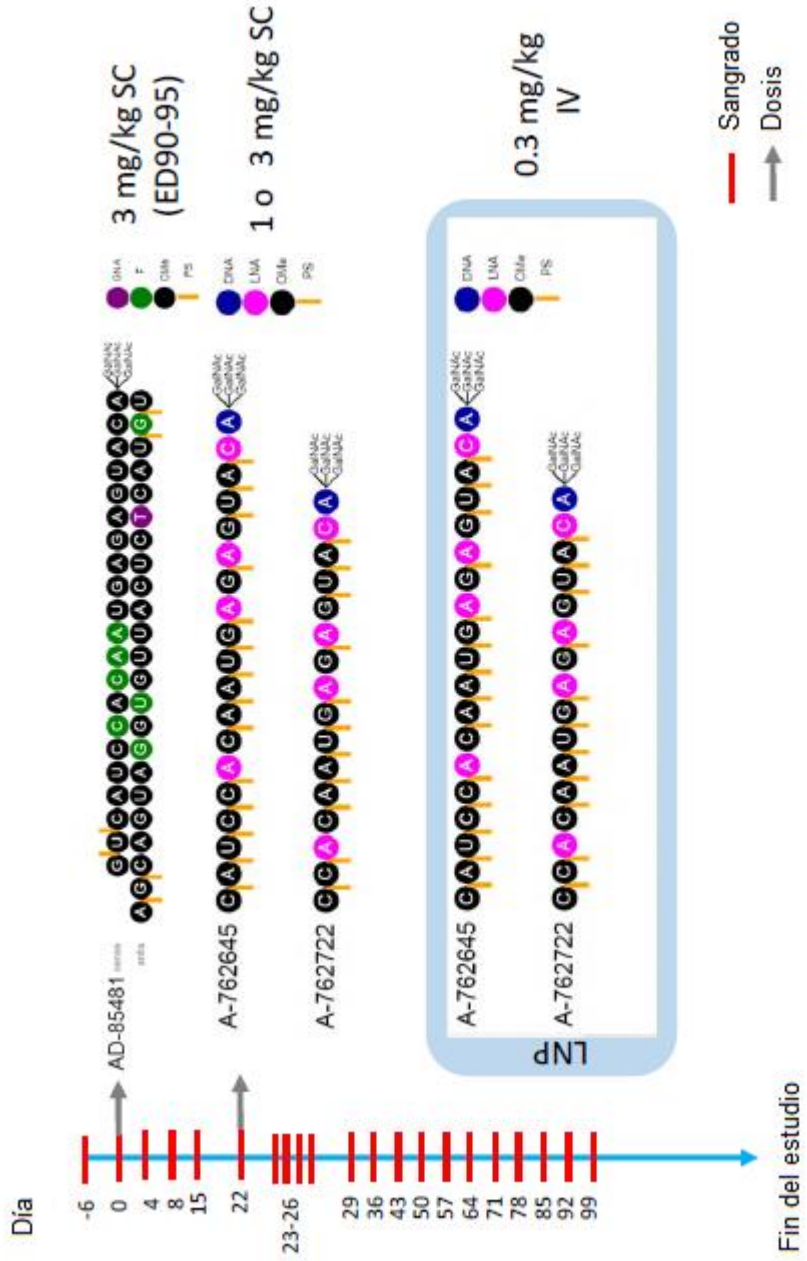
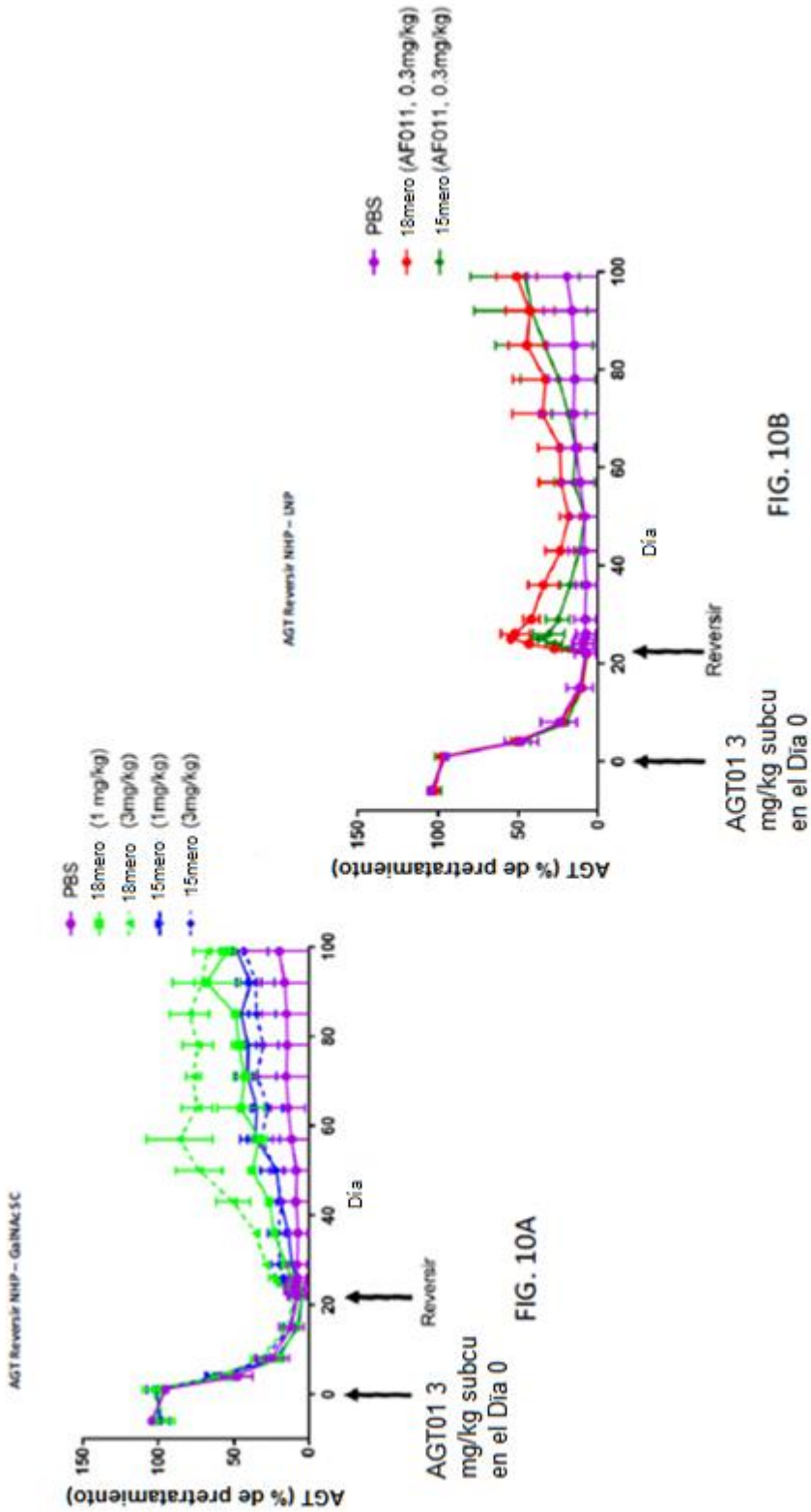

Dia
-6
0
4
8
15
22
23-26
29
36
43
50
57
64
71
78
85
92
99
Fin del estudio
AD-85481
3 mg/kg SC
(ED90-95)
A-762645
1 o 3 mg/kg SC
A-762722
LNP
A-762645
0.3 mg/kg
IV
A-762722
Sangrado
Dosis

FIG. 9


AGT Reversir NHP – GalNAc-siC
PBS
18mero (1 mg/kg)
18mero (3mg/kg)
15mero (1mg/kg)
15mero (3mg/kg)
AGT (% de pretratamiento)
Dia
AGT01 3 mg/kg subcu en el Dia 0
Reversir
FIG. 10A
AGT Reversir NHP – LNP
PBS
18mero (AF011, 0.3mg/kg)
15mero (AF011, 0.3mg/kg)
AGT (% de pretratamiento)
Dia
AGT01 3 mg/kg subcu en el Dia 0
Reversir
FIG. 10B

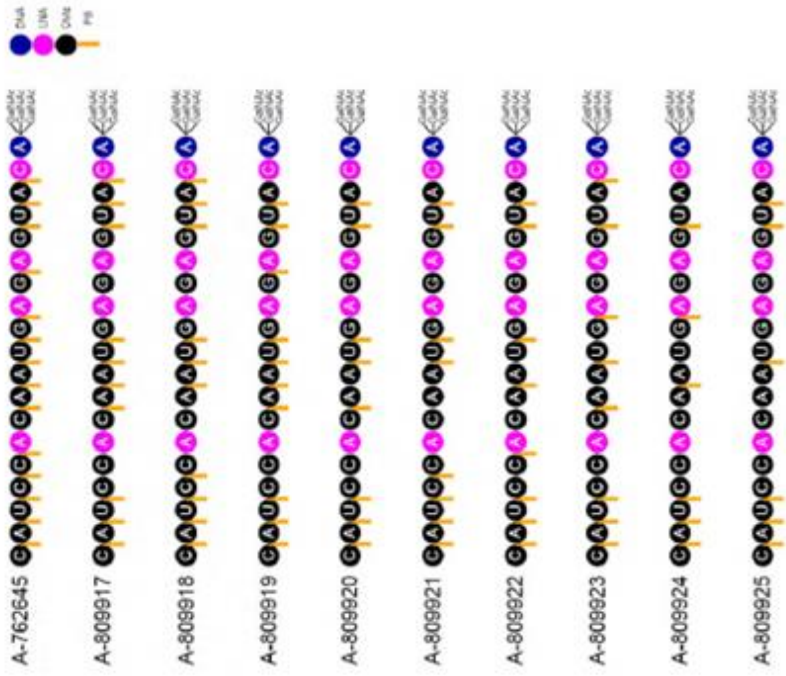


FIG. 11A

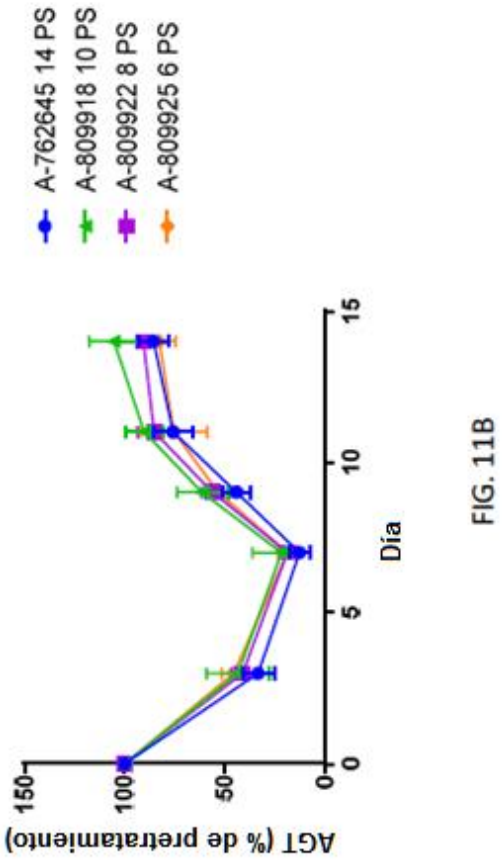


FIG. 11B

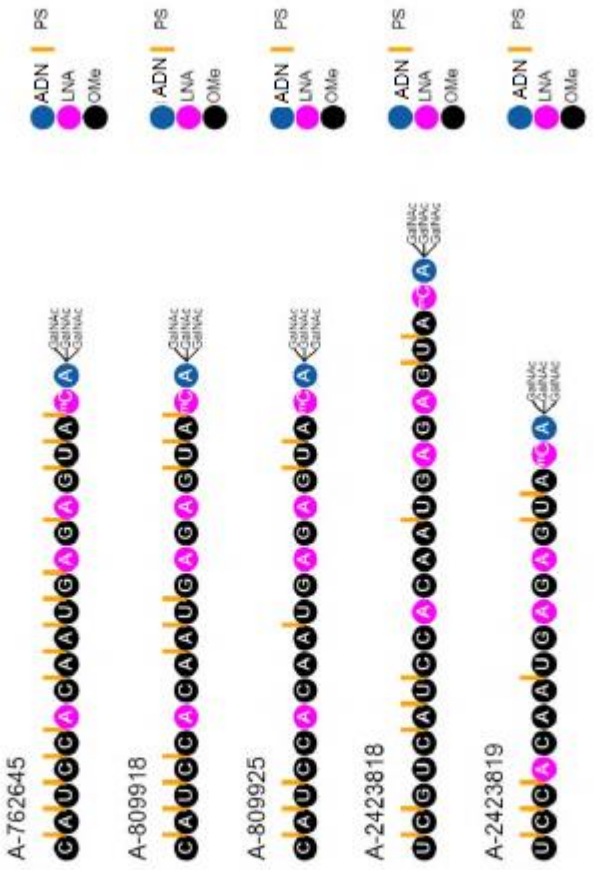

PS
ADN
LNA
OMe
A-762645
A-809918
A-809925
A-2423818
A-2423819
GalNAc

FIG. 12A

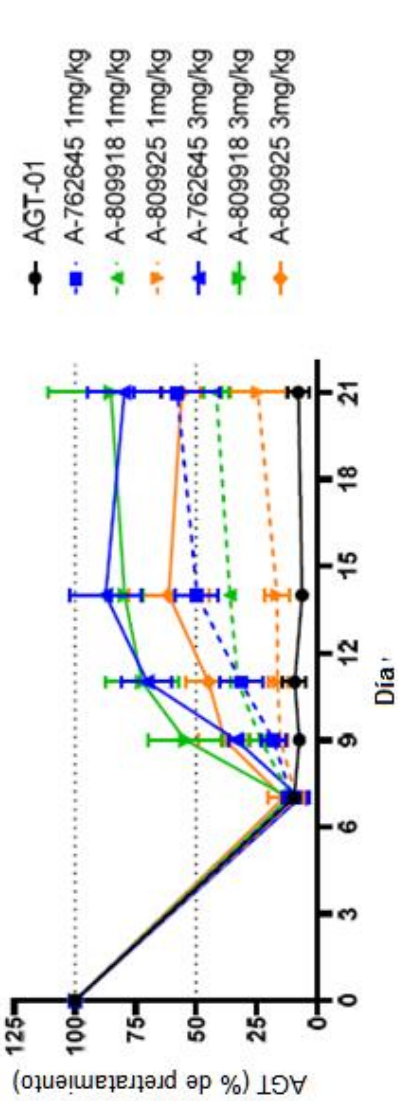


FIG. 12B

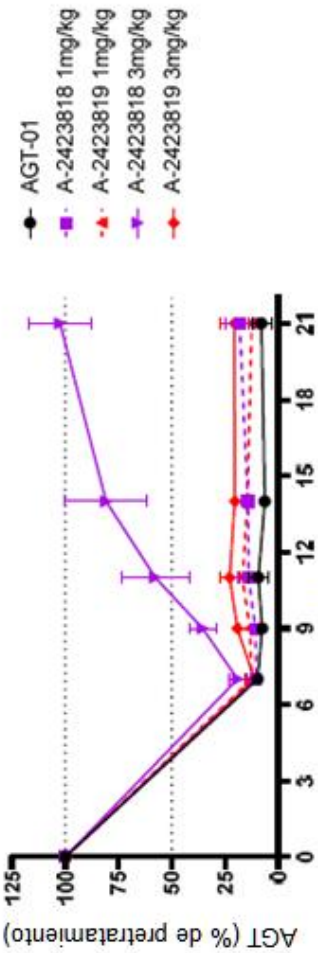


FIG. 12C

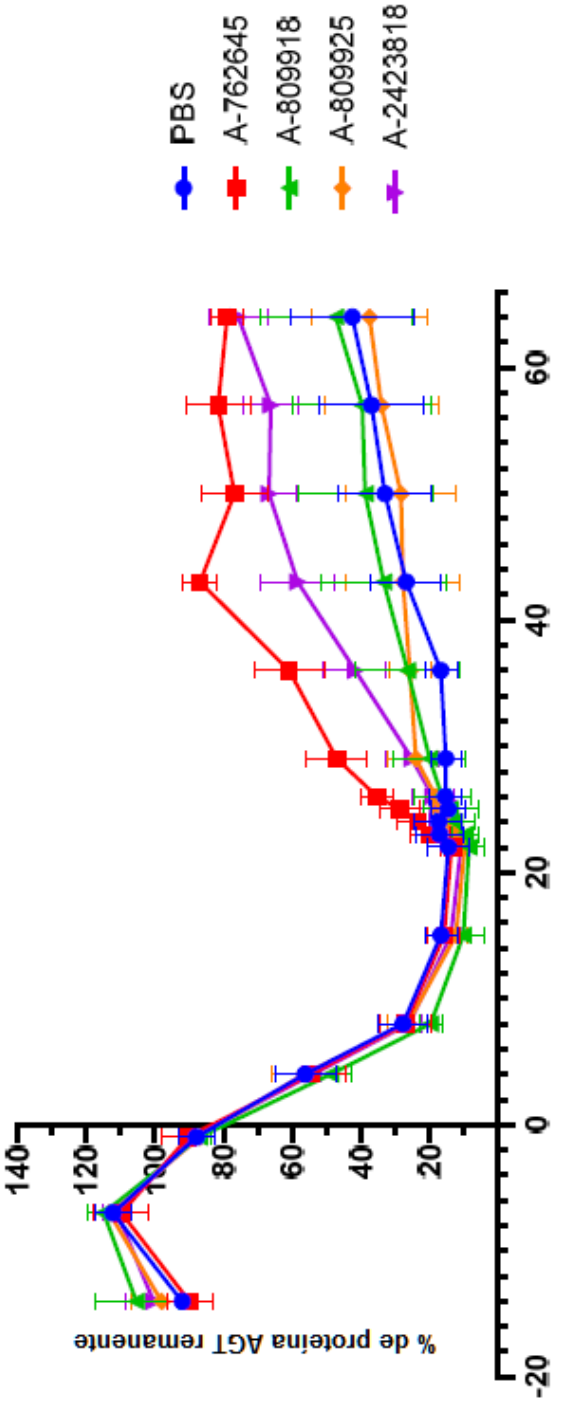

PBS
A-762645
A-809918
A-809925
A-2423818
% de proteína AGT remanente
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60

FIG. 13A

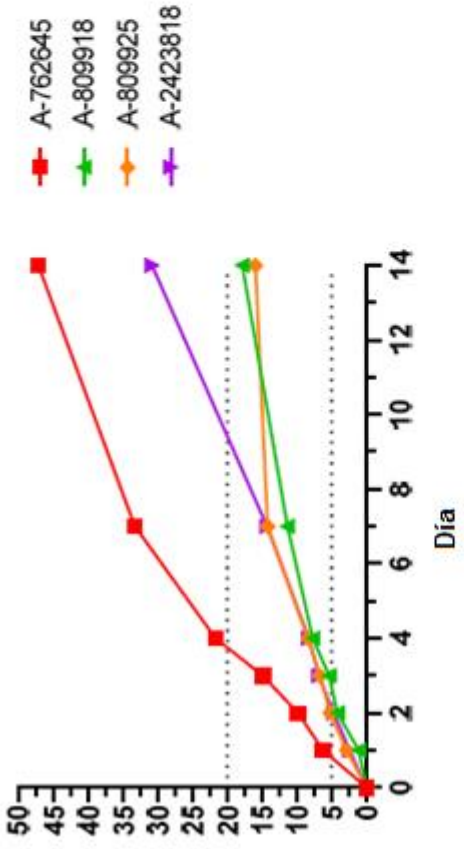


FIG. 13B

A-762645	
Día	% de reversión
0	0.0
1	6.2
2	9.9
3	14.9
4	21.7
7	33.3
14	47.2

FIG. 13C

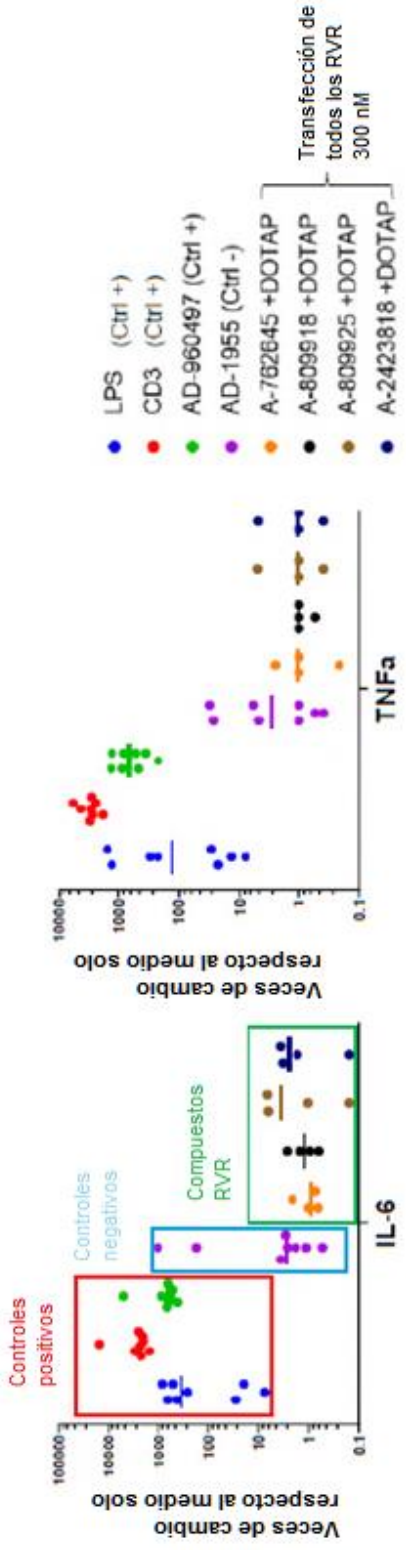

LPS (Ctrl +)
CD3 (Ctrl +)
AD-960497 (Ctrl +)
AD-1955 (Ctrl -)
A-762645 +DOTAP
A-809918 +DOTAP
A-809925 +DOTAP
A-2423818 +DOTAP
Transfección de todos los RVR 300 nM
Controles positivos
Controles negativos
Compuestos RVR
IL-6
TNFa
IL-1B
IL-8
Veces de cambio respecto al medio solo

FIG. 14A

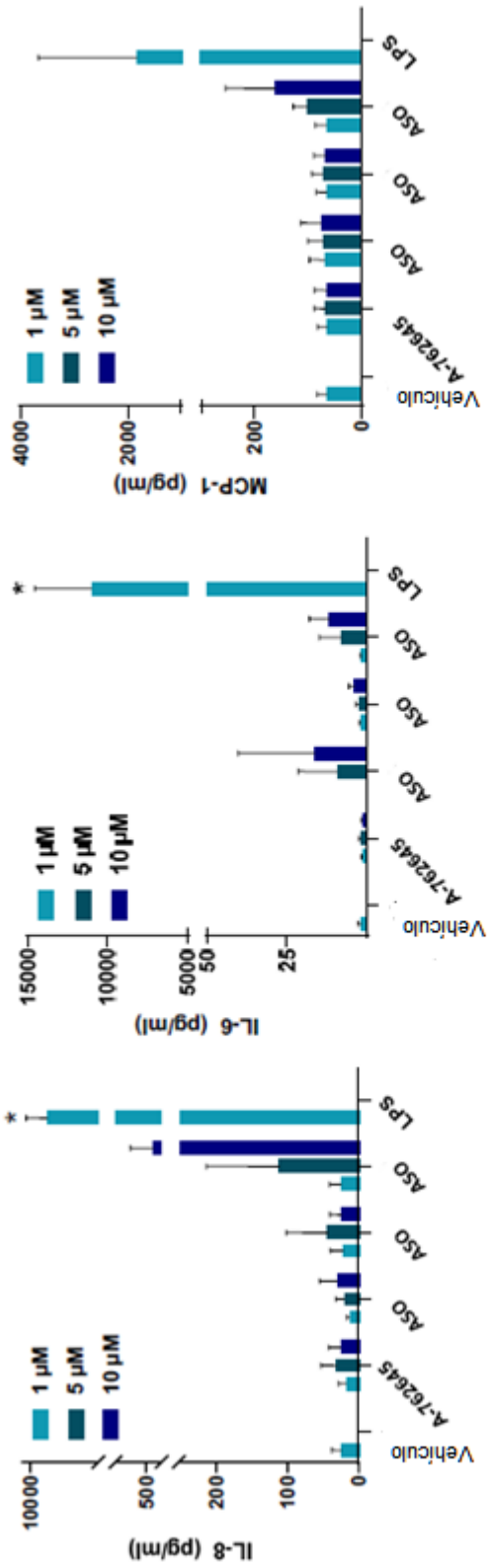

MCP-1 (pg/ml)
4000
2000
200
0
1 µM
5 µM
10 µM
Veicolo
A-762645
ASO
ASO
ASO
ASO
LPS
IL-6 (pg/ml)
15000
10000
5000
50
25
*
IL-8 (pg/ml)
10000
500
200
100
0
*

FIG. 14B

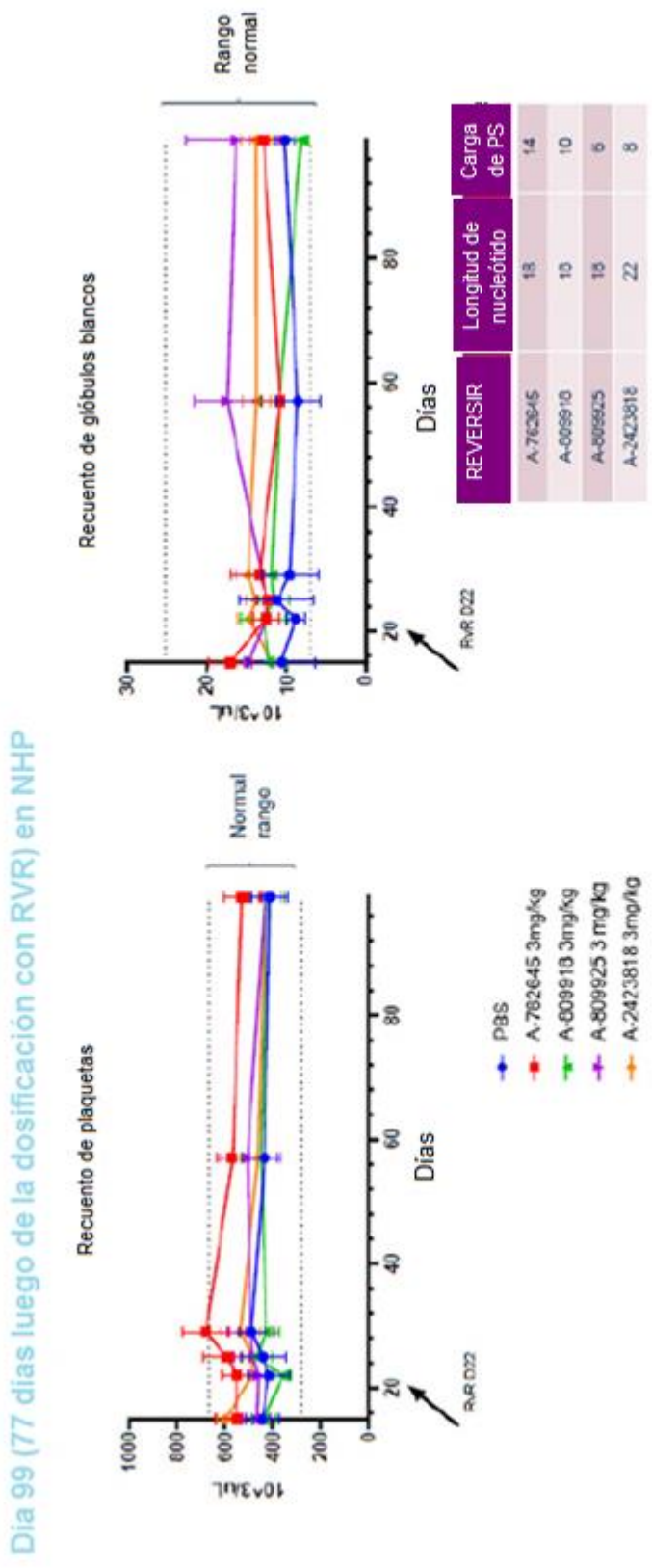
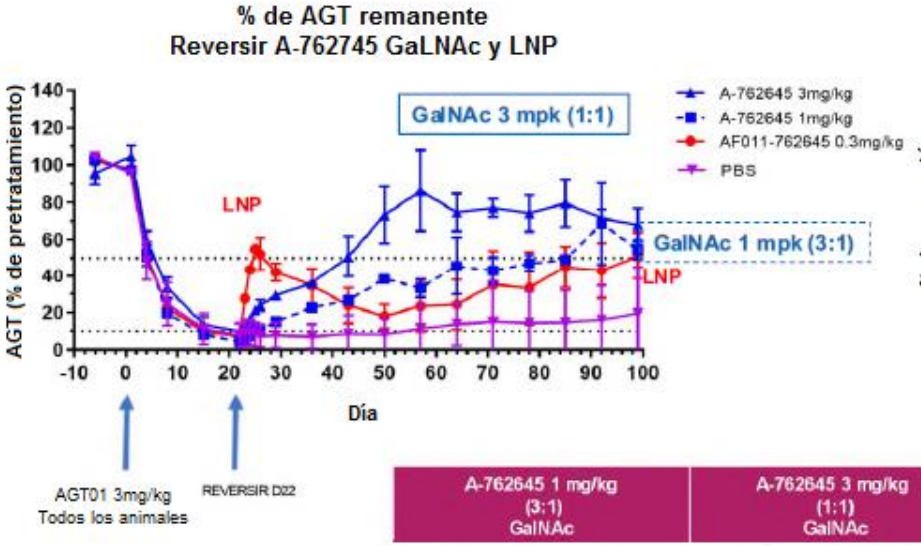
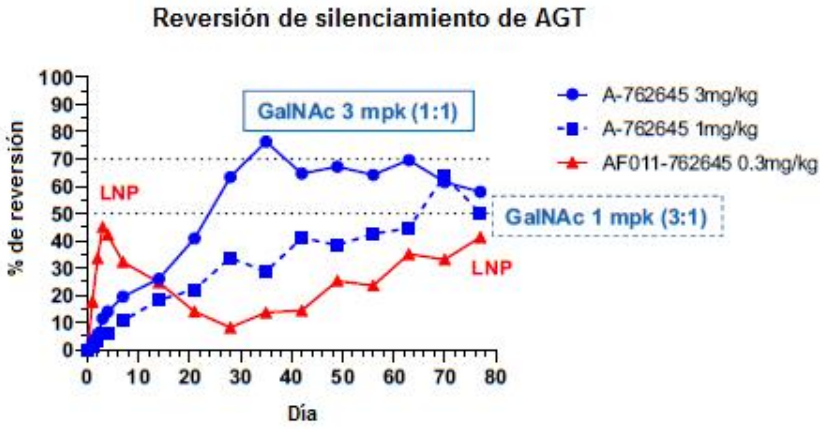

Dia 99 (77 días luego de la dosificación con RVR) en NHP
Recuento de plaquetas
10^3/uL
Normal rango
Días
RvR D22
PBS
A-762645 3mg/kg
A-809918 3mg/kg
A-809925 3 mg/kg
A-2423818 3mg/kg
Recuento de glóbulos blancos
10^3/uL
Rango normal
Días
RvR D22
REVERSIR
Longitud de nucleótido
Carga de PS
A-762645 18 14
A-809918 15 10
A-809925 18 6
A-2423818 22 8

FIG. 14C

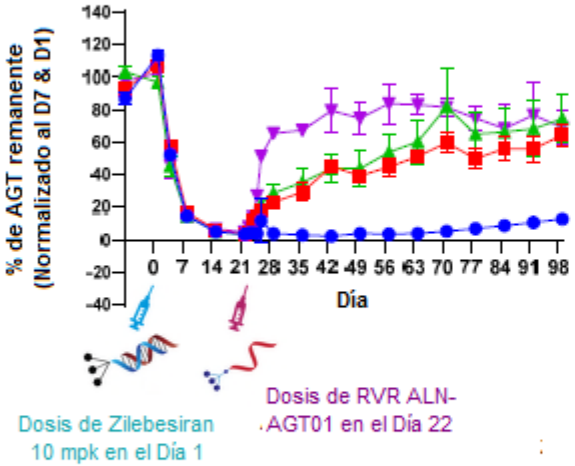




A-762645 1 mg/kg (3:1) GalNAc		A-762645 3 mg/kg (1:1) GalNAc		AF011-762645 0.3 mg/kg (10:1) LNP	
Día	% de reversión	Día	% de reversión	Día	% de reversión
1	1.4	1	3	1	17.7
3	5.9	3	11.5	3	45
7	10.6	7	19.5	7	32.2

AGT ARNhd = 3 mpk

FIG. 15A





*grupo RVR 10mpk: valor atípico eliminado

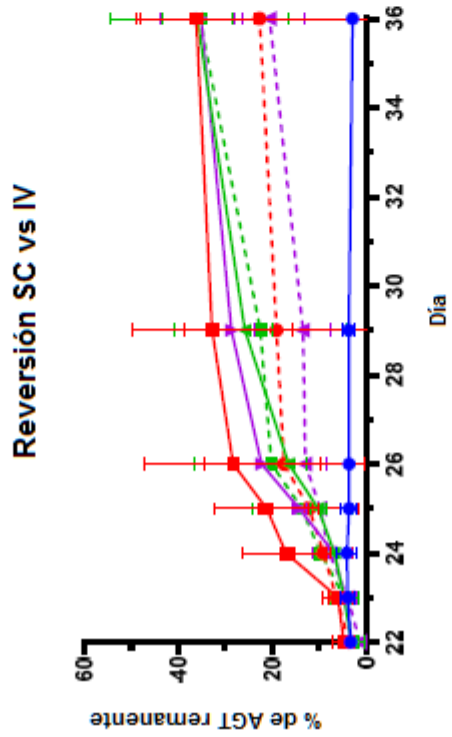


Perfil de PD numérico de los primeros 7 días de la dosificación con RVR

Días de tratamiento		% de AGT remanente			
Día luego de la dosis de zilebe	Día luego de la dosis de RVR	zilebe 10mpk +PBS	zilebe 10mpk +RVR 10 mpk (n=2)	zilebe 10mpk +RVR 30 mpk	zilebe 10mpk +RVR 30 mpk dividido
Pre (D-7&1)	NA	100	100	100	100
22	0	3.3	3.3	3.0	4.6
23	1	4.0	4.1	4.5	7.8
24	2	4.1	11.6	6.8	14.2
25	3	3.7	14.8	14.2	27.1
26	4	11.4	17.5	22.3	51.2
29	7	3.7	23.1	28.7	65.2

Q24h: dosificación cada 24 horas, mpk: mg/kg

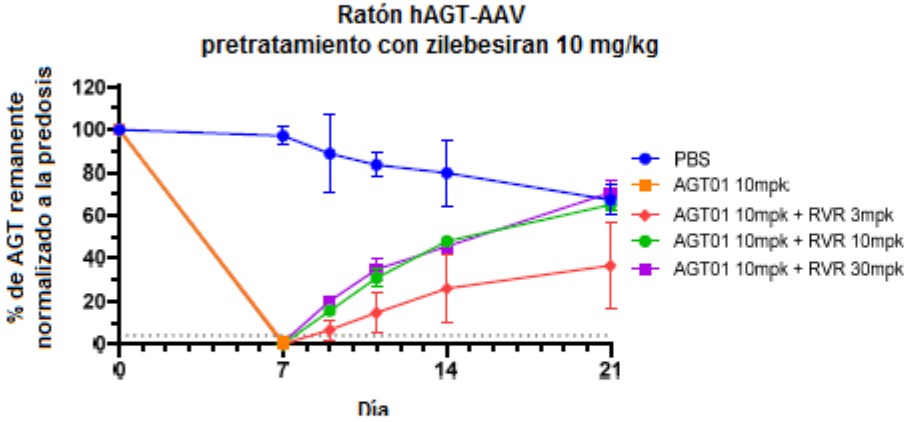
FIG. 15B



% de AGT remanente

Dia de RVR	Dia de estudio	AGT01 CTL	10 mpk SC	20 mpk SC	30 mpk SC	10 mpk IV	20 mpk IV	30 mpk IV
0	22	3.3	4.7	3.1	3.0	3.6	2.8	1.3
1	23	3.9	5.9	4.7	4.5	6.3	4.5	3.9
2	24	4.1	17.1	6.7	6.8	9.1	9.7	7.8
3	25	3.6	21.2	10.2	14.2	12.1	13.7	9.8
4	26	3.6	28.3	16.5	22.3	17.5	20.2	12.9
7	29	3.7	32.8	25.8	28.7	19.1	22.5	13.4
14	36	2.9	36.2	36.0	35.2	22.7	35.4	20.5

FIG. 15C



LLOQ: límite inferior de cuantificación; AGT01= zilebesiran; RVR= ALN-AGT01 RVR

Días de tratamiento		% de AGT remanente			
Día luego de la dosis de zilebe	Día luego de la dosis de RVR	Zilebe 10 mpk +PBS	Zilebe 10 mpk +RVR 3mpk	Zilebe 10 mpk +RVR 10mpk	Zilebe 10mpk +RVR 30 mpk
Pre-(D0)	NA	100	100	100	100
7	0	1.32	LLOQ	LLOQ	1.10
9	2	LLOQ	6.75	15.53	20.11
11	4	LLOQ	14.65	30.83	34.89
14	7	LLOQ	25.90	48.04	45.58
21	14	LLOQ	36.69	65.07	70.65

FIG. 16A

Días de tratamiento		% de AGT remanente		
Día luego de la dosis de zilebe	Día luego de la dosis de RVR	Zilebe 3mpk +PBS	Zilebe 3 mpk +RVR 3mpk	Zilebe 3 mpk +RVR 10mpk
Pre- (D0)	NA	NA	100	100
7	0	NA	3.26	4.06
9	2	NA	27.12	35.42
11	4	NA	44.35	55.3
14	7	NA	59.27	71.96
21	14	NA	69.54	70.9

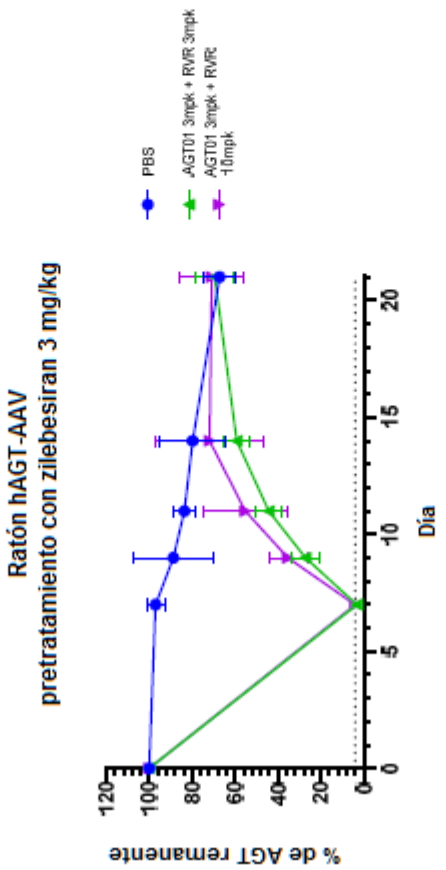
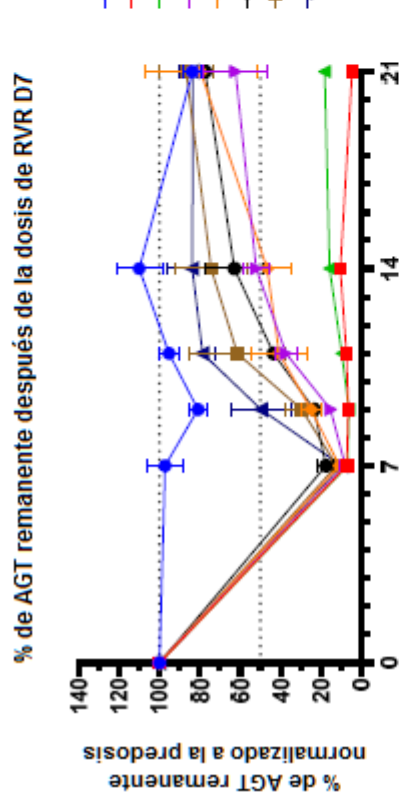
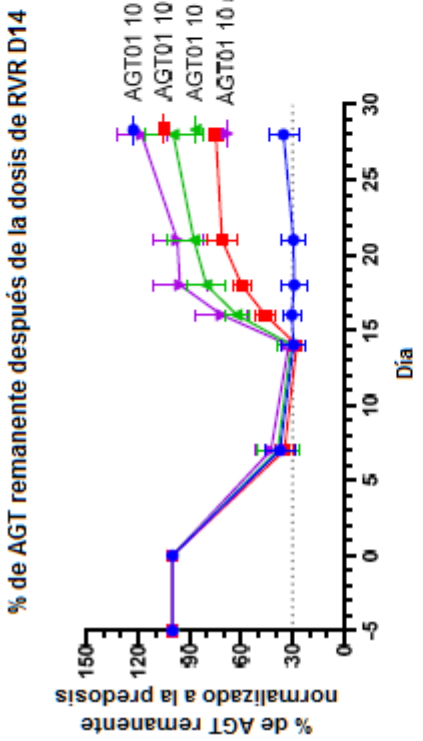


FIG. 16B



Días de tratamiento		% de AGT remanente							
Día luego de la dosis de zilebe	Día luego de la dosis de RVR	Zilebe 10 mpk +PBS	Zilebe 10 mpk 1 + RVR 1mpk	Zilebe 10 mpk + RVR 2.5mpk	Zilebe 10 mpk + RVR 5mpk N=2	Zilebe 10 mpk + RVR 10mpk N=2	Zilebe 10 mpk + RVR 15mpk	Zilebe 10 mpk + RVR 30mpk
0	N/A	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
7	0	7.1	6.8	7.8	10.8	17.5	12.2	9.8
9	2	6.3	6.1	15.2	25.0	23.2	29.4	49.6
11	4	7.3	9.7	37.2	40.7	43.5	61.4	78.7
14	6	10.3	15.7	52.1	46.7	62.9	74.4	83.7
21	13	4.5	18.1	62.3	79.7	77.3	86.8	83.5

FIG. 17



Días de tratamiento		% de AGT remanente				
Dia luego de la dosis de zilebe	Dia luego de la dosis de RVR	Zilebe 10 mpk +PBS	Zilebe 10 mpk +RVR 3mpk	Zilebe 10mpk +RVR 10mpk	Zilebe 10mpk +RVR 3 mpk x 3 12 hrs
Pre- (D-5)	NA	100	100	100	100
7	0	37.3	34.7	38.6	42.6
14	0	29.4	27.6	30.8	32.3
16	2	30.4	46.0	62.5	71.5
18	4	29.1	59.7	80.3	95.7
21	7	29.5	71.0	87.5	97.2
28	14	35.4	74.9	99.6	118.1

FIG. 18



PBS
10 mg/kg dsRNA/PBS
10 mg/kg dsRNA + 3 mg/kg RVR
10 mg/kg dsRNA + 10 mg/kg RVR
10 mg/kg dsRNA + 30 mg/kg RVR

10 mg/kg dsRNA + 3 mg/kg RVR		10 mg/kg dsRNA + 10 mg/kg RVR		10 mg/kg dsRNA + 30 mg/kg RVR		AGT dsRNA 10 mg/kg	
Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente
0	7.0	0	10.1	0	8.8	0	5.48
1	26.0	1	41.4	1	43.9	1	5.63
2	63.9	2	80.6	2	91.3	2	6.45
3	90.8	3	97.5	3	110.3	3	8.26

Día 0 es una muestra previa a la dosificación con reversir: Día 7 luego de la dosificación con ARNhd y considerado nadir

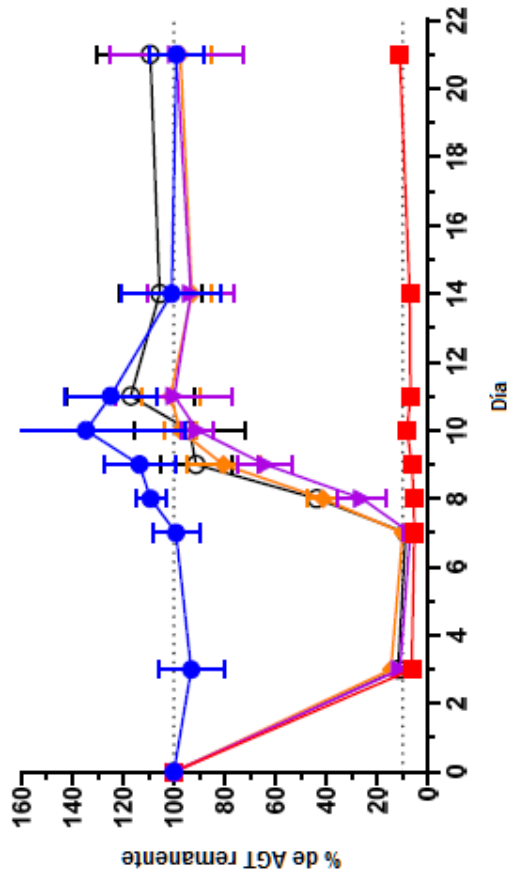


FIG. 19A



3 mg/kg dsRNA + 3 mg/kg RVR		10 mg/kg dsRNA + 10 mg/kg RVR		30 mg/kg dsRNA + 30 mg/kg RVR		AGT dsRNA 10 mg/kg	
Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente
0	11.7	0	10.1	0	9.4	0	5.48
1	50.3	1	41.4	1	35.3	1	5.63
2	85.2	2	80.6	2	90.7	2	6.45
3	106.7	3	97.5	3	109.0	3	8.26

Día 0 es una muestra previa a la dosificación con reversir: Día 7 luego de la dosificación con ARNihd y considerado nadir

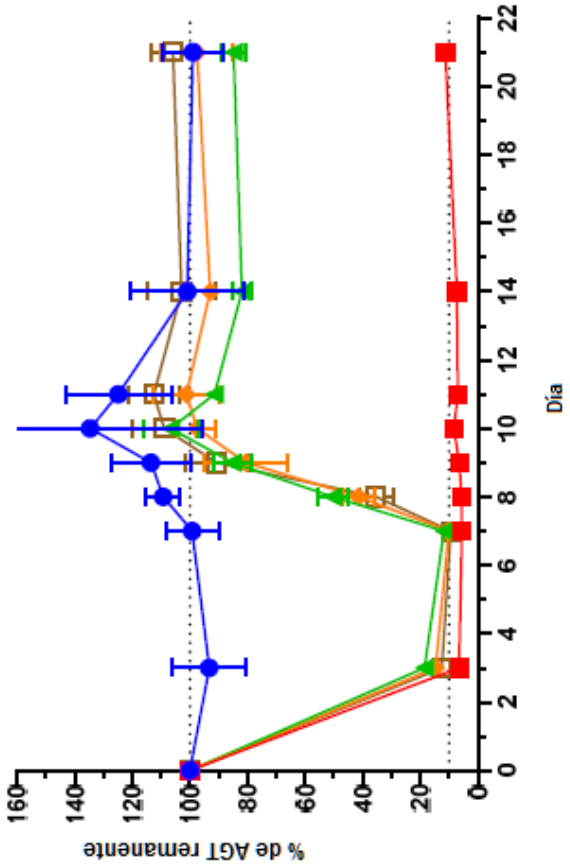
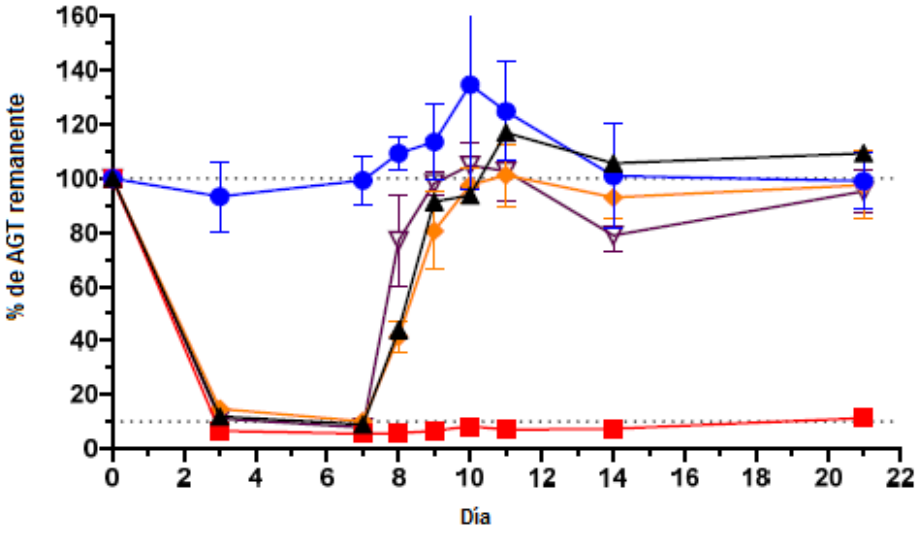
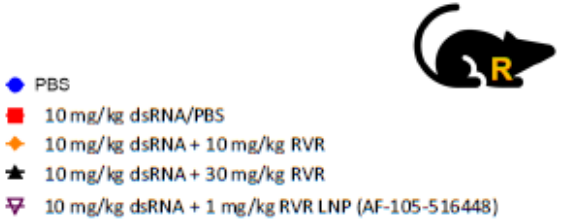


FIG. 19B





10 mg/kg dsRNA + 3 mg/kg RVR		10 mg/kg dsRNA + 10 mg/kg RVR		10mg/kg dsRNA + 1 mg/kg RVR LNP		AGT dsRNA 10 mg/kg	
Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente
0	7.0	0	10.1	0	7.7	0	5.5
1	26.0	1	41.4	1	77.0	1	5.6
2	63.9	2	80.6	2	96.2	2	6.4
3	90.8	3	97.5	3	104.8	3	8.3
4	**99.8**	**4**	**101.2**	**4**	**102.7**	4	6.9

Día 0 es una muestra previa a la dosificación con reversir: Día 7 luego de la dosificación con ARNhd y considerado nadir

FIG. 19C



PBS
10 mg/kg dsRNA/PBS
10 mg/kg dsRNA + 10 mg/kg RVR
10 mg/kg dsRNA + 10 mg/kg RVR GalNAc IV

10 mg/kg dsRNA + 10 mg/kg RVR		10mg/kg dsRNA + 10 mg/kg RVR GalNAc IV		AGT dsRNA 10 mg/kg	
Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente	Día	% de AGT remanente
0	10.1	0	9.7	0	5.5
1	41.4	1	29.2	1	5.6
2	80.6	2	64.3	2	6.4
3	97.5	3	73.0	3	8.3

Día 0 es una muestra previa a la dosificación con reversir: Día 7 luego de la dosificación con ARNhd y considerado nadir

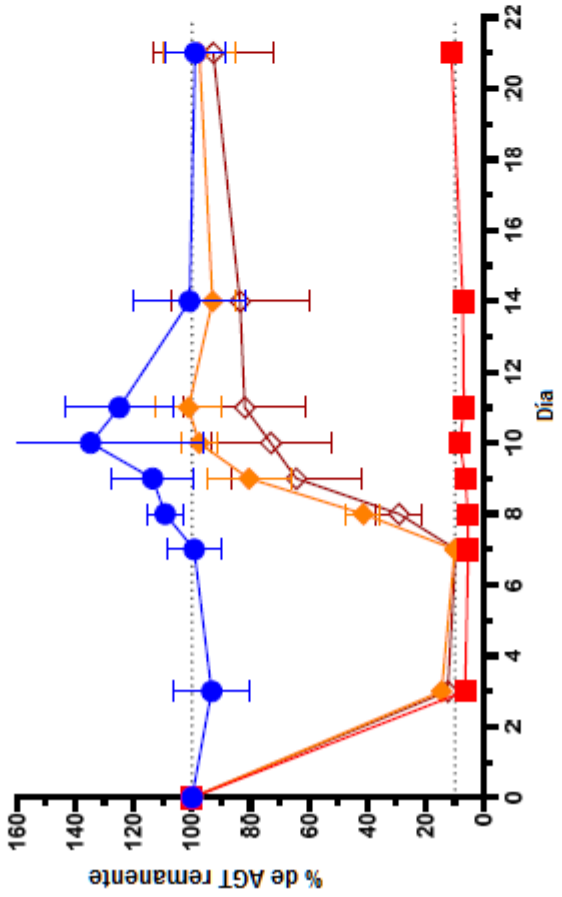


FIG. 19D

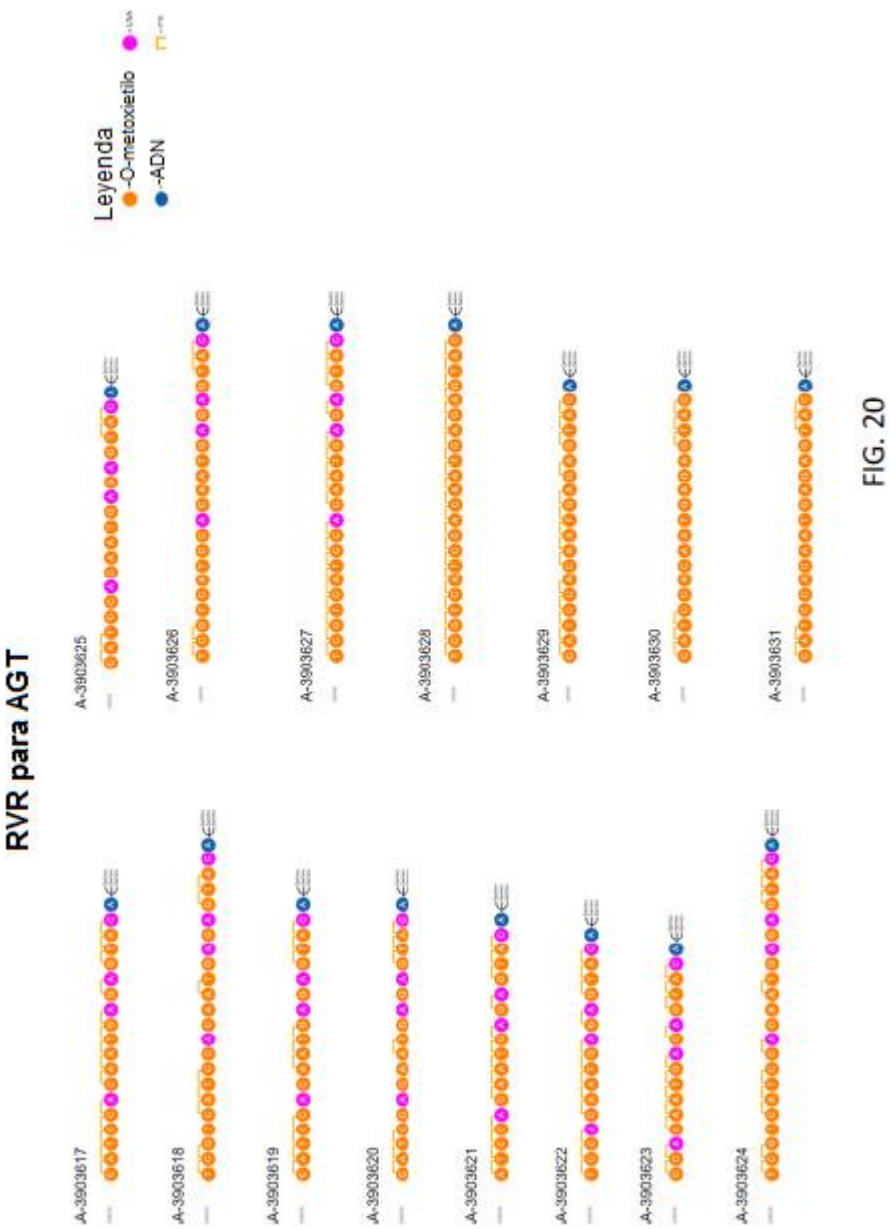
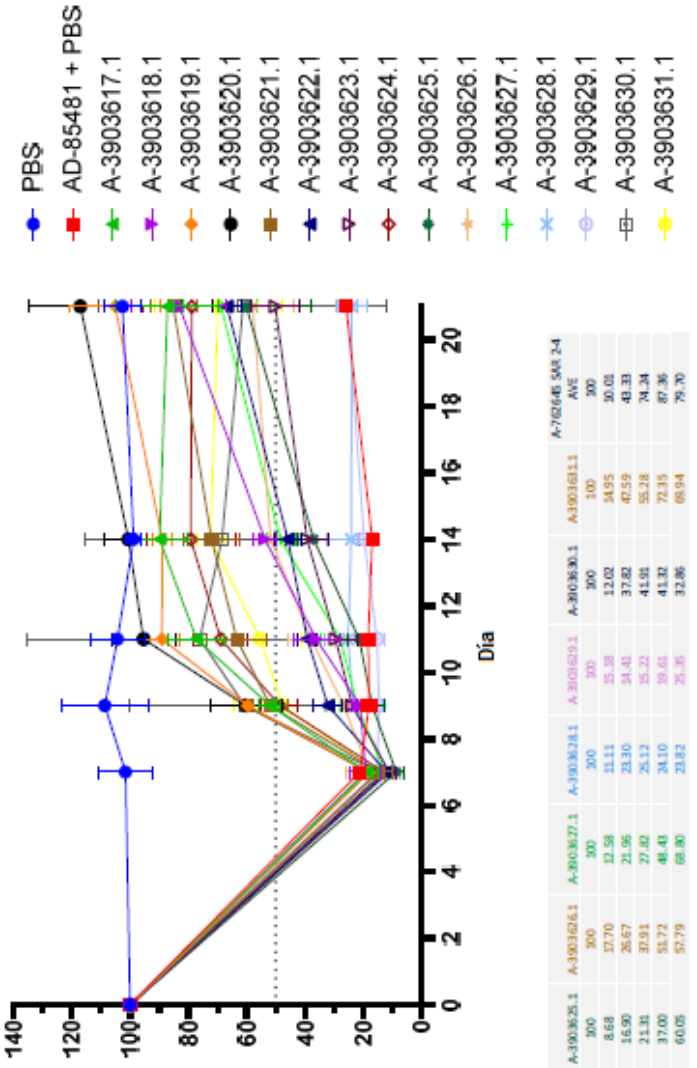

RVR para AGT
Leyenda
-O-metoxietilo
-ADN
A-3903617
A-3903618
A-3903619
A-3903620
A-3903621
A-3903622
A-3903623
A-3903624
A-3903625
A-3903626
A-3903627
A-3903628
A-3903629
A-3903630
A-3903631

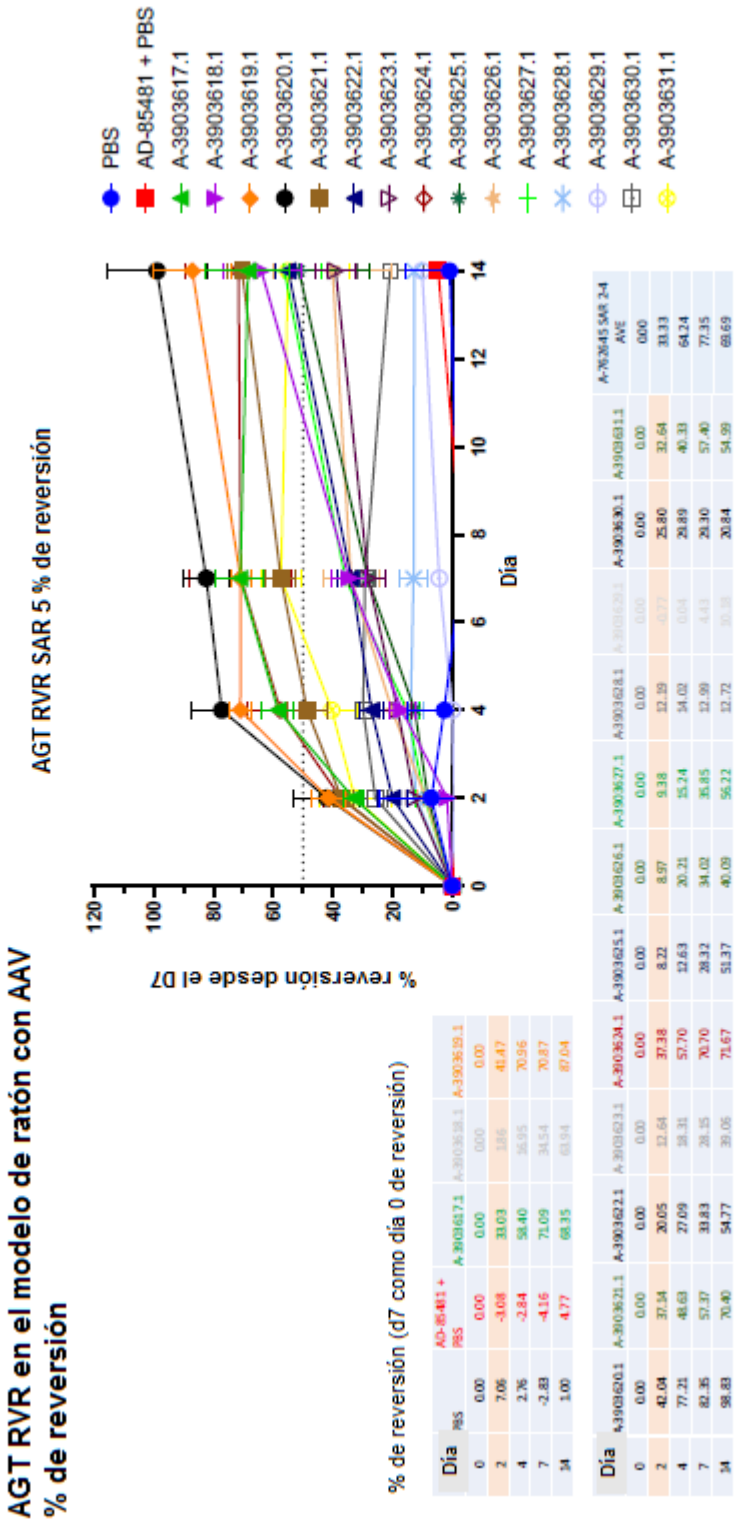
FIG. 20



Día	PBS	AD-85481 + PBS	A-3903617.1	A-3903618.1	A-3903619.1
0	100	100	100	100	100
7	101.64	21.02	18.82	19.13	18.08
9	108.70	17.94	51.84	21.00	59.54
11	104.40	18.18	77.22	36.08	89.04
14	98.82	16.86	89.90	83.67	88.95
21	102.64	25.79	87.17	83.08	105.11

Día	A-3903630.1	A-3903621.1	A-3903622.1	A-3903623.1	A-3903624.1	A-3903625.1	A-3903626.1	A-3903627.1	A-3903628.1	A-3903629.1	A-3903630.1	A-3903631.1	A-762645 SAR 2-4 AVE
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	38.34	14.70	12.02	11.08	13.30	8.68	17.70	12.58	11.11	15.38	12.02	14.95	10.01
9	60.28	51.84	32.06	23.72	50.68	16.90	26.67	21.96	23.30	14.41	37.82	47.59	43.33
11	95.45	63.33	39.11	29.39	71.00	21.31	37.91	27.82	25.12	15.22	41.91	55.18	74.24
14	100.59	73.07	45.85	38.23	84.00	37.00	51.72	48.43	24.10	19.61	41.32	72.35	87.36
21	117.07	85.10	66.79	90.14	84.97	60.05	57.79	68.80	23.82	25.35	32.86	69.94	79.70

FIG. 21

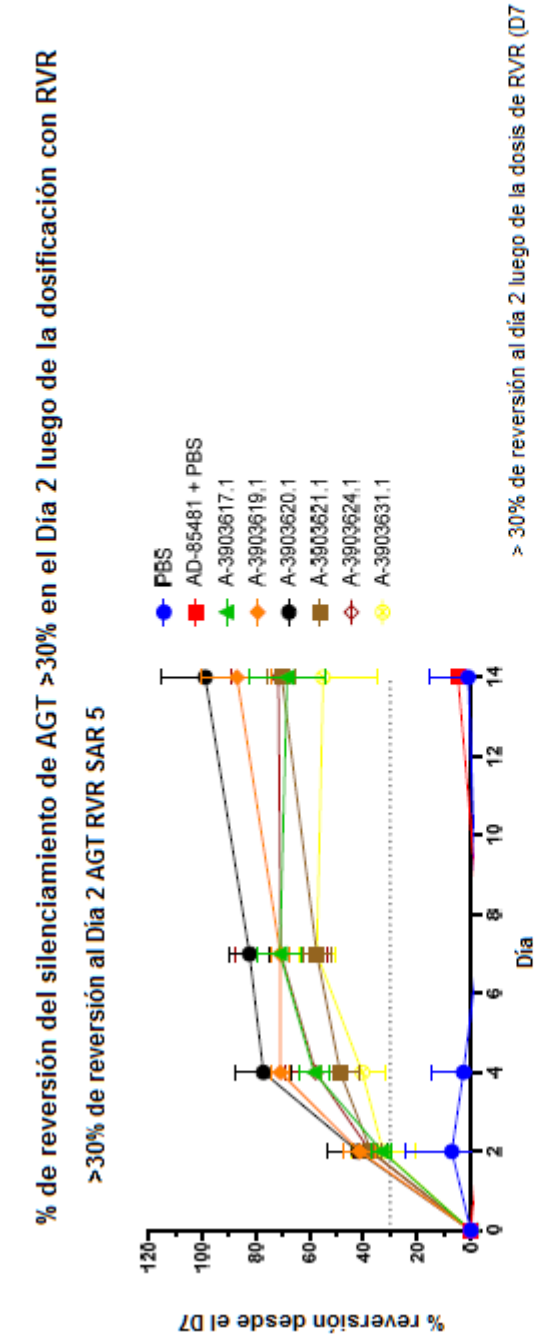


% de reversión (d7 como día 0 de reversión)

Día	PBS	AD-85481 + PBS	A-3903617.1	A-3903618.1	A-3903619.1
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	7.06	-3.68	33.03	1.86	41.47
4	2.76	-2.84	58.40	36.95	70.96
7	-2.83	-4.16	71.09	34.54	70.87
14	1.00	4.77	68.35	61.94	87.04

Día	A-3903620.1	A-3903621.1	A-3903622.1	A-3903623.1	A-3903624.1	A-3903625.1	A-3903626.1	A-3903627.1	A-3903628.1	A-3903629.1	A-3903630.1	A-3903631.1	A-762645 SAR 2-4 AVE
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	42.04	37.54	20.05	12.64	37.38	8.22	8.97	9.38	12.39	-0.77	25.80	32.64	33.33
4	77.21	48.63	27.09	38.31	57.70	32.63	20.21	35.24	34.02	0.04	29.89	40.33	64.24
7	82.35	57.37	33.83	28.35	70.70	28.32	34.02	35.85	12.99	4.43	29.30	57.40	77.35
14	98.83	70.40	54.77	39.06	71.67	51.37	40.09	56.22	12.72	16.38	20.84	54.99	68.69

FIG. 22



> 30% de reversión al día 2 luego de la dosis de RVR (D7 Nadir es D0 para reversión)

Día	A-3903617.1	A-3903619.1	A-3903620.1	A-3903621.1	A-3903624.1	A-3903631.1	A-762645 SAR 2-4 AVE
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	33.03	41.47	42.04	37.14	37.38	32.64	33.33
4	58.40	70.96	77.21	48.63	57.70	40.33	64.24
7	71.09	70.87	82.35	57.37	70.70	57.40	77.35
14	68.35	87.04	98.83	70.40	71.67	54.99	69.69

FIG. 23